

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

**PERFIL DE METILAÇÃO DO TAMBAQUI AMAZÔNICO (*Colossoma
macropomum*) DE CATIVEIRO EXPOSTO AO ANTIPARASITÁRIO
TRICLORFON.**

LUANA DA SILVA NONATO

Manaus-Amazonas

Fevereiro, 2021

LUANA DA SILVA NONATO

PERFIL DE METILAÇÃO DO TAMBAQUI AMAZÔNICO (*Colossoma macropomum*) DE CATIVEIRO EXPOSTO AO ANTIPARASITÁRIO TRICLORFON.

Orientadora: Prof^a Dr^a Daniele Aparecida Matoso

Co-Orientadora: Prof^a Dr^a Josiane Traldi

Dissertação apresentada ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva.

Manaus-Amazonas

Fevereiro, 2021

ATA DA DEFESA PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA, CONSERVAÇÃO E BIOLOGIA EVOLUTIVA

No dia 05 de Março de 2021, às 14:00 horas, de modo on-line, reuniu-se a Banca Julgadora da **DEFESA PÚBLICA de MESTRADO**, composta pelos(as) seguintes Doutores(as), membros titulares: Francijara Araújo da Silva, Maelin da Silva e Américo Moraes Neto; tendo como membros suplentes: Eliana Feldberg e Maria Claudia Gross, afim de proceder a arguição pública da **DISSERTAÇÃO** da estudante **LUANA DA SILVA NONATO**, intitulada: “PERFIL EPIGENÉTICO DO TAMBAQUI AMAZÔNICO (*Colossoma macropomum*) DE CATIVEIRO EXPOSTO AO ANTIPARASITÁRIO TRICLORFON”. O estudo foi conduzido sob a orientação da Dra. Daniele Aparecida Matoso, do INPA e coorientação da Dra. Josiane Baccarin Traldi.

Após a exposição da aula, dentro do tempo regulamentar, a discente foi arguida oralmente pelos membros da Banca Julgadora, tendo recebido o conceito final:

Aprovado por unanimidade

Reprovado

Aprovado por maioria

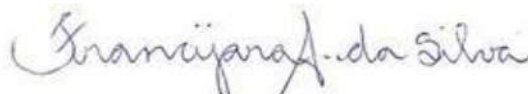
Menção:

Aprovado com “Distinção”

Aprovado com “Distinção e Louvor”

Foi lavrada a ata e assinada pelos Doutores(as), membros presentes da Banca Julgadora.

Francijara Araújo da Silva – UNINORTE



Maelin da Silva – UEPG




Américo Moraes Neto – UFMS




Eliana Feldberg – INPA

Maria Claudia Gross – UNILA



Dra. Jaqueline da Silva Batista
Coordenadora do PPG GCBEV/INPA
PO. 281/2017 – INPA/MCTIC-PR

Esta Ata não tem efeito de conclusão de curso ou diplomação do estudante. Conforme Regulamento PPG GCBEV Art. 62 “Será conferido ao discente o título de MESTRE ou DOUTOR em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva, desde que cumpridas às exigências das Agências de Fomento, dos regulamentos do PPG-INPA e do PPG GCBEV. Para obtenção do título, o estudante deve cumprir, ainda, o exigido nos Arts. 52 ao 55 do Regulamento Geral do INPA e Arts. 61 e 64 do Regulamento PPG GCBEV.

N812p Nonato, Luana da Silva 
Perfil de metilação do tambaqui amazônico (*Colossoma
Macropomum*) de cativeiro exposto ao antiparasitário triclorfon / Luana
da Silva Nonato; orientadora Daniele Aparecida Matoso; coorientadora
Josiane Traldi. - Manaus:[s. 1.], 2021.

3.3 MB
36 p. : il. color.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Genética,
Conservação E Biologia Evolutiva) - Coordenação do Programa de
Pós-Graduação, INPA, 2023.

1. Tambaqui amazônico. 2. *Colossoma Macropomum*. I. Matoso,
Daniele Aparecida. II. Traldi, Josiane. III. Título

CDD 597.48

Agradecimentos

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), por meio do programa de pós-graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva, na pessoa da Dr^a. Jacqueline da Silva Batista.

À Universidade Federal do Amazonas (UFAM) pela estrutura física para o desenvolvimento do presente trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa.

Ao INCT ADAPTA II (CNPq) e FAPEAM pelo suporte financeiro para o desenvolvimento do presente trabalho.

Ao Laboratório de Biotecnologia e Citogenômica Animal (LaBiCA) pela estrutura para a realização dos experimentos.

Às minhas orientadoras Dr^a Daniele Matoso e Dr^a Josiane Traldi, que me receberam no laboratório, auxiliando e orientando com paciência e competência.

Às colegas de laboratório, Hallana e Ana Paula, sem vocês eu não teria conseguido concluir este trabalho.

Às amigas de vida, Nani, Samara, Cleiziane e Yasmim por ouvir minhas lamentações e não desistirem de mim.

Aos amigos de caminhada Vinícius, Ellen, Juliana, Wagner que me ajudaram em alguns passos cruciais do mestrado.

Ao meu noivo, Clemente, por ter tido paciência durante esse tempo, por me apoiar e incentivar a continuar.

Aos meus familiares que sempre me apoiaram em tudo. Agradeço por sempre terem acreditado em mim, mesmo quando eu queria desistir.

E o mais importante, à Deus, que foi a base de tudo isso.

Resumo

A técnica de PCR sensível à metilação (MS-PCR) é simples e eficaz. Ela utiliza a sensibilidade das enzimas *HpaII* e *MspI* no sítio CCGG, à presença de metilação nas citosinas do palíndromo. A clivagem acontece pela detecção ou não do radical metil na citosina interna (C^{5m}CCGG) ou externa (^{5m}CCGG), o que possibilita a comparação do perfil de metilação do DNA, tendo como resultado os diferentes padrões de digestão. Até pouco tempo atrás, não havia relatos sobre o perfil de metilação utilizando enzimas de restrição em peixes amazônicos. No presente estudo foi investigado o status de metilação de sequências específicas de DNA de 18s rDNA e AChE de espécimes de tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characiformes, Serrasalminidae) de cativeiro submetidos ao antiparasitário Triclorfon. Nossas análises, sugerem que há um aumento de fragmentos metilados do gene 18S rDNA em 72h e 96h de exposição ao Triclorfon, nas concentrações de 30% e 50% da CL₅₀-96h para tambaqui. Já no gene da AChE não observamos diferenças no padrão de metilação.

Palavras-chave: Metilação, MS-PCR, Triclorfon, Enzima de restrição, *HpaII/MspI*

Abstract

The methylation-sensitive PCR (MS-PCR) technique is simple and effective. It uses the sensitivity of the enzymes *HpaII* and *MspI* at the CCGG site, to the presence of methylation in the cytosines of the palindrome. Cleavage occurs by detecting or not the methyl radical in the internal (C^{5m}CGG) or external (^{5m}CCGG) cytosine, which makes it possible to compare the DNA methylation profile, resulting in different digestion patterns. Until recently, there were no reports on the methylation profile using restriction enzymes in Amazonian fish. In the present study, the methylation status of specific DNA sequences of 18s rDNA and AChE from specimens of tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characiformes, Serrasalminidae) from captivity to the antiparasitic Triclorfon was investigated. Our analyzes, results that there is an increase of methylated fragments of the 18S rDNA gene in 72h and 96h of exposure to Triclorfon, in the recommendations of 30% and 50% of the LC₅₀-96h for tambaqui. In the AChE gene, however, we did not observe differences in the methylation pattern.

Keywords: Methylation, MS-PCR, Trichlorfon, Restriction enzyme, *HpaII* / *MspI*

Sumário

I. LISTA DE TABELAS	7
II.LISTA DE FIGURAS	8
1. INTRODUÇÃO	9
1.1 PISCICULTURA	9
1.2 PRINCIPAIS ESPÉCIES UTILIZADAS PARA CULTIVO	10
1.2.1 ASPECTOS GERAIS DO <i>OLOSSOMA MACROPOMUM</i> (TAMBAQUI)	10
1.3 USO DE INSETICIDAS.....	11
1.3.1 Triclorfon	11
1.3.2 Conseqüências da interação de químicos com organismos aquáticos	13
1.4 MECANISMOS EPIGENÉTICOS	14
1.5 RELAÇÃO DOS GENES 18S E ACETILCOLINESTERASE (ACHE) COM A EPIGENÉTICA ..	15
2. OBJETIVOS.....	15
2.1 GERAL	15
2.2 ESPECÍFICOS	16
3.1 COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO.....	17
3.2 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO	18
3.3 PCR SENSÍVEL À METILAÇÃO (MS-PCR).....	19
3.3.1 Amplificação das seqüências	19
3.4 REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO.....	20
5. DISCUSSÃO	29
6. CONCLUSÃO	31
7. REFERÊNCIAS.....	32

I. Lista de Tabelas

Tabela 1 Amostras Coletadas para o presente estudo.....	17
---	----

II. Lista de Figuras

Figura 1 Estrutura do 2,2,2-tricloro-1-dimetoxifosforietanol (Triclorfon).....	12
Figura 2 Diagrama do perfil de metilação.....	19
Figura 3 Digestão enzimática das amostras controle (tempo 0).	22
Figura 4 Digestão enzimática das amostras de tabaqui (<i>Colossoma macropomum</i>) nos tecidos de cérebro (C) e músculo (M).....	25
Figura 5 Perfil de metilação do gene sequência de DNA ribossomal 18S (18S rDNA).	26
Figura 6 Perfil de metilação do gene da acetilcolinesterase (AChE).	27
Figura 7 Mapa de restrição dos genes 18S rDNA e acetilcolinesterase (AChE) de Tabaqui sequenciados	28

1. INTRODUÇÃO

1.1 Piscicultura

A produção de pescado é dividida em dois ramos: o primeiro consiste na pesca extrativa, o qual tem como objetivo a retirada de recursos pesqueiros do ambiente nativo. Já o segundo ramo trata-se do cultivo de peixes, aquicultura, o caracterizado pelo espaço limitado e monitorado para a criação de organismos aquáticos de interesse produtivo econômico (Embrapa, 2020).

