

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PARANÁ, *CAMPUS* DE UNIÃO DA VITÓRIA
COLEGIADO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

MARINA SOARES RIBAS

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO ELEMENTO TRANSPONÍVEL LINE-2 NO
GENOMA DE *Apareiodon* sp. (CHARACIFORMES: PARODONTIDAE)

UNIÃO DA VITÓRIA

2021

MARINA SOARES RIBAS

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO ELEMENTO TRANSPONÍVEL LINE-2 NO
GENOMA DE *Apareiodon* sp. (CHARACIFORMES: PARODONTIDAE)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao colegiado de Ciências Biológicas, Centro de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Estadual do Paraná, *Campus* de União da Vitória, como requisito parcial à obtenção de título de licenciada em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Barbosa de Fontes
Coorientadora: Profa. Dra. Viviane Demétrio do Nascimento

UNIÃO DA VITÓRIA

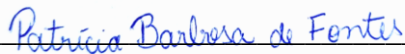
2021


TERMO DE APROVAÇÃO

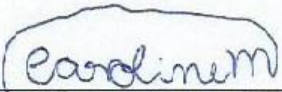
MARINA SOARES RIBAS

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO ELEMENTO TRANSPONÍVEL LINE-2 NO GENOMA DE *Apareiodon* sp. (CHARACIFORMES: PARODONTIDAE)

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado com nota 9,9, como requisito parcial à obtenção do grau de licenciado (a) em Ciências Biológicas, Colegiado de Ciências Biológicas, Universidade Estadual do Paraná, *Campus* de União da Vitória, pela seguinte banca examinadora:


Orientadora Profa. Dra. Patrícia Barbosa de Fontes
Colegiado de Ciências Biológicas, UNESPAR


Prof. Dr. Rafael Bueno Noletto
Colegiado de Ciências Biológicas, UNESPAR


Prof. Dra. Caroline Regina Dias Machado
Universidade Federal do Paraná, UFPR

UNIÃO DA VITÓRIA, 08 DE DEZEMBRO DE 2021

Dedicado aos meus amados pais, por me ensinarem o melhor da vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar sempre em direção às escolhas certas, por me iluminar com muita fé, coragem e perseverança ao longo desta caminhada, que está apenas começando!

Ao meu anjo, meu amado pai, seu amor, paciência e carinho foram essenciais na escolha que fiz há 4 anos. Obrigada, pai, por sempre me incentivar à buscar o conhecimento e admirar a beleza que é ensinar! Obrigada por ter mostrado a minha vocação! Espero que esteja feliz e orgulhoso, com aquele sorriso que sinto tanta falta! Te amo, pra sempre!

À minha amada mãe, obrigada por acreditar tanto em mim e me incentivar a perseguir meus sonhos! Obrigada por sempre estar presente, me aconselhar, cuidar de mim, me ajudar e me ensinar tanto (apesar de eu saber que acha o contrário)! Espero poder te orgulhar cada dia mais e te ver muito feliz! Te amo, pra sempre!

À minha irmã Pâmela e meu cunhado Fernando, por sempre me incentivarem a continuar, comemorarem as vitórias e caminharem ao meu lado ao longo da jornada, amo vocês! À minha irmã Betina, por todos os dias me mostrar a vida de um jeito mais leve, simples e único, amo dividir meus dias com você! Obrigada por celebrar, fazer planos e estar sempre comigo. Te amo!!

À minha orientadora, Prof^a Patrícia, por tudo o que transformou em minha vida! Me ensinou muito além de conhecimentos acadêmicos, me apresentou minha paixão, me incentivou e acreditou tanto em mim! À minha orientadora, Prof^a Viviane, por todo o auxílio, por todas as oportunidades, pela confiança, paciência, incentivo e parceria! Ambas são extremamente importantes para mim, sempre as levarei comigo!

Ao meu namorado, Felipe, por me dar todo o suporte necessário ao longo desse tempo! Fazer essa pesquisa sem sua ajuda teria sido muito mais difícil! Obrigada por toda a paciência, carinho, por nunca me deixar abater e sempre acreditar em mim, obrigada por caminhar ao meu lado e por ter me salvado em vários momentos desta pesquisa. Te amo!

Aos meus melhores amigos Hayla, Dalton e José, por vibrarem a cada conquista minha, me apoiarem em todos os momentos que precisei de amparo e sempre acreditarem em mim! Estar com vocês é uma bênção em minha vida. Meus irmãos de coração, amo vocês!

Aos meus amigos e companheiros de graduação, Suzana, Roger e Jéssika, obrigada pelo apoio, gatas! Vocês deixaram os momentos de nervosismo e apreensão mais leves e cheios de motivos para risadas!

Por fim, obrigada a todos os professores do colegiado de Ciências Biológicas, levarei sempre comigo seus ensinamentos e memória do curso que vive em meu coração!

*Não é na ciência que está a felicidade, mas na aquisição da ciência
(Edgar Allan Poe)*

RESUMO

O genoma, apresenta em sua constituição uma parcela de DNA repetitivo, o qual possui longas sequências repetitivas de bases nitrogenadas, que podem ser encontradas *in tandem* ou dispersas pelo genoma das espécies. Dentre as sequências dispersas, encontram-se os elementos transponíveis, sequências que possuem a habilidade de mover-se pelo genoma, e que correspondem a importantes fatores no que diz respeito às mutações e evolução genômica. Através de sequenciamentos em larga escala, é possível determinar tais regiões repetitivas no genoma, e também explorá-las com maior eficiência, a fim de entender a sua composição e como influenciam na evolução dos organismos através da transposição. A bioinformática é o campo da Ciência que estuda, também, estas grandes quantidades de materiais genéticos, e relaciona o uso de softwares e ferramentas tecnológicas com as informações biológicas, a fim de alcançar maior entendimento dos processos que ocorrem ao longo da história dos organismos. Portanto, o presente estudo possui como objetivo identificar e caracterizar o elemento transponível LINE-2 presente no genoma de *Apareiodon* sp., a fim de determinar a atividade no material genético analisado. O material utilizado para análise corresponde à uma amostra de coleta previamente realizada e depositada em laboratório, na Universidade Estadual de Ponta Grossa, a partir do qual, as sequências de LINE-2 foram isoladas e analisadas a integridade de seus domínios proteicos. Esta análise deu-se através da construção de uma biblioteca personalizada para o transponível e, a partir disto, as sequências correspondentes foram submetidas à análise HMMER a fim de verificar a integridade de seus domínios. Através da realização do estudo, foi possível concluir que o elemento LINE-2 encontra-se degenerado no genoma de *Apareiodon* sp., tanto para fêmea quanto para macho, de modo que os resultados encontrados se mostraram iguais para ambos os sexos. A partir disso, estima-se que o transponível esteja passando por um processo de extinção, como já observado em outras espécies.

Palavras-chave: DNA repetitivo. Domínio. Retrotransposon. Gene.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Classificação dos Elementos Transponíveis.	15
Figura 2 - Estrutura molecular das ORFs de LINE-2.....	16
Figura 3 - Representante do gênero <i>Apareiodon</i> .	19
Figura 4 - Amostra da tradução das sequências de LINE-2 pertencentes ao macho.	22
Figura 5 - Amostra da tradução das sequências de LINE-2 pertencente à fêmea	23
Figura 6 - Anotação do domínio íntegro de transcriptase reversa em macho de <i>Apareiodon</i> sp.	25
Figura 7 - Anotação do domínio íntegro de transcriptase reversa em fêmea de <i>Apareiodon</i> sp.	25
Figura 8 - Alinhamento MUSCLE das sequências de Transcriptase Reversa presentes em indivíduos macho e fêmea de <i>Apareiodon</i> sp.	26
Tabela 1 - Compilação dos resultados obtidos através da análise PFAM das sequências de macho e fêmea	24

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CDA – Citidinas deaminases
cDNA – DNA complementar
DIRs – Elemento transponível Dictyostelium
EN – Enzima endonuclease
FISH – Hibridização *in situ* fluorescente
L1 – Elemento transponível LINE-1
L2 – Elemento transponível LINE-2
LINE – Elementos nucleares intercalados longos
LTR – Longa região terminal
MIRs – Repetições intercaladas de mamíferos
ORF – Fase aberta de leitura
Pb – Pares de base
piRNA – *Piwi-Interacting RNA*
PLE – Retrotransposon tipo Penélope
Pol III – DNA polimerase III
RTs – Elementos retrotransposons
satDNA – DNA satélite
SINEs – Elementos nucleares intercalados curtos
SSRs – Repetição de sequências simples
STRs – Repetições *in tandem* curtas
TEs – Elementos transponíveis
TIRs – Regiões invertidas terminais
TPRT – Transcrição Reversa Iniciada por Alvo
TR – Enzima transcriptase reversa