Em 2019, a aquicultura, na modalidade de tanques rede (gaiolas) ou viveiros escavados, o Brasil atingiu a produção de 758,006 toneladas de peixes, o que significou uma elevação de 4,9% em relação ao ano de 2018, que foi de 722.560 toneladas. Dessa forma, o Brasil é o 4º maior produtor de tilápia, espécie que representa 57% da produção nacional, ficando atrás apenas da China, Egito e Indonésia. Conforme uma análise da Associação Brasileira da Piscicultura Peixe BR®, entre 2017 e 2018 a produção nacional de peixes nativos, liderada pelo tambaqui (*Colossoma macropomum*), recuou 4,7%. A Região Sul aumentou sua participação na piscicultura ficando com 30,3% em 2019, uma diferença de 2,8% em relação ao ano anterior. Em um ranking nacional de produção, o Norte está na frente, com 20%, seguido do Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste com 18,35%, 16,8% e 15,55%, respectivamente. Quanto às exportações o setor avançou 26%, segundo levantamentos feitos em 2015 e 2019, o que significou um aumento de 833% (Peixe-BR, 2020).

O bom posicionamento do Brasil no ranking mundial é decorrente do seu amplo território (8,5 milhões de Km²), devido sua extensão do litoral, clima tropical, boa disponibilidade hídrica e áreas favoráveis para a construção de tanques (Kubitza, 2015). A partir da década de 1960, várias políticas públicas foram criadas para gerar um ambiente institucional favorável à inovação e tecnologia e à adaptação de conhecimento na aquicultura, como exemplo a *Codex Alimentarius*, que foi criada pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) e da Organização Mundial da Saúde (OMS). Dez anos depois, foi criada a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), que reformou a pesquisa para aumentar o rendimento do setor agropecuário (Schulter e Vieira Filho, 2017). Estes órgãos legislam com base na segurança alimentar e a sua influência sobre a comercialização desses produtos (Gonçalves, 2017).

1.2 Principais espécies utilizadas para cultivo

Com relação às espécies cultivadas, só de tilápias, o Brasil produziu 400.280 mil toneladas em 2019. O Paraná, líder do ranking nacional da espécie, colocou 154.200 toneladas no mercado. Segundo no ranking, São Paulo contabilizou 69.800 toneladas. Santa Catarina, o terceiro, 33.800 toneladas. O Amazonas encontra-se em 14º lugar, com uma produção de 20.596 toneladas, um aumento de 34,9% em relação ao ano de 2018. Com relação à produção de peixes nativos, a situação é diferente, pois houve uma queda de 4,7%, o que significou uma diferença de 14.325 toneladas no período de 2017 e 2018. Entre as causas citadas para a queda na produção, estão problemas climáticos, sanitários e de mercado em importantes regiões produtoras. Com o desempenho negativo, a participação do segmento – liderado pelo tambaqui - caiu de 43,7% no ano retrasado para 39,84% no ano passado (Salomão, 2019).

A produção de peixes redondos (tambaqui, pacu e pirapitinga, alocados nos gêneros *Colossoma* e *Piaractus*) ocupa o segundo lugar no ranking da produção de peixes no Brasil, com uma produção de 186.000 toneladas em 2014 (Kubitza, 2015). Dentre os peixes redondos, o tambaqui é o mais produzido no país por apresentar facilidade de obtenção de juvenis, bom crescimento, alta rusticidade e grande aceitação pelo mercado consumidor (Pedroza-Filho *et al.*, 2016). No estado do Amazonas, a aquicultura ainda é rudimentar, devido ao custo, aos deslocamentos e disponibilidade da ração (Oliveira *et al.*, 2012), à aquisição de alevinos viáveis (Nakauth *et al.*, 2015) e à restrição de informações e técnicos especializados (Silva *et al.*, 2017).

1.2.1 Aspectos gerais do *Colossoma macropomum* (tambaqui)

O tambaqui (*Colossoma macropomum* Cuvier, 1818) é uma espécie nativa amplamente distribuída pela bacia Amazônica (Suframa, 2003; Godoi *et al.*, 2012). É encontrada nos três principais tipos de água da Amazônia (branca, clara e preta), bem como nas corredeiras e a montante e a jusante de barreiras geográficas (Araújo-Lima e Goulding, 1998; Goulding *et al.*, 2003; Da Silva *et al.*, 2003). Pertence à classe Actinopterygii, ordem Characiformes e família Characidae (Fricke *et al.*, 2020). Possui hábito alimentar onívoro, dentição forte e consome principalmente zooplâncton, frutos e sementes (Rodrigues, 2014).

É uma espécie com muitas adaptações fisiológicas e anatômicas aos ambientes de hipóxia, graças à capacidade de expansão do lábio inferior em condições extremas, que lhe permite captar e direcionar a água das camadas mais superficiais, rica em oxigênio, para as brânquias o que permite seu cultivo intensivo (Melo *et al.*, 2001; Rodrigues, 2014).

1.3 Uso de Inseticidas

Uma ampla variedade de doenças parasitárias ocorre em peixes, dependendo da fisiologia do organismo e principalmente da estocagem de exemplares em viveiros. Nos tanques, há uma produção excessiva de matéria orgânica que pode atrair parasitas, como os artrópodes aquáticos e ocasionar doenças (Dias *et al.*, 2015).

Para minimizar a ação dos parasitas e diminuir as perdas nos cultivos de peixes, atualmente utilizam-se pesticidas, que são substâncias utilizadas para reduzir os efeitos destrutivos de formas vivas, como insetos, vermes e ervas, os quais estão mantendo uma relação ecológica de parasitismo com o peixe. Porém, essas substâncias podem vir de resíduos industriais e domésticos, podendo ocasionar alterações bioquímicas, histopatológicas, genotóxicas e moleculares nos tecidos dos peixes, de tal forma que tais mudanças podem ser utilizadas como indicadores para determinar o nível de contaminação. Os inseticidas são divididos em quatro grupos: organofosforados, organoclorados, carbamatos e piretróides (Kayhan *et al.*, 2013).

1.3.1 Triclorfon

A classe de pesticidas mais utilizada é dos organofosforados, onde estão alocados os inseticidas que possuem a função de inibir a enzima acetilcolinesterase (AChE), por meio da formação de um complexo irreversível com a substância, e dessa maneira impede de responder à hidrólise da acetilcolina (ACh), prejudicando o impulso nervoso (Silva *et al.*, 2013). O Triclorfon ou metrifonato (dimetil 2,2,2-tricloro-1-hidroxietil fosfonato – Figura 1) é um composto organoclorofosfato que deriva do ácido fosfórico, e é classificado como altamente tóxico (classe II). Muitos fatores interferem na absorção de um composto. Há uma relação diretamente proporcional entre a elevação da temperatura ambiental e umidade, com a absorção cutânea,

provavelmente devido ao aumento da taxa de respiração, da frequência e do fluxo sanguíneo para os tecidos (Brasil, 2013).

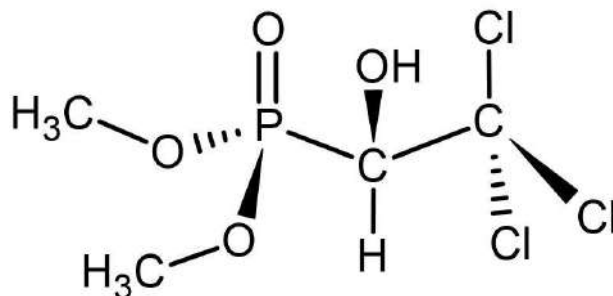


Figura 1. Estrutura do 2,2,2-tricloro-1-dimetoxifosforietanol (Triclorfon ou Metrifonato).

O tratamento com Triclorfon é feito por banhos de imersão variando a dosagem/tempo de duração e o parasita que se deseja combater, visto que o desequilíbrio da substância pode ocasionar a mortalidade do animal parasitado (Rauco 2002). Segundo a CONAMA 1986, Resolução nº 20 feita pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente, estabeleceu-se a dosagem permitida para os compostos organofosforados em água doce de 1,0 mg/L, porém, os níveis utilizados pelos piscicultores são superestimados, indo de 0,13 mg/L a 25 g/L de Triclorfon lançados na água para os banhos de imersão.

O Triclorfon é eficaz no tratamento de diversas infecções helmínticas em humanos, incluindo ancilostomíase, ascaridíase e tricuriase. Seus efeitos farmacológicos, manifestados como efeitos colaterais, não são mais graves ou frequentes do que outros medicamentos anti-helmínticos. Além disso, foi demonstrado que o Triclorfon também é eficaz contra a infecção por *Schistosoma hematobium*. (Krienger, 2001).

Conhecido por ser um inibidor da enzima acetilcolinesterase (AChE), o Triclorfon, embora tenha sido considerado como uma droga para a doença de Alzheimer, seu uso foi interrompido devido aos efeitos adversos observados (Pohanka M *et al.*, 2011)

1.3.2 Consequências da interação de químicos com organismos aquáticos

Os peixes podem ser usados como bioindicadores em vários ecossistemas aquáticos devido sua alta sensibilidade à presença de substâncias na água, pois apresentam maior vulnerabilidade quando o agente tóxico alcança a cadeia trófica por biomagnificação (Kerambrun *et al.*, 2011). Sabendo dos efeitos sobre a fisiologia dos peixes e a alta concentração do Triclorfon empregado na piscicultura, vários estudos foram feitos na tentativa de identificar as alterações e o grau de periculosidade que esse composto representa para variadas espécies de peixes. Os efeitos do Triclorfon no pacu (*Piaractus mesopotamicus*), exposto a uma concentração subletal do inseticida que correspondia a 8 µg/L, verificou-se que a atividade da AChE reduziu no cérebro dos animais após a exposição e permaneceu decrescendo durante a sua recuperação (Venturini *et al.*, 2014).