SUMÁRIO

1INTRODUÇÃO	10
2OBJETIVOS	12
2.1 OBJETIVO GERAL	12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1. DNA REPETITIVO	13
3.2. ELEMENTOS TRANSPONÍVEIS (TEs)	14
3.2.1 Classe I – retrotransposons	16
3.2.1.1 Retrotransposons LINEs	17
3.3. GÊNERO <i>Apareiodon</i>	19
4METODOLOGIA	21
4.1. TIPO DE PESQUISA	21
4.2. ÁREA DE ABRANGÊNCIA	21
4.3. AMOSTRA	21
4.4. SELEÇÃO DAS SEQUÊNCIAS LINE-2 E ANÁLISE DE DADOS	22
5RESULTADOS	24
6DISCUSSÃO	27
7CONSIDERAÇÕES FINAIS	31
REFERÊNCIAS	32

1 INTRODUÇÃO

O DNA contém as instruções para que um organismo sintetize todas as moléculas necessárias, desde moléculas de RNA até proteínas, sendo a totalidade de informação genética pertencente a uma espécie é chamada genoma (KIDWELL; LISCH, 2001; LÓPEZ-FLORES; GARRIDO-RAMOS, 2012). Nos organismos eucariontes, o genoma é constituído por sequências codificadoras, chamadas éxons, e sequências não codificadoras que são intercalantes, chamadas íntrons, de modo que estas primeiras compreendem uma fração muito pequena, e a maior parte do material genético é representado por elementos repetitivos, os quais despertam interesse quanto a estrutura, função e localização genômica (HAWKINS, 1988). A parcela de elementos repetitivos observada, abriga tanto sequências organizadas *in tandem*, quanto segmentos móveis dispersos pelo genoma, que se inseriram e multiplicaram durante a evolução (KIDWELL; LISCH, 2001; LÓPEZ-FLORES; GARRIDO-RAMOS, 2012). Os elementos genéticos móveis, ou elementos transponíveis (TEs), também são conhecidos como “genes saltadores” ou “DNA egoísta” devido ao seu comportamento como parasitas moleculares, uma vez que as células não conseguem se livrar deles (KIDWELL; LISCH, 2001; LÓPEZ-FLORES; GARRIDO-RAMOS, 2012; ARKHIPOVA, 2017).

Os TEs foram descobertos por Barbara McClintok em 1940 em grãos de milho, de maneira que, nessas sequências a ordem das bases nitrogenadas do DNA se repete várias vezes, tratando-se de um tipo de RNA repetitivo (PHILIPPSEN, 2014). Além disso, essas sequências são capazes de mover-se de um local para outro no genoma, de modo que tal movimentação desempenha um importante papel na estrutura, função e estabilidade genômica, sendo considerado uma das principais causas de variações genéticas em eucariotos (KIDWELL; LISCH, 2001; ROUZIC; BOUTIN; CAPY, 2007; LÓPEZ-FLORES; GARRIDO-RAMOS, 2012).

As principais consequências da movimentação e ampliação de TEs no genoma são as mutações, rearranjos cromossômicos, modificação da regulação de genes e o deslocamento de éxon (CHARLESWORTH; SNIEGOWSKI; STEPHAN, 1994; CLARO, 2013). Além disso, podem ser cooptadas pelo genoma do hospedeiro, em um processo chamado exaptação, adquirindo novas funções potencialmente benéficas, que podem ocasionar: origem de novas sequências reguladoras; novos sítios de *splice*, (regiões intercalares entre éxons e íntrons) e poliadenilação; micro RNAs; novos genes, entre outros (FESCHOTTE, 2008). No entanto, devido aos seus efeitos no genoma hospedeiro, a maioria das sequências é inativada ou silenciada por mutação ou mecanismos epigenéticos (KIDWELL; LISCH, 2001;

KOBAYASHI; GOTO-YAMAMOTO; HIROCHIKA, 2004; JIANG et al., 2004; MORGANTE et al., 2005; BEJERANO et al., 2006; VOLFF, 2006; RIGAL; MATHIEU, 2011; BUCHER; REINDERS; MIROUZE, 2012; BUTELLI et al., 2012; REBOLLO et al., 2012).

A importância de investigar os TEs nos genomas, principalmente os retrotransposons, se deve ao fato de que os mesmos correspondem à classe mais abundante de elementos móveis presentes em genomas eucariontes, de modo a compor, aproximadamente 50% do DNA nuclear (KIDWELL; LISCH, 1997; SHAPIRO, 2000; BENNETZEN, 2000; LOVSIN; GUBENSEK; KORDIS, 2001). Ademais, ao tratar-se especificamente de LINE-2, sabe-se que o mesmo pertence a um grupo bastante difundido de retrotransposons em vertebrados, responsáveis por grande influência na evolução do genoma eucariótico e, apesar disso, estudos acerca da origem e evolução deste transponível são pouco observados (LOVSIN; GUBENSEK; KORDIS, 2001; SUGANO; KAJIKAWA; OKADA, 2006; SCHEMBERGER et al., 2019; NASCIMENTO, 2019).

Nos últimos anos, com o avanço tecnológico, devido, principalmente, ao papel essencial da bioinformática, o sequenciamento de genomas inteiros tornou-se mais acessível, o que possibilita análises mais detalhadas das estruturas moleculares, melhor compreensão das complexidades destas sequências e seu papel nos genomas eucarióticos, incluindo peixes neotropicais, bem como tem contribuído para diferentes abordagens em estudos com elementos repetitivos (MACAS et al., 2011; PALAZZO; GREGORY, 2014; VALENTE et al., 2014).

Em *Apareiodon* sp. tais elementos repetitivos compõem uma parcela significativa do genoma, representando aproximadamente 36%. Além disso, um total de 56 superfamílias de TEs foram identificadas no genoma desta espécie (SCHEMBERGER et al., 2019). No entanto, pouco se conhece sobre a estrutura e função destes no genoma de *Apareiodon* sp. (VICENTE et al., 2003; VICARI et al., 2010; SCHEMBERGER et al., 2011, 2014, 2016; ZIEMNICZAK et al., 2014).

Embora tais elementos constituam significativa parcela genômica em *Apareiodon*, ainda não se sabe a influência destas sequências na evolução e organização cariotípica dos organismos. Nesse sentido, o presente trabalho busca responder a seguinte questão: O elemento transponível LINE-2 encontra-se ativo no genoma de *Apareiodon* sp.?

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar e caracterizar o elemento transponível LINE-2 no genoma de *Apareiodon* sp.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Buscar o elemento transponível LINE-2 no genoma de *Apareiodon* sp., utilizando a biblioteca de *Danio rerio* como referência;
- b) Isolar as sequências de LINE-2;
- c) Analisar a presença dos domínios nas sequências de *Apareiodon* sp.;
- d) Verificar a integridade dos domínios proteicos;
- e) Inferir a atividade ou inatividade deste elemento transponível no genoma de *Apareiodon* sp.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. DNA REPETITIVO

Os organismos eucariotos apresentam em seu genoma, em adição às sequências de cópia única, numerosas quantidades de DNA repetitivo, classificado de acordo com o grau de repetitividade que apresenta, o qual varia de moderada a alta repetição de sequências (LÓPEZ-FLORES; GARRIDO-RAMOS, 2012). A organização também é um critério utilizado para agrupar as sequências repetitivas, encontradas tanto de maneira contínua, chamadas de repetições *in tandem*, como DNAs satélite, minissatélites, microsatélites e algumas famílias gênicas; quanto de maneira dispersa, representadas por TEs (CHARLESWORTH; SNIEGOWSKI; STEPHAN, 1994; LÓPEZ-FLORES; GARRIDO-RAMOS, 2012).