A exposição precoce à poluentes provenientes de esgotos não tratados podem constituir um risco ecotoxicológico para populações de peixes em cultivo, especificamente, mortalidade, aumento das transaminases, ativação de enzimas antioxidantes, dano oxidativo lipídico e depleção de glicogênio. De todos os órgãos investigados, o fígado apresentou o maior grau de alteração, o que corrobora sua importância como órgão-alvo nos estudos de toxicologia de peixes. (Cazenave *et al.*, 2014). Na espécie *Scatophagus argus* (Scat Manchado) a exposição ao pesticida Diazinon causou alterações histopatológicas nos tecidos das gengivas e rins. A capacidade de osmorregulação nessa espécie foi reduzida devido a degeneração nas células do túbulo epitelial, do túbulo renal e da cápsula de Bowman (Ghasemzadeh *et al.*, 2015).

A exposição direta a produtos químicos, pode causar efeitos adversos por induzir mudanças no epigenoma, e de forma geral, impactos negativos na fisiologia dos peixes. Alguns metais tóxicos podem interferir diretamente na atividade das enzimas metiltransferases levando a um perfil alterado de metilação do DNA e alterações subsequentes na expressão gênica. Assim, as alterações genéticas e epigenéticas de organismos, que induzem a mudanças do perfil de expressão de genes, podem ser resultados de fatores ambientais como exposição contínua a contaminantes presentes no meio (Mirbahai e Chipman, 2014).

1.4 Mecanismos Epigenéticos

A palavra epigenética foi primeiramente usada por Conrad Waddington em 1942 para definir um ramo da biologia que estuda as interações causais entre genes e seus produtos levando à produção de um fenótipo. De fato, anos mais tarde, dados foram publicados sobre a modificação das asas de moscas, em diversas gerações, após tratamento térmico durante o desenvolvimento (Waddington, 1942). Posteriormente, as mudanças de desenvolvimento induzidas por condições ambientais poderiam, em certas condições, tornarem-se herdáveis (Lucchesi, 2019).

Recentemente, a epigenética tem sido objeto de crescente interesse, o que resultou em várias pesquisas buscando contextualizar seu desenvolvimento histórico (Best *et al.*, 2018). Bird (2007) definiu a epigenética como a adaptação estrutural de regiões cromossômicas, assim como o registro de sinais ou a perpetuação de atividades alteradas. Além disso, Goldberg *et al.* (2007) conceituaram a epigenética como o estudo das mudanças herdáveis na expressão gênica ou no fenótipo celular, que ocorrem potencialmente e idealmente de maneira estável, sem alterações na sequência de bases no pareamento de DNA Watson-Crick.

As modificações epigenéticas, apesar de estáveis, são reversíveis e únicas para cada tipo celular (Ohgane *et al.*, 2008). Além disso, a exposição a fatores ambientais, tais como dieta, comportamento, estresse, pesticidas e fatores estocásticos podem levar a modificações do epigenoma (Faulk e Dolinoy 2011; Collotta *et al.*, 2013).

Segundo García-Giménez (2016), devido ao fato das mudanças epigenéticas serem reversíveis, o epigenoma humano, caracterizado pela sua habilidade de responder dinamicamente aos fatores intra e extracelulares, é um potencial contribuinte para saúde e a doença. Nesse sentido, o desenvolvimento de biomarcadores epigenéticos, o avanço da medicina personalizada e o entendimento da ação ambiental sobre fenótipos variáveis lançam luz sobre fenômenos controversos como a plasticidade fenotípica. Ainda, a metilação do DNA possui um papel central no controle do genoma e da expressão gênica. Variações no perfil de metilação do DNA podem gerar novos fenótipos e essas variantes podem ser alvos da seleção. Por isso é importante explorar as consequências da metilação de DNA na diversidade e evolução das espécies (Salmon *et al.* 2007).

1.5 Relação dos genes 18s e Acetilcolinesterase (AChE) com a epigenética

O gene 18S rRNA é uma sequência moderadamente repetitiva, faz parte dos genes ribossomais, os quais estão organizados *in tandem* em série de unidades transcricionais. O gene 18S rRNA é responsável por montar o rRNA 18S, que faz parte da subunidade menor do ribossomo 40S em eucariotos. (Kucharski *et al.* 2008). Esse gene possui vários sítios CCGG palindrômicos, que podem ser metilados (Da Silva *et al.* 2019).

A enzima acetilcolinesterase (AChE) é responsável pela degradação do neurotransmissor acetilcolina (ACh). Essa enzima possui um sítio esterásico que interage com o Triclorfon. Dessa forma, a substância em questão inibe a enzima, por meio de um complexo irreversível que impede a enzima de hidrolisar a ACh em colina e acetato. Dessa forma, a ACh se acumula nas fendas sinápticas, levando a uma ativação excessiva de transmissões dos impulsos nervosos e a uma série de alterações fisiológicas nos peixes (De Aguiar *et al.* 2004). Como resultado, peixes intoxicados com Triclorfon podem ter o corpo deformado, perder o equilíbrio e a habilidade de nadar além de adquirirem dificuldade em encontrar alimento e evitar predadores (Da Silva *et al.*, 2020; Duncan *et al.*, 2020).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi investigar o perfil de metilação utilizando os palíndromos CCGG, que são alvos de metilação. Há enzimas que os reconhecem, como as enzimas *MspI* e *HpaII*. A primeira, cliva sequências no sítio C^{5m}CCGG, ou seja, devido a presença do radical 5 metil localizado na citosina interna. Entretanto, esta enzima é sensível à metilação na citosina externa ^{5m}CCGG. Ao contrário do que acontece com a enzima *HpaII* na presença do radical metil na citosina interna. Além disso ambas as enzimas são sensíveis à metilação total do palíndromo (^{5m}C^{5m}CCGG) o que previne o corte da sequência. Isso pode levar à uma subestimativa dos níveis de metilação do genoma. (Zilberman e Henikoff, 2007)

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

- Analisar o perfil de metilação dos genes 18S rDNA e da enzima acetilcolinesterase (AChE) de espécimes de tabaqui cultivados em cativeiro e tratados com o antiparasitário Triclorfon.

2.2 Específicos

- Investigar as sequências gênicas do 18S rDNA e Acetilcolinesterase (AChE) no genoma de tabaqui, utilizando amostras controle e experimental, por meio da digestão enzimática.
- Verificar possíveis alterações no padrão de metilação das sequências de interesse, entre exemplares do grupo controle e animais tratados com Triclorfon.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta de material biológico

Esta etapa consiste na determinação da concentração letal de 50% dos espécimes após 96 h (CL₅₀-96h) em indivíduos de tambaqui (*Colossoma macropomum*) expostos a Triclorfon diluído na água conforme descrito em (da Silva *et al.* 2020, Duncan *et al.* 2020). Os exemplares de tambaqui juvenis foram trazidos da Fazenda Experimental da UFAM e foram aclimatados por 40 dias em tanques de polietileno. Logo após esse período, 6 exemplares de cada tanque foram remanejados para tanques com 60 L de água e com as concentrações administradas de 30% da CL₅₀ (0,261 mg/L) e 50% da CL₅₀ (0,435 mg/L) de Triclorfon diluídas na água, além dos tanques com condição de controle (Tabela 1). Tecido muscular e cerebral foram retirados dos espécimes no tempo de 0h, 24h, 48h, 72h e 96h, e armazenados em etanol 100% para a extração de DNA e início dos testes. Todos os procedimentos executados seguiram as normatizações do Comitê de ética em pesquisa animal da UFAM (030/2018 – CEUA/UFAM).

Amostra	Tempo de exposição			
	24h	48h	72h	96h
C ₀	9	34	59	82
	12	38	60	85
	13	40	61	87
C ₁	17	42	65	89
	19	46	68	90
	21	48	72	95
C ₂	26	49	73	99
	30	51	75	100
	32	53	77	101

Tabela 1. Planejamento experimental da coleta de amostras de indivíduos a cada 24h expostos a diferentes concentrações de Triclorfon. Legenda: C₀ – Ausência de Triclorfon (Controle), C₁: 0,261 mg/L (30% da CL₅₀) e C₂: 0,435 mg/L (50% da CL₅₀).

3.2 Extração de DNA genômico

A extração de DNA total foi realizada utilizando o protocolo de extração via fenol-clorofórmio segundo Sambrook (2001), com modificações. Cerca de 25 mg de tecido preservado (cérebro ou músculo) foram usados para a extração de DNA, seguindo a ordem de lise celular, com 200 µL de solução de lise (Tris 100 mM; EDTA 50 mM; SDS 10%; DTT 500 mM; Proteinase K 20 ng/µL) e, em seguida, incubado em banho maria por 2 horas a 60 °C. Para dissociação total do tecido, a cada 20 minutos, utilizou-se um pistilo devidamente esterilizado para a maceração.

Na etapa de purificação, no mesmo tubo do tecido lisado foi adicionado 600 µL de fenol hidratado/clorofórmio P.A. (1:1) e homogeneizou-se a mistura com suaves inversões consecutivas. Posteriormente, o tecido lisado foi centrifugado por 20 minutos à 14.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e adicionou-se 600 µL de clorofórmio P.A. gelado, e a mistura foi homogeneizada em seguida por suaves inversões. Os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 14.000 rpm sendo, em seguida, mantidos em repouso até observação da formação de uma solução bifásica.

Para a precipitação do DNA, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo e brevemente foi acrescentado o volume equivalente de álcool isopropílico gelado. Em seguida, a solução foi incubada a -20 °C *overnight* ou por 1 hora a -80 °C. Após esse tempo, as amostras foram centrifugadas durante 20 minutos, 14.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 500 µL de etanol 70% gelado sendo, logo em seguida, a mistura centrifugada por 10 minutos a 14.000 rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi mantido em temperatura ambiente para evaporação total do solvente remanescente. O DNA extraído foi ressuspensão com a mistura TE-RNase (Tris 10 mM pH 7,5; EDTA 0,1 mM; RNase 10 µg/µL) e incubado em banho maria por 30 min à 37 °C para degradação total de RNA.

A integridade do DNA genômico extraído foi checada usando eletroforese em gel de agarose (0,8% m/v) corados com brometo de etídio, em tampão TEB 1X em 80V por 40 minutos. O gel foi visualizado em transiluminador ultravioleta Quantum (Vilber Lourmat – França).