Os DNAs satélites (satDNA) são sequências de alta repetitividade, constituintes de genomas eucarióticos, os quais são comumente constituídos de 100-300 pares de bases (pb), os quais ocorrem em determinados locais do genoma (MARTINS, 2007; LÓPEZ-FLORES; GARRIDO-RAMOS, 2012). Apresentam-se na forma de uma banda satélite, devido ao aglomerado de sequências repetitivas, sendo encontradas, frequentemente, em regiões centroméricas e teloméricas, sendo o principal constituinte da heterocromatina (MARTINS, 2007; BISCOTTI; OLMO; HESLOP-HARRISON, 2015).

A importância da pesquisa de tais sequências é evidenciada, por exemplo, por Mestriner et al. (2000), os quais descreveram o DNA satélite As51 para *Astyanax scabripinnis*, estando localizado em uma pequena porção do genoma, com distribuição não centromérica. O DNA satélite As51 envolve bandas C distais em cromossomos A (cromossomos que compõem o cariótipo) e bandas C intersticiais no cromossomo B (cromossomos extras encontrados em determinados grupos de animais). Dentre as sequências de DNA repetitivo já analisadas através da hibridização *in situ* fluorescente (FISH), a grande maioria foi localizada em regiões de centrômero, entretanto, em *A. scabripinnis*, As51 mostrou-se não centromérico, característica pouco observada em peixes (MESTRINER et al., 2000; VICARI et al., 2010).

As sequências de DNA minissatélite são descritas por Martins (2007), como as repetições *in tandem* cujo tamanho não é suficientemente longo para ser incluído em DNAs satélites, tampouco curtos o suficiente para considerar como sequências microsatélite. Ainda, considera-se que tais sequências minissatélites apresentam, geralmente, repetitividade moderada, sendo sequências de DNA curtas, com 10 a 60 pb (MARTINS, 2007). Sequências de DNA minissatélites foram registrados em regiões subtelo-méricas de cromossomos humanos,

do nematódeo *Caenorhabditis elegans* e do peixe *Tetradon nigroviridis*, enquanto que em leveduras *Saccharomyces cerevisiae* observou-se distribuição centromérica e subtelomérica (LÓPEZ-FLORES; GARRIDO-RAMOS, 2012).

Microssatélites são sequências de DNA repetitivo curtas, compostas por cerca de 1 a 6 pb, presentes em genomas de organismos procariontes e eucariontes, são também conhecidos por SSRs (*Simple Sequence Repeats*) ou STRs (*Short Tandem Repeats*) (TÓTH; GÁSPÁRI; JURKA, 2000; MARTINS, 2007; LÓPEZ-FLORES; GARRIDO-RAMOS, 2012). Tais sequências possuem alto grau de mutabilidade e, conseqüentemente, são importantes ferramentas no que diz respeito à variabilidade genética (TÓTH; GÁSPÁRI; JURKA, 2000). Sequências de microssatélites foram detectadas em porções de centrômeros e telômeros de cromossomos do peixe *Danio rerio*. Na espécie *Poecilia reticulata*, foram detectados segmentos ricos na sequência (GACA)_n na porção da heterocromatina de cromossomos W e Y, o que confirma que, em genomas de peixes, as sequências de microssatélites encontram-se, mais frequentemente, em regiões de heterocromatina, cuja porção repetitiva do DNA encontra-se significativamente acumulada (MARTINS, 2007).

3.2. ELEMENTOS TRANSPONÍVEIS (TEs)

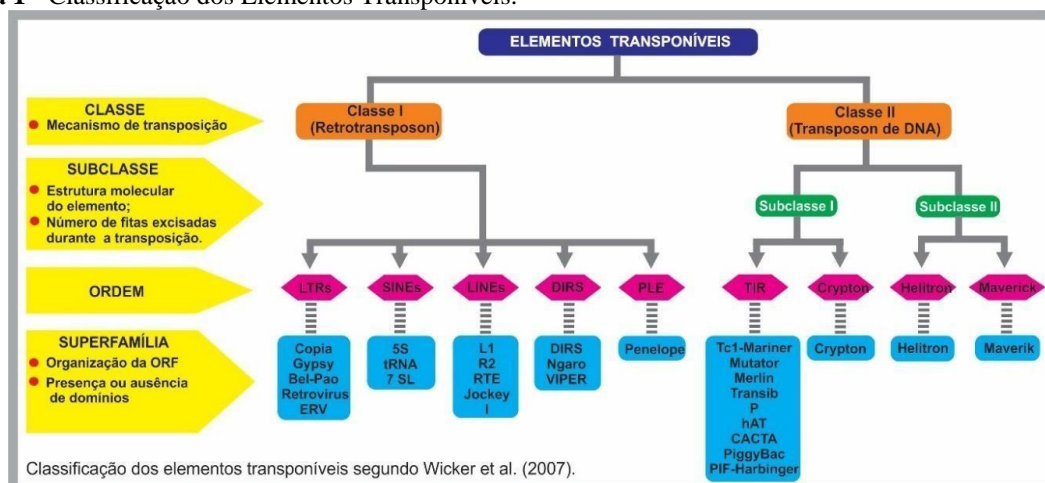
Barbara McClintok, ao realizar estudos com milho, observou determinados componentes do genoma que possuíam a habilidade de mover-se e regular a expressão gênica, e, devido a esta segunda característica, a cientista os batizou como “elementos de controle” (KIDWELL; LISCH, 2001; PHILIPPSEN, 2014).

Os elementos transponíveis constituem uma significativa parcela do DNA repetitivo moderado, ademais, são constituintes de consideráveis parcelas genômicas em diversas espécies já documentadas, como o milho, *Zea mays*, em que os TEs correspondem à cerca de 60% do genoma, no ser humano esse valor corresponde à 45%, e no roedor da espécie *Mus musculus*, estes elementos móveis ocupam cerca de 40% do conjunto genômico (SLOTKIN; MARTIENSSSEN, 2007). Entretanto, estes elementos estão suscetíveis a variação na quantidade em que se apresentam, dependendo do clado analisado. (CHARLESWORTH; SNIEGOWSKI; STEPHAN, 1994; ROUZIC; BOUTIN; CAPY, 2007). Trata-se de sequências de DNA capazes de deslocarem-se de um locus a outro, ou seja, migrar de uma posição no cromossomo a outra,

e estão presentes em organismos de todos os reinos, atuando como importantes agentes em processos evolutivos (ROUZIC; BOUTIN; CAPY, 2007; LÓPEZ-FLORES; GARRIDO-RAMOS, 2012). Tais sequências são responsáveis por rearranjos e recombinações no genoma através de deleções, duplicações, inversões, translocações e quebras cromossômicas, e conseqüentemente, tais processos acarretam aumento na variabilidade genética, além de ocasionarem mutações no genoma (CHARLESWORTH; SNIÉGOWSKI; STEPHAN, 1994; CLARO, 2013).

Com o intuito de separar e organizar os TEs, alguns autores propuseram sistemas de classificação (WICKER et al., 2007; KAPITONOV; JURKA, 2008). No entanto, não há uma classificação universal. Neste estudo, será adotado o sistema de Wicker et al. (2007) que classifica os TEs de acordo com suas estruturas e mecanismos de transposição, e então, os agrupa em classes, subclasses, ordens, superfamílias, famílias e subfamílias (Figura 1).

Figura 1 - Classificação dos Elementos Transponíveis.



Fonte: Nascimento (2019).

Quanto ao mecanismo de transposição, os TEs são divididos em Classe I – retrotransposons (RTs) – que se movem por transcrição reversa por meio de um intermediário de RNA, e Classe II – transposons – em que a transposição acontece mediada por suas moléculas de DNA (KIDWELL; LISCH, 2001; WICKER et al., 2007; TAVARES, 2016).

As subclasses são organizadas de acordo com a estrutura molecular do elemento ou pelo número de fitas cortadas durante a transposição. Em um quarto nível hierárquico, os TEs são agrupados em superfamílias baseado na organização das suas fases abertas de leitura (ORFs do inglês *open reading frame*), presença ou ausência de domínios e assinatura proteica. Por fim, são organizados em famílias e subfamílias de acordo com características mais específicas dos elementos, principalmente baseada na integridade das sequências de DNA (WICKER et al.,

2007).

Os TEs também podem ser classificados como elementos autônomos e não autônomos, independente da sua classe (WICKER et al., 2007). Os autônomos codificam todas as enzimas funcionais e necessárias para a transposição, enquanto os TEs não autônomos possuem cópias truncadas/degeneradas, embora possam se transpor utilizando as enzimas produzidas por elementos autônomos (WICKER et al., 2007; HUA-VAN et al., 2011).