3.3 PCR sensível à metilação (MS-PCR)

As enzimas *HpaII* e *MspI* são isosquisômeros que reconhecem a mesma sequência de DNA, CCGG. Embora ambas as enzimas possam reconhecer o mesmo sítio de restrição, a sensibilidade delas para clivagem da sequência são diferentes (Salmon *et al.*, 2007). Para verificar a metilação, aproximadamente 0,1 µg/µL de DNA genômico extraído dos diferentes tecidos foram digeridos com as enzimas de restrição *MspI* e *HpaII*, seguindo as instruções do fabricante (Promega). Para verificar a eficiência da enzima sobre o DNA, utilizou-se o DNA genômico, diluído com água destilada autoclavada na mesma proporção que estava em solução com as enzimas. Posteriormente, os produtos da digestão foram conferidos por eletroforese padrão (com tampão Tris-Borato-EDTA 0,5X e corrida a 80 V por 40 minutos) em gel de agarose 1,5 % corado com brometo de etídio.

No presente estudo, o surgimento de bandas no gel de fragmentos digeridos por ambas as enzimas foi interpretado como fragmento metilado (5^mC5^mCGG), ou seja, nem a *HpaII* nem a *MspI* digeriu o fragmento e o mesmo aparece intacto no gel. A presença de fragmento no gel na digestão por *HpaII* e sua ausência na digestão por *MspI* foi interpretada como metilação na citosina interna ($C5^mCGG$). Os fragmentos que aparecem apenas na digestão com *MspI* foram interpretados como fragmentos metilados na citosina externa (Figura 2).

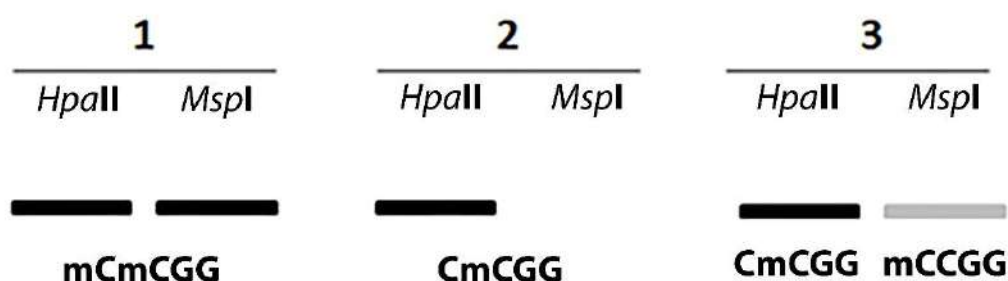


Figura 2. Diagrama do perfil de metilação. Possíveis resultados a serem encontrados com a técnica de PCR sensível à metilação incluem a identificação de regiões gênicas metiladas e não metiladas.

3.3.1 Amplificação das sequências

Após a digestão com as enzimas de restrição, a região dos genes 18S e AChE foram amplificadas por reação em cadeia da polimerase (PCR) com os seguintes primers: para 18S 18S Fw (5' CCG CTT TGG TGA CTC TTG AT 3') e 18

Rv (5' CCG AGG ACC TCA CTA AAC CA 3') (Gross *et al.*, 2010). Para a amplificação do gene da AChE foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores (primers) específicos para o tabaqui: Fw_ACHE401 (5' TCC CTT GAC CTG CTG TTT 3') e Rv_ACHE401 (5' TTT CCG CTA TTC CTT TGT GC 3'). A eficiência da reação foi verificada em eletroforese em gel de agarose 1,5% corada com brometo de etídio.

Para a reação de PCR do gene 18S foram utilizados 100 ng de DNA digerido em uma solução contendo 1X *GoTaq® Flexi Buffer*, 2,5 mM cloreto de magnésio, 0,1 µM de cada primer, 0,2 mM dNTP, 0,08 U/µL *GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase* e água *ultra pura*. A reação foi executada em termociclador *Veriti 96 Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems - EUA), usando as seguintes configurações: um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 1 minuto; 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto; anelamento a 58° C por 1 minuto e extensão a 72° C por 1:30; seguido por uma extensão final a 72° C durante 5 minutos.

A reação de PCR de AChE foi realizada da seguinte maneira: 100 ng de DNA digerido, 1X *GoTaq® Flexi Buffer*, 1,5 mM cloreto de magnésio, 0,2 mM dNTP, 1 µM de cada primer, 0,08 U/µL *GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase* e água *ultra pura*. A reação foi realizada no termociclador *Veriti 96 Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems - EUA), aplicando a seguinte configuração: um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 2 minutos; 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos; anelamento a 60° C por 30 segundos e extensão a 72° C por 30 segundos; seguido por uma extensão final a 72° C durante 5 minutos.

Para a averiguação dos tamanhos dos fragmentos amplificados foi adicionado ao gel um marcador de massa molecular de 1 kb (ThermoFisher Scientific – EUA).

3.4 Reação de Sequenciamento

Para confirmar os produtos de amplificação, com ênfase na sequência acetilcolinesterase e, para verificar o mapa de restrição, foi realizado o sequenciamento de algumas amostras. Os produtos de PCR foram purificados utilizando *ExoSAP-IT PCR Product Cleanup Reagent*.

Para reação de sequenciamento, usou-se os procedimentos descritos no protocolo do *Kit Big Dye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied

Biosystems™) contendo: 1,5 µL de da mistura de reação *Big Dye™* , 1,5 µL de tampão *Big Dye™* 2X, 2 µL do produto da PCR de AChE e 1 µL do produto da PCR do gene18S (aproximadamente, 100 ng) e 1 µL do primer forward ou reverse (10 pmol/µL) específico para cada gene de interesse. No termociclador aplicou-se os seguintes parâmetros: 94°C durante 4 minutos, 30 ciclos de 94°C durante 1 minuto, 1 minuto e 30 segundos à temperatura de anelamento específica para cada par de primer, 72°C durante 2 minutos e extensão final de 72°C durante 10 minutos. Em seguida, na etapa de purificação do produto da reação de sequenciamento em placa de micropoços, adicionou-se à mistura 2,5 µL de EDTA 125 mM e 27,5 µL de etanol 100%. A placa foi mantida em temperatura ambiente durante 15 minutos. A placa foi centrifugada por 30 minutos, a 4°C e 2000 rpm. A centrifugação seguinte foi realizada com a placa invertida para a retirada do excesso de etanol e EDTA nos poços, durante 1 minuto, 4°C e 14000 rpm. Após a segunda centrifugação, 30 µL de etanol 70% foram adicionados aos poços e duas centrifugações foram realizadas por 15 minutos, 4°C e 16500 rpm. A última centrifugação foi realizada novamente com a placa invertida por 1 minuto, 4 °C e 10000 rpm. A placa foi levada à estufa em uma temperatura de 40 °C durante 15 minutos. Ao final do processo, 10 µL de formamida Hi-Di foram adicionados à solução. As amostras serão sequenciadas com o auxílio do analisador genético automático ABI PRISM® (Applied Biosystems™).

A qualidade das sequências obtidas foi averiguada através da análise dos eletroferogramas obtidos através do software ABI 3130 *Sequence Analyzer* (Applied Biosystems™).

4. RESULTADOS

A organização das amostras no gel segue em forma de tríade, onde o primeiro poço mostra o DNA íntegro (não tratado com enzimas), o segundo poço é o DNA tratado com a enzima *Hpa*II e por fim, o terceiro poço é o DNA tratado com a enzima *Msp*I.

Na Figura 3.A verificamos que o padrão de digestão enzimática foi eficiente, principalmente para a digestão pela enzima *Msp*I (rastros mais evidentes no gel). Em 3.B observamos os resultados obtidos para análise do gene 18S rRNA.

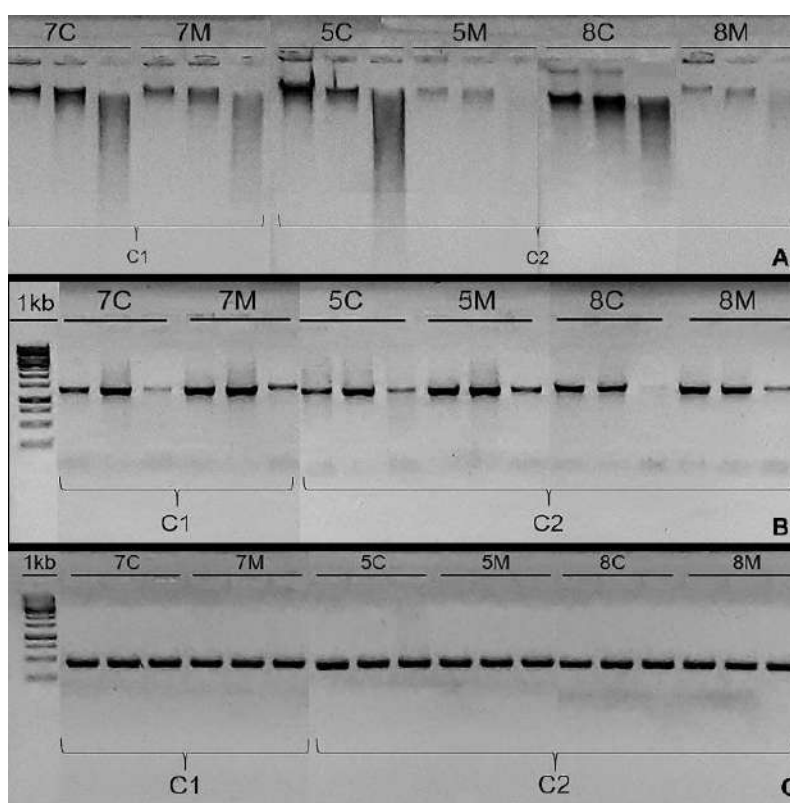


Figura 3. Digestão enzimática das amostras controle (tempo 0). (A) Padrão de digestão enzimática das enzimas *Hpa*II e *Msp*I em amostras de cérebro - C e músculo - M de tambaqui (*Colossoma macropomum*). (B) Padrão de metilação *Hpa*II/*Msp*I-PCR do gene 18S rRNA (1.500 pb). (C) Padrão de metilação *Hpa*II/*Msp*I-PCR no gene da Acetilcolinesterase (AChE) (401 pb). 1Kb: marcador de massa molecular. C₁ (30% da CL50-96h), C₂ (50% da CL50-96h).