3.2.1 Classe I – retrotransposons

Os retrotransposons realizam o processo de transposição a partir de suas sequências formando um segmento de RNA. O RNA utiliza-se da enzima transcriptase reversa para sintetizar um DNA complementar (cDNA). O cDNA formado é carregado por uma enzima chamada transposase, cuja função é reconhecer o local de inserção e, por fim, fixar esta cópia do retrotransposon em outro local do cromossomo ou em outro cromossomo (WICKER et al., 2007; GOLDFARB, 2014; MOURA, 2015). Conseqüentemente, a realização deste mecanismo leva a um aumento no número de cópias das sequências de retrotransposons nos genomas, o que acarreta um aumento proporcional no seu tamanho através desse mecanismo de “copia-e-cola” (WICKER et al., 2007; MOURA, 2015).

Os representantes da primeira ordem de retrotransposons são os elementos LTR (do inglês *long terminal repeat*, longas repetições terminais). Tais elementos possuem estrutura similar a retrovírus, devido ao RNA intermediário para o processo de transposição. Entretanto, diferentemente dos retrovírus, que estão limitados apenas aos vertebrados, os elementos LTR, encontram-se distribuídos amplamente entre os genomas dos eucariotos (EICKBUSH; MALIK, 2002).

Os elementos da Ordem DIRS apresentam repetições terminais, entretanto, estas não apresentam o mesmo arranjo encontrado nas outras quatro ordens de retrotransposons. O grupo fora descrito pela primeira vez no genoma de *Dictyostelium discoideum*, por Cappello, Handelsman e Lodish (1985). Três elementos foram identificados ao analisar as sequências, além de DIRS-1, também, DIRS.41 e DIRS.68, os quais são capazes de codificar quadros com mais de 100 códons (CAPELLO; HANDELSMAN; LODISH, 1985).

A Ordem PLE, também conhecida como Penelope, foi registrada por Evgen'ev et al. (1997), em *Drosophila virilis*. Observou-se que tais elementos são altamente polimórficos na

espécie estudada, tornando evidente a região 5' como a mais variável em tais transponíveis, enquanto a região central apresenta sequência conservada. Estruturalmente, as cópias isoladas dos elementos Penelope, são cercados por repetições, as quais apresentam-se de duas maneiras distintas: organizadas seguindo a mesma direção, ou orientadas em direções opostas. Tal disposição observada assemelha-se a DIRS (EVGEN'EV et al., 1997).

Os transponíveis SINEs foram originados a partir de uma transcrição reversa da DNA polimerase III (Pol III). Apresentam sequências relativamente pequenas contando com 80 a 500 pb, podendo ocorrer variações (WICKER et al., 2007; LÓPEZ-FLORES; GARRIDO-RAMOS, 2012). Em *Oreochromis niloticus*, foram mapeadas sequências de SINE e sabe-se que tais elementos não codificam proteínas, para isso, utilizam da transcriptase reversa do retrotransposon LINE para realizar a retrotransposição. Além disso, possuem um promotor para Pol III interno, o qual mantém novas cópias de SINE (OLIVEIRA et al., 2003; WICKER et al., 2007).

3.2.1.1 Retrotransposons LINEs

Os retrotransposons non-LTR (do inglês *non-long terminal repeat*, sem repetições terminais longas) consistem, majoritariamente, em sequências LINE (RODIC; BURNS, 2013). A ordem LINE é subdividida em cinco superfamílias (R2, RTE, Jockey, L1 e I), as quais são divididas em clados que, por sua vez, dão origem às famílias, entretanto, a classificação de Wicker et al. (2007) não aborda tais clados, apesar desta organização ser comumente utilizada. Desta maneira, Eickbush e Malik (2002), apresentam em sua classificação, as mesmas cinco superfamílias (R2, RTE, Jockey, L1 e I), as quais são subdivididas em 17 clados. De acordo com este modelo, o elemento LINE-2 (L2) pertence à superfamília Jockey e ao clado L2.