Nessas amostras controle, verificamos que as amostras de cérebro (7C, 5C e 8C) estavam hipometiladas quando comparadas com as amostras de músculo (7M, 5M e 8M). Esse resultado verifica-se pelo padrão menos intenso de bandas (7C e 5C) ou ausentes (8C), nas digestões produzidas pela enzima *Msp*I. Nas digestões produzidas pela enzima *Msp*I nas amostras de músculo as bandas são mais intensas indicando que havia mais fragmentos metilados na citosina externa

(^{5m}CCGG), além disso verifica-se a presença de fragmentos metilados na citosina interna (C^{5m}CGG), já que as bandas produzidas no gel para a digestão por *HpaII* são intensas. Apesar disso, a presença de fragmentos metilados na citosina externa parece estar em menor quantidade nas amostras, já que a intensidade das bandas produzidas nas amostras digeridas por *HpaII* é maior do que nas amostras digeridas por *MspI*. Aparentemente não houve efeito significativo da concentração de Triclorfon nas amostras analisadas, embora tenham sido estudadas apenas uma amostra no tempo 0h na concentração C₁ e duas amostras no tempo 0h na concentração C₂. Em 3.C verificamos o padrão de metilação do gene da acetilcolinesterase (AChE). Nesse gel observamos para ambas as concentrações (C₁ e C₂) que houve amplificação do fragmento da AChE em todas as amostras podendo indicar que nessa região gênica o padrão de metilação era total (^{5m}C^{5m}CGG) ou o fragmento não possuía palíndromos CCGG passíveis de digestão pelas enzimas.

Na Figura 4, é apresentado o padrão de digestão enzimática obtido para as amostras de tecidos cerebral e muscular de tambaqui após tratamento com as enzimas *HpaII* e *MspI*, respectivamente. Nesse gel, a digestão por *MspI* produziu um rastro mais evidente enquanto a digestão por *HpaII* foi menos eficiente no corte do DNA.

Na Figura 5 observamos o padrão de metilação do gene 18S rRNA. em A no tempo de 24h na concentração C₀, observamos nas amostras de cérebro (9C, 12C, 13C) um padrão de metilação semelhante ao observado nas amostras controle na concentração C₁ e concentração C₂ com presença de fragmentos C^{5m}CGG > ^{5m}CCGG (onde > significa em maior proporção). Isso indica presença de sítios metilados na posição interna do palíndromo (C^{5m}CGG) na amostra 9C, e presença de poucos fragmentos metilados na posição externa (^{5m}CCGG), nas amostras (9M, 12C, 12M, 13C, 13M, presença de banda no gel com pouca intensidade na digestão por *MspI*). Nos tempos de 48h e 72h na C₀ nos tecidos de cérebro (amostras 34C, 38C, 40C, 59C, 60C, 61C) observamos fragmentos metilados do tipo C^{5m}CGG. Nas amostras de músculo no tempo de 48h esse padrão se repete. No tempo de 72h observamos fragmentos metilados na citosina externa (^{5m}CCGG), em pequena proporção nas amostras (59M, 60M, 61M). No tempo de 96h na concentração C₀ observamos fragmentos metilados do tipo ^{5m}CCGG nas amostras 82M, 85C, 87C e

87M. Esse dado parece indicar um pequeno aumento da metilação nas amostras provenientes do tempo de 96h.

Em relação ao tempo de 24h na concentração C_1 , os fragmentos estão totalmente metilados (5^mC5^mCGG), haja vista a presença de bandas no gel de igual intensidade em todas as amostras. Na concentração C_2 , nesse mesmo tempo, observamos presença de metilação dos fragmentos do tipo 5^mCCGG e $C5^mCGG$, já que a intensidade das bandas nas amostras 26M, 30C, 30M, 32C, 32M, digeridas por *MspI* é menor que as observadas na digestão por *HpaII*.

No tempo de 48h na concentração C_1 , na amostra 42 em ambos os tecidos (42C, 42M) observamos o mesmo padrão de metilação, com presença de fragmentos $C5^mCGG > 5^mCCGG$. Na amostra 46C observamos fragmentos totalmente metilados (5^mC5^mCGG), e na amostra 46M, fragmentos 5^mCCGG metilados. Na amostra 48C vemos fragmentos $C5^mCGG$ metilados e na amostra 48M fragmentos 5^mC5^mCGG . Em relação a concentração C_2 , observamos presença de fragmentos metilados dos tipos $C5^mCGG > 5^mCCGG$.

Em relação ao tempo de 72h, na concentração C_1 observamos nas amostras 65C e 68C fragmentos metilados do tipo $C5^mCGG$, para as amostras 65M, 68M, 72C e 72M observamos fragmentos $C5^mCGG > 5^mCCGG$. Na concentração C_2 , todas as amostras evidenciaram perfil de metilação com fragmentos do tipo $C5^mCGG > 5^mCCGG$.

Para o tempo de 96h, na concentração C_1 observamos um padrão de metilação do tipo 5^mC5^mCGG , enquanto para C_2 observamos um padrão semelhante ao encontrado para o tempo 72h- C_2 , em que todas as amostras apresentaram um perfil de metilação do tipo $C5^mCGG > 5^mCCGG$.

Na Figura 6 (A, B, C e D), que corresponde ao padrão de metilação do gene da acetilcolinesterase, observamos fragmentos com bandas de igual intensidade em todas as amostras, o que significa que para essa região gênica que corresponde a apenas 400 pb, o padrão de metilação foi de 5^mC5^mCGG , ou seja, as amostras estavam hipermetiladas ou o que é mais provável a inexistência de sítios de clivagem na região amplificada, como mostra o mapa de restrição da acetilcolinesterase (em B) na Figura 7.

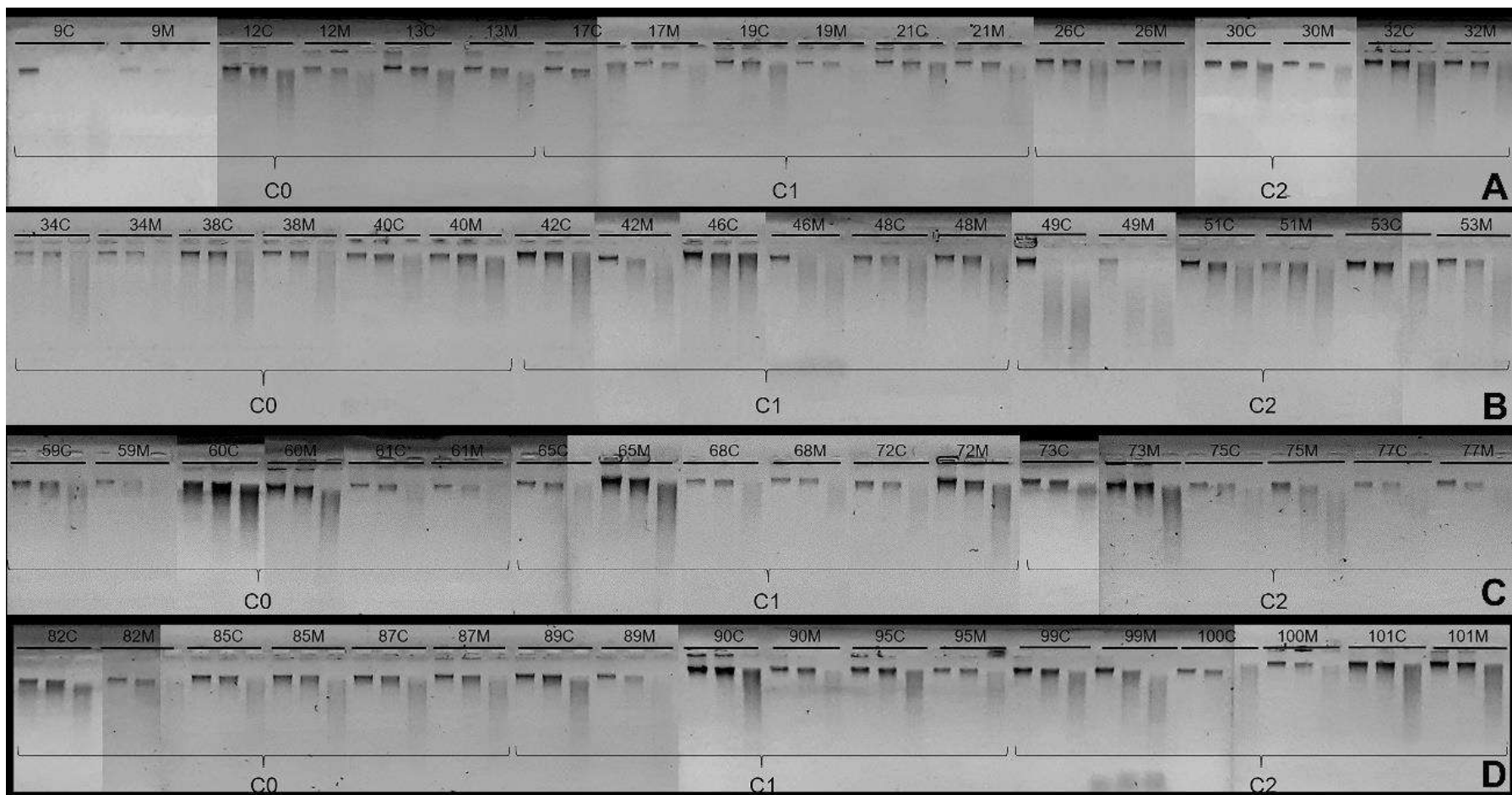


Figura 4. Digestão enzimática das amostras de tambaqui (*Colossoma macropomum*) nos tecidos de cérebro (C) e músculo (M). A: tempo de exposição ao Triclorfon de 24h, B: tempo de exposição de 48h, C: tempo de exposição de 72h, D: tempo de exposição de 96h. C₀: concentração 0, C₁: concentração 1 corresponde a 30% da CL50-96h de Triclorfon diluído na água (0,261 mg/L), C₂: corresponde a 50% da CL50-96h de Triclorfon diluído na água (0,435 mg/L).

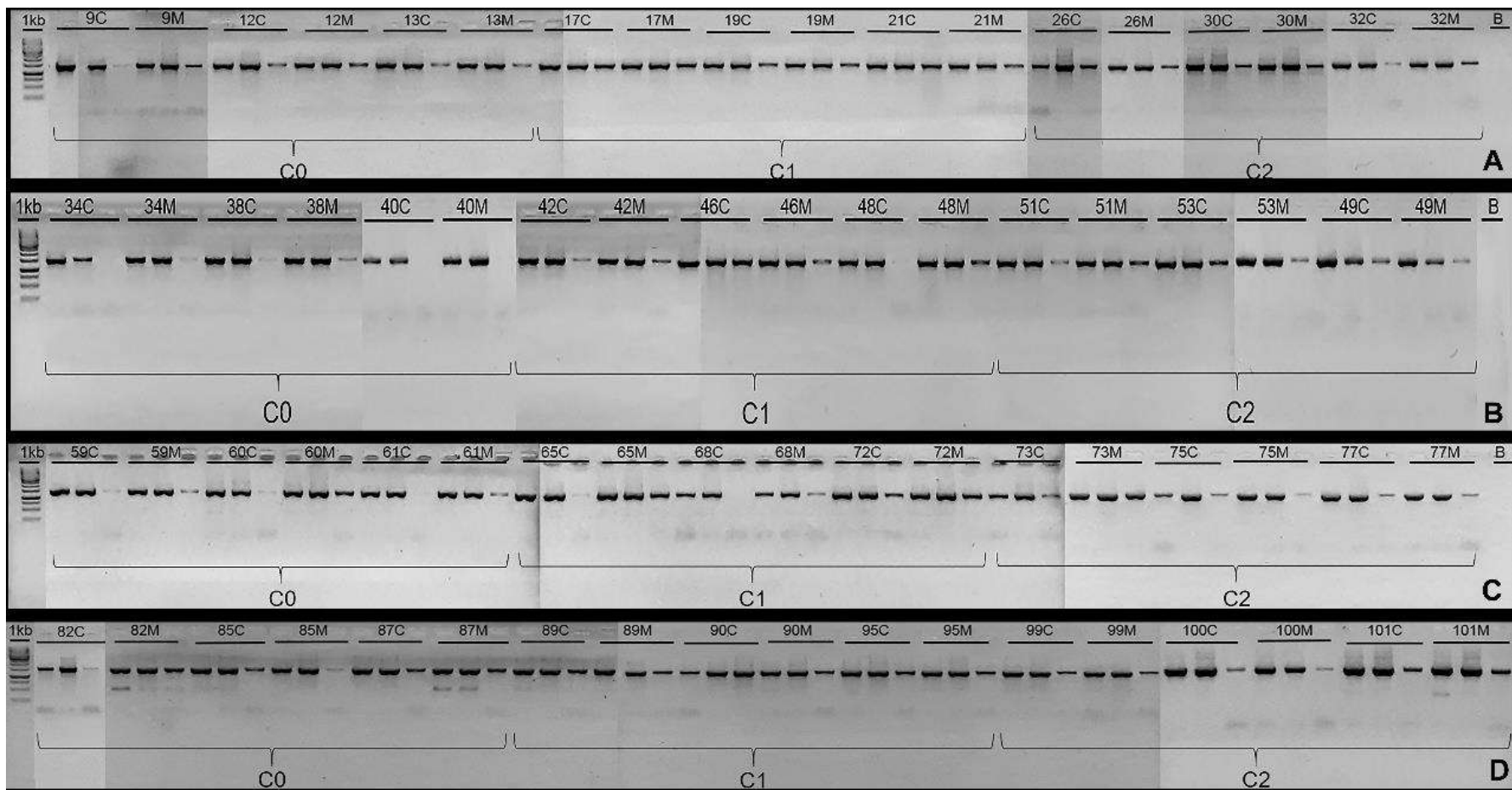


Figura 5. Perfil de metilação do gene seqüência de DNA ribossomal 18S (18s rDNA). A, B, C e D são os respectivos tempos utilizados no experimento 24h, 48h, 72h e 96h. Dois tecidos de um indivíduo de tambaqui (*Colossoma macropomum*) foram pesquisados, sendo o cérebro (C) e o músculo (M). C₀: concentração 0; C₁: concentração 1 corresponde à 30% da CL50-96h de Triclorfon diluído na água (0,261 mg/L), C₂: concentração 2 corresponde à 50% da CL50-96h de Triclorfon diluído na água (0,435 mg/L). 1Kb: marcador de massa molecular.

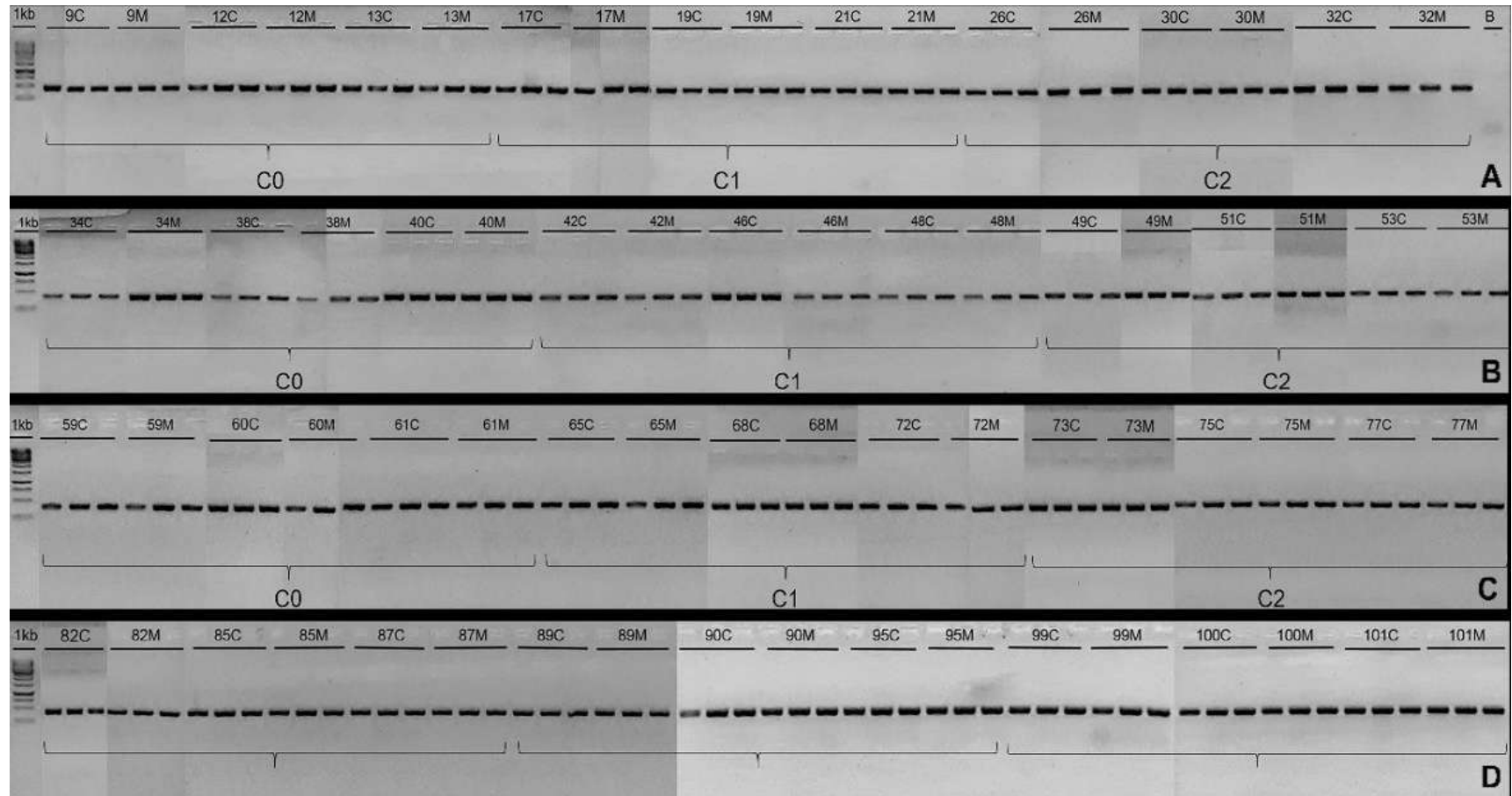


Figura 6. Perfil de metilação do gene da acetilcolinesterase (AChE). A, B, C e D são os respectivos tempos utilizados no experimento 24h, 48h, 72h e 96h. Dois tecidos de um indivíduo de tambaqui (*Colossoma macropomum*) foram pesquisados, sendo o cérebro (C) e o músculo (M). 1Kb: marcador de massa molecular. C0: concentração 0; C1: concentração 1 corresponde à 30% da CL50-96h de Triclorfon diluído na água (0,261mg/L), C2: concentração 2 corresponde à 50% da CL50-96h de Triclorfon diluído na água (0,435 mg/L).