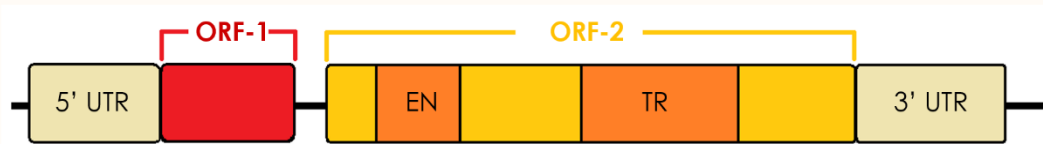
Essas sequências são encontradas em espécies pertencentes a todos os reinos eucarióticos, as quais manifestam-se, geralmente, em LINE-1 (L1), L2 e MIRs (do inglês *mammalian-wide interspersed repeats*, repetições intercaladas de mamíferos), sendo as duas últimas encontradas com maior frequência, inativas. As sequências L1 são, frequentemente, móveis no genoma humano, responsáveis por ocorrência de polimorfismos genéticos, e podem corresponder cerca de 17% do material genético de cromossomos somáticos humanos e até 31% no cromossomo sexual X (ALLEN et al., 2003; WICKER et al., 2007; RODIC; BURNS, 2013). A concentração de sequências LINE no cromossomo X de humanos levam a formação de

domínios de heterocromatina, a qual tem a capacidade de retardar a replicação (HIRATANI; LESKOVAR; GILBERT, 2004).

Estudos acerca da origem, distribuição e evolução do transponível L2 são bastante escassos, entretanto, sabe-se que este corresponde a um dos retrotransposons non-LTR identificados em diversos grupos de vertebrados, descoberto recentemente e anteriormente identificado como um elemento MIR, sendo posteriormente realocado como um elemento LINE. Ademais, acredita-se possuir uma grande relação com os elementos do clado de retrotransposons CR1, do qual possivelmente divergiu (LOVSIN; GUBENSEK; KORDIS, 2001).

Desta maneira, LINEs, especificamente os elementos da superfamília L2, apresentam em suas estruturas duas ORFs (ORF1 e ORF2) (Figura 2), de modo que ambas auxiliam os transponíveis em seu processo de mobilização, além de carregarem uma organização estrutural muito semelhante aos elementos da superfamília CR1, da qual acredita-se que tenham divergido (LOVSIN; GUBENSEK; KORDIS, 2001; KAZAZIAN, 2004; SUGANO, 2006; DEZORDI, 2016).

Figura 2 - Estrutura molecular das ORFs de LINE-2.



Fonte: A autora (2021).

A primeira ORF observada em LINEs possui uma proteína de ligação com ácido nucleico, o qual permite ligar-se ao seu próprio RNA, processo similar ao observado nos retrovírus, o que sugere que a ORF1 tenha a capacidade de formar uma ribonucleoproteína, a qual age como intermediária com o RNA de LINE (HOHJOH; SINGER, 1996; KOLOSHA; MARTIN, 1997; SUGANO; KAJIKAWA; OKADA, 2006).

Ademais, a proteína de ligação com ácido nucleico da ORF1 pode, também, atuar como chaperonas de ácidos nucleicos, ou seja, impedindo que erros nas informações genéticas sejam transmitidos, função esta que se mostrou bastante importante para a realização da retrotransposição de LINE-1, por exemplo, como demonstrado no estudo de Martin et al. (2005). Apesar de tais fatos demonstrarem a importância destas funções adicionais de ORF1 para o processo de retrotransposição, sua exata função continua incerta e, conseqüentemente, tem-se um conhecimento bastante limitado acerca da mesma (HOHJOH; SINGER, 1996;

KOLOSHA; MARTIN, 1997; MARTIN et al., 2005; SUGANO; KAJIKAWA; OKADA, 2006).

Ao contrário da primeira, a segunda ORF apresenta seus domínios proteicos bem estudados, de maneira que é composta pelo domínio de uma enzima Endonuclease (EN) e de uma Transcriptase Reversa (TR) (KOLOSHA; MARTIN, 1997; MARTIN et al., 2005; SUGANO; KAJIKAWA; OKADA, 2006). Sua atividade durante o processo de retrotransposição se dá através do mecanismo de Transcrição Reversa Iniciada por Alvo (TPRT do inglês *Target-Primed Reverse Transcription*), o qual requiere a atividade de ambas as enzimas providas pela ORF2, para que ao final do processo