GGTCAACGGTGCGCCCTTCGCGGGCGGGCAGCTCTCATTCAAATGTCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTACTATAGG
 TGCCCTACCATGGTGACCACGGGTAACGGGGAATCAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAAACGGCTACCA
 CATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATACCCATTACCGACACGGTGAGGTAGTGACGAAAAATAACGATACA
 GGTCTCTTTCGAGGCCCTGTAATCGGAATGAGCGTATCCTAAACCCATGGGTGAGGACCCATTGGAGGGCAAGTC
 TGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGCTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTG
 GATTCGGGAGTGGGCTGGCTGTCCGCCGCGAGGCGAGCCACCGCCTGTCCAGACSMYGCMKASRRCKCCYY
 YGGWTGSYSTYKYYSGSWGTCSRCSASRGKGTCCGGARGTYKTTTACTTWGAAAAAATAGAGAGTTGTCA
 AAAGCGGGCCCATCCYTCCACGSCTGAAATACSTGAGCTAGGAATAATGGAATAGGACTCCGGTTCTATTTTCGT
 GGGTTTCCTGAACCAGGGCCCATGATTAAGAGGGACGGCCCGGGGGCATTTCGTATTGCGCCGCTAGAGGTGAAAT
 TCTTGAACCGGCGCAAGACGGACGAAAGCGAAAGCATTGCAAGAATGTTTTATTAAATCAAGAACGAAAGTCG
 GAGGTTCAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTTCCGACCGTAAACTATGCCGACCCGCGATCCGGCGGCGTTATT
 CCCATGACCCGCGGGCAGCGTGCGGGAAACCACGAGTCTTTGGGTTCCGGGGGAGTATGGTTGCAAAGCTGAA
 ACTTAAAGGAAATTGACGGAAGGGCACCACAGGAGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGSCTC
 ACCCGGCCCGGACACGAAAAGGATTGACAGATTGATAGCTTTTTCGATTCTGTGGTGGTGGTGAATGGC
 CGTTCTTAGTTGGTGGAGCGATTTGTCTGGTTAATCCGATAACGAACGAGACTCCCTCATGCTAAATAGTTACG
 CGGCCCCCGTGGTGGCGTCCAACCTTCTTAGAGGGACAAAGTGGCGTTCCAGCCCCACGAGATGGAGCAATAAC
 AGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTCCGGGCGTGCACGCGCCACAATGGTTGGATCAGCGTGTTCCTACCCTACG
 CCGACCAGGCGGGTAATCCGCTGAACCCATTCTGTGATTGGGATTGGGATTGCAATATTTCCCATGAACGA
 GGAATTCAGTAAGCGGGTCATAAGCTCGCATTGATTAAGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGCGCTC
 TAG

A

GTATTTCCCAGGTTCTTTTGTGACTGGGCATACRRYYWTGYRMAGTACTGCAGAGGACAGACCACATTGTGAT
 CTCCTACAAATGTCATCCATGGCTTACGGTCTTTCACAGGGTTTTCTCATCCATCCAGTCTGTGTACTGGAGA
 ATGACTGCCTCCAATCCAATCTCATTGGCATGAGGAACACTCATCTTACGCCTTCCAGGAAGTCTCCCTTGGAG
 ATCAGGCTTTCATTGTCTTACTGAAACCTGGTKACCATAAAATCAAGAAAAWGACCCWTCATTCTGKTTTACA
 MCCAGAAGRWTWTGAGTGTTCYTRAAKTTGCCYTCGYTAAGCATGSMAYCARRWKTCTMTKGGAGSASMACACC
 ATCCACAACAGGCACAAAGGATAAAGCGGAAAA

B

Figura 7. Mapa de restrição dos genes 18S rDNA e acetilcolinesterase (AChE) de Tabaqui sequenciados. Em A observam-se 11 sítios de restrição CCGG passíveis de corte pelas enzimas *HpaII* e *MspI*. Em B mapa de restrição da enzima acetilcolinesterase, ausente de palíndromos CCGG.

5. DISCUSSÃO

As enzimas *HpaII* e *MspI* embora reconheçam o mesmo sítio de restrição possuem sensibilidades de cortes diferentes (Zilberman e Henikoff, 2007; Salmon et al., 2008; Da Silva et al., 2019). Devido ao padrão diferencial de cortes das enzimas, as digestões produzidas por cada uma delas também é diferente. Por isso, para o genoma de tabaqui, era esperada uma digestão mais eficiente pela enzima *MspI*, pois a frequência de palíndromos do tipo C^{5m}CGG é maior no genoma e, portanto, esses fragmentos são mais clivados resultando num padrão contínuo visualizado com um rastro no gel (Figura 4).

De acordo com Fulneček and Kovařík (2014), a técnica MS-PCR é um método confiável, barato e simples para a identificação de regiões genômicas com mudanças na metilação de citosinas produzidas por estímulos ambientais e desenvolvimentais. Ainda, segundo esses mesmos autores, nos genomas de plantas o padrão de metilação segue a seguinte ordem, C^{5m}CGG > ^{5m}C^{5m}CGG > ^{5m}CCGG e embora não tenhamos informações sobre essa frequência em genomas de animais, nesse estudo assumimos a premissa de que essa ordem era semelhante para o genoma do tabaqui.

Muitos estudos tem mostrado que os padrões de metilação do DNA podem ser alterados por fatores extrínsecos como por interação com substâncias químicas (Collotta et al.; 2013, Florea 2013; Kamstra et al., 2015). Os processos epigenéticos em peixes estabelecem um padrão de metilação do DNA que são sensíveis à agentes estressantes, como descrito por Kamstra et al. (2015) usando como modelo experimental o zebrafish (*Danio rerio*), para estudos epigenéticos e ecotoxicológicos

O gene rRNA 18S aparece em diversas cópias pelo genoma e metade delas são inativadas por metilação (Bacalini et al., 2014; Da Silva et al., 2019). Esse gene apresenta muitos sítios CCGG o que o caracteriza como um bom marcador para estudos sobre metilação do DNA (Figura 7). Por isso embora as amostras controle tenham demonstrado algum nível de metilação, esse resultado era esperado pois podem representar as cópias normalmente metiladas pelas vias epigenéticas convencionais (Bacalini et al., 2014; Da Silva et al. 2019). Já para o gene da acetilcolinesterase (AChE), cujo fragmento gerado foi de 401 pb, não foi possível detectar sítios de CCGG para o corte e acreditamos que esse pequeno tamanho e

ausência de sítios tenha afetado o resultado das enzimas da análise nesse marcador.

Mesmo sendo observado um perfil de metilação na concentração C_0 do experimento (controle) nos tempos de 24h, 48h, 72h e 96h; nas amostras provenientes das concentrações C_1 e C_2 do experimento nesses mesmos tempos, foi possível detectar aumento da metilação no gene 18S rDNA, principalmente para os tempos de 72h e 96h. Esse resultado pode ser explicado pelo processo de metilação nessa região já que o gene 18S rRNA de tabaqui pode estar associado com elementos transponíveis que são alvos de metilação. Essa hipótese é reforçada pelos estudos desenvolvidos por (Da Silva *et al.* 2019) em *Hoplosternum littorale*, que observou co-localização de elementos retrotransponíveis Rex3 e 18S rDNA, nessa espécie. Outra possibilidade é que as regiões de 18S rRNA são características regiões de heterocromatina as quais são passíveis de metilação. Além disso a técnica utilizada pode ser preferencial por regiões heterocromáticas onde a metilação de citosina está concentrada (Salmon *et al.* 2008). Ainda segundo Burt e Trivers (2006), alguns elementos transponíveis como o LINE *R1* de *Drosophila melanogaster* possui sítio específico de inserção no genoma dessa espécie e é caracteristicamente inserido nos genes 28S rRNA. Qualquer inserção torna o gene rDNA não funcional, e os hospedeiros só podem persistir porque normalmente existem centenas de cópias do gene rDNA por indivíduo, apenas uma fração das quais são interrompidas (na maioria das espécies, 5-20%, em algumas espécies até 50%, segundo Eickbush (2002)).

O resultado de aumento de metilação nos tempos de 72h e 96h após a exposição do tabaqui às concentrações C_1 e C_2 , é compatível com os resultados obtidos por Costa (2019) também em tabaqui onde foi observado um aumento expressivo de elementos retrotransponíveis Rex3 no genoma dessa espécie, após exposição de concentrações subletais de Triclorfon diluído na água. Esse aumento de metilação pode estar diretamente associado à inativação desses elementos associados ao gene 18S rDNA. Essa é uma hipótese a ser averiguada em estudos posteriores. Entretanto em nosso estudo não verificamos diferenças detectáveis no perfil de metilação entre os tecidos de cérebro e músculo. A atividade enzimática da AChE em cérebro, músculo e intestino de tabaqui, segundo Duncan *et al.* (2020)

parece estar inibida em mais de 90%. Portanto encontrar padrões de metilação similares no gene 18S rRNA para esses tecidos parece ser um resultado verossímil.

Em suma, ressalta-se que a metilação do DNA possui um papel central no controle epigenético do genoma e na expressão gênica e variações no perfil de metilação podem gerar fenótipos variantes os quais podem ser alvos de seleção. Por essa razão e, em virtude do seu papel na geração de doenças, é importante explorar as consequências da metilação sobre a diversidade de espécies e sua evolução (Salmon *et al.*, 2008; Best *et al.*, 2018).

6. CONCLUSÃO

O gene 18S rDNA pode ser considerado um biomarcador para detecção dos perfis de metilação no genoma de eucariotos, pois nossas análises mostraram que houve sensibilidade ao Triclorfon e um aumento de sítios metilados nos tempos de 72h e 96h, utilizando concentração 30% e 50% da CL₅₀-96h para tabaqui. Para a sequência de AChE analisada não houve diferença no perfil de metilação após exposição ao triclorofon.

7. REFERÊNCIAS

- De Aguiar, L.H.; Moraes, G.; Avilez, I.M.; Altran, A.E.; Corrêa, C.F. 2004. Metabolical effects of Folidol 600 on the neotropical freshwater fish matrinxã, *Brycon cephalus*. *Environmental Research* 95: 224–230.
- Antonio Moreira da Silva, J.; Pereira Filho, M.; Inês de Oliveira-Pereira, M. 2003. *Frutos e Sementes Consumidos pelo Tambaqui, Colossoma macropomum (Cuvier, 1818) Incorporados em Rações. Digestibilidade e Velocidade de Trânsito pelo Trato Gastrointestinal* 1. Vol. 32.1815-1824p.
- Bacalini, M.G.; Pacilli, A.; Giuliani, C.; Penzo, M.; Treré, D.; Pirazzini, C.; et al. 2014. The nucleolar size is associated to the methylation status of ribosomal DNA in breast carcinomas. *BMC Cancer* 14: 1–11.
- Best, C.; Ikert, H.; Kostyniuk, D.J.; Craig, P.M.; Navarro-Martin, L.; Marandel, L.; et al. 2018. Epigenetics in teleost fish: From molecular mechanisms to physiological phenotypes. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology* 224: 210–244.
- Bird, A. 2007. Perceptions of epigenetics. *Nature* 447: 396–398.
- Brasil. 2013. *Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)*. Reavaliação Toxicológica do Ingrediente Ativo Triclorfom. (<http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117839/Nota%2Bt%25C3%25A9cnica.pdf/f8b7cecc-95da-47ff-b3fc-6d775cef12cd?version=1.0>). Accessed on 12 Sep. 2018.
- Cazenave, J.; Bacchetta, C.; Rossi, A.; Ale, A.; Campana, M.; Parma, M.J. 2014. Deleterious effects of wastewater on the health status of fish: A field caging study. *Ecological Indicators* 38: 104–112.
- C. H. Waddington, The Epigenotype, *International Journal of Epidemiology*, Volume 41, Issue 1, February 2012, Pages 10–13, <https://doi.org/10.1093/ije/dyr184>
- Collotta, M.; Bertazzi, P.A.; Bollati, V. 2013. Epigenetics and pesticides. *Toxicology* 307: 7.
- CONAMA. 1986. RESOLUÇÃO CONAMA Nº 20, de 18 de junho de 1986. *Diário Oficial da União*: 1–13.
- Costa, M. dos S. 2019. *Mapeamento Cromossômico de Elementos Retrotransponíveis Rex1, Rex3 e Rex6 e Expostos ao Antiparasitário Triclorfon*. 40p.
- DIAS, M.K.R.; NEVES, L.R.; MARINHO, R. das G.B.; PINHEIRO, D.A.; TAVARES-DIAS, M. 2015. Parasitismo em tambatinga (*Colossoma macropomum* x *Piaractus brachypomus*, Characidae) cultivados na Amazônia, Brasil. *Acta Amazonica* 45: 231–238.
- Duncan, W.P.; Idalino, J.J.S.; da Silva, A.G.; Moda, R.F.; da Silva, H.C.M.; Matoso,

- D.A.; et al. 2020. Acute toxicity of the pesticide trichlorfon and inhibition of acetylcholinesterase in *Colossoma macropomum* (Characiformes: Serrasalminidae). *Aquaculture International* 28: 815–830.
- EMBRAPA. 2020. *Pesca e Aquicultura*. Portal EMBRAPA. (<https://www.embrapa.br/tema-pesca-e-aquicultura/nota-tecnica>). Accessed on 17 Nov. 2020.
- Florea, A.M. 2013. DNA methylation pyrosequencing assay is applicable for the assessment of epigenetic active environmental or clinical relevant chemicals. *BioMed Research International* 2013: 10.
- Fulneček, J.; Kovařík, A. 2014. How to interpret Methylation Sensitive Amplified Polymorphism (MSAP) profiles? *BMC Genetics* 15.
- Ghasemzadeh, J.; Sinaei, M.; Bolouki, M. 2015. Biochemical and histological changes in fish, spotted scat (*Scatophagus argus*) exposed to diazinon. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 94: 164–170.
- Godoi, M.M.I. de M.; Engracia, V.; Lizama, M. de L.A.P.; Takemoto, R.M. 2012. Parasite-host relationship between the tambaqui (*Colossoma macropomum* Cuvier 1818) and ectoparasites, collected from fish farms in the city of Rolim de Moura, State of Rondônia, Western Amazon, Brazil. *Acta Amazonica* 42: 515–524.
- Goldberg, A.D.; Allis, C.D.; Bernstein, E. 2007. Epigenetics: A Landscape Takes Shape. *Cell* 128: 635–638.
- Gonçalves, A.A. 2017. *Legislação Brasileira para pescado e produtos da pesca e aquicultura - Aquaculture Brasil*. Aquaculture Brasil. (<http://www.aquaculturebrasil.com/2017/07/31/legislacao-brasileira-para-pescado-e-produtos-da-pesca-e-aquicultura/>). Accessed on 16 Sep. 2018.
- Ismiño-Orbe, R.A.; Araujo-Lima, C.A.R.M.; De Carvalho Gomes, L. 2003. Excreção de amônia por tambaqui (*Colossoma macropomum*) de acordo com variações na temperatura da água e massa do peixe. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 38: 1243–1247.
- Izel, A.C.U.; Melo, L.A.S. 2004. Criação de tambaqui (*Colossoma macropomum*) em tanques escavados no Estado do Amazonas. : 20.
- Kamstra, J.H.; Aleström, P.; Kooter, J.M.; Legler, J. 2015. Zebrafish as a model to study the role of DNA methylation in environmental toxicology. *Environmental Science and Pollution Research* 22: 15.
- Kayhan, F.E.; Kaymak, G.; Yön, N.D. 2013. Insecticide Groups and Their Effects in Aquatic Environment. *Fen Bilimleri Dergisi* 25: 167–183.
- Kerambrun, E.; Sanchez, W.; Henry, F.; Amara, R. 2011. Are biochemical biomarker responses related to physiological performance of juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) caged in a polluted

- harbour? *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 154: 187–195.
- Krieger, R. (ed.). *Handbook of Pesticide Toxicology*. Volume 1, 2nd ed. 2001. Academic Press, San Diego, California., p. 56
- Kubitza, F. 2015. Aquicultura no Brasil: Conquistas e Desafios. *Panorama da Aquicultura*: 12.
- Kucharski, R.; Maleszka, J.; Foret, S.; Maleszka, R. 2008. Nutritional control of reproductive status in honeybees via DNA methylation. *Science* 319: 1827–1830.
- Lucchesi, J.C. 2019. *Epigenetics, Nuclear Organization & Gene Function: with implications of epigenetics regulation and genetic architecture for human development and health*. 1st ed. New York, .
- Melo, L.A.S.; Izel, A.C.U.; Rodrigues, F.M. 2001. Criação de Tambaqui (*Colossoma macropomum*) em Viveiros de Argila/ Barragens no Estado do Amazonas. *Embrapa Amazônia Ocidental*: 30.
- Mirbahai, L.; Chipman, J.K. 2014. Epigenetic memory of environmental organisms: A reflection of lifetime stressor exposures. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 764–765: 10–17.
- Nakauth, A.C.S.; Nakauth, R.F.; Nóvoa, N.A.C.B. 2015. CARACTERIZAÇÃO DA PISCICULTURA NO MUNICÍPIO DE TABATINGA-AM. *REVISTA DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO IFAM* CARACTERIZAÇÃO 9: 11.
- Oliveira, A.M. De; Paula, M.D.N.; Almeida-Val, V.M.F. De; Val, A.L. 2012. Caracterização da atividade de piscicultura nas mesoregiões do estado do Amazonas, Amazônia Brasileira. *Revista Colombiana de Ciência Animal* 4: 154–162.
- Pohanka M et al. 2011. *Toxicol Mech Methods* 21 (8): 585-90.
- Pedroza-Filho, M.X.; Rodrigues, A.P.O.; Rezende, F.P. 2016. Dinâmica da produção de tambaqui e demais peixes redondos no Brasil. *CNA Brasil: Ativos Aquicultura* 2: 5.
- Peixe-BR. 2020. *Anuário Peixe Br da Piscicultura 2020*. Associação Brasileira de Piscicultura. .
- 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. .
- Rodrigues, A.P.O. 2014. Nutrição e alimentação do tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Boletim do Instituto de Pesca* 40: 135–145.
- Salmon, A.; Clotault, J.; Jenczewski, E.; Chable, V.; Manzaneres-Dauleux, M.J. 2008. *Brassica oleracea* displays a high level of DNA methylation polymorphism. *Plant Science* 174: 61–70.

- Salomão, S. 2019. Tilápia leva piscicultura brasileira a R \$ 5 bilhões de faturamento. *Globo Rural*: 1–6.
- Santos, M. da C.F.; Hrbek, T.; Farias, I.P. 2018. Multiloci approach to understand the historical and contemporary genetic connectivity of the keystone floodplain species *Colossoma macropomum* (Teleostei: Characiformes) in the Amazon basin. *Frontiers in Genetics* 9: 263.
- Schulter, E.P.; Vieira Filho, J.E.R. 2017. Evolução Da Piscicultura No Brasil: Diagnóstico E Desenvolvimento Da Cadeia Produtiva De Tilápia. *Instituto de pesquisa Econômica Aplicada - ipea*: 35.
- Silva, A.G. 2014. *Viabilidade Econômica da Produção de Tambaqui (Colossoma macropomum, Cuvier, 1818) em Presidente Médice, RO*. Presidente Médici, 55p.
- Da Silva, F.A.; Feldberg, E.; Goll, L.G.; Carvalho-Zilse, G.A.; Gross, M.C.; Schneider, C.H.; et al. 2019. An HpaII/MspI-PCR assay to measure methylation of DNA in *Hoplosternum littorale* (Callichthyidae, Siluriformes) from a polluted environment in the central Amazon basin. *Environmental Technology and Innovation* 14: 100354.
- SILVA, F.N.L. da; OLIVEIRA, L.C. de; MANGAS, T.P.; SANTOS, A.S. dos; SILVA, F.R.S.; SANTOS, R.A. dos. 2017. *Cenário Atual da Atividade Aquícola Familiar em Comunidades no Município de Breves, Ilha do Marajó, Pará, Brasil*. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará, Breves, 13p.
- Da Silva, H.C.M.; da Silva, A.G.; Idalino, J.J.S.; de Sousa, F.B.; Gomes, A.L.S.; Duncan, W.P.; et al. 2020. Trichlorfon acute lethal toxicity to juvenile tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Aquaculture Research* 51: 863–866.
- SILVA, M.R. Da; Campos, A.C.E. De; Bohm, F.Z. 2013. Agrotóxicos e seus impactos sobre ecossistemas aquáticos continentais. *SaBios-Revista de Saúde e Biologia* 8: 46–58.
- SUFRAMA, 2003. 2003. Estudo de viabilidade Econômica-Piscicultura. : 21.
- 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.
- Zilberman, D.; Henikoff, S. 2007. Genome-wide analysis of DNA methylation patterns. *Development (Cambridge, England)* 134: 3959–3965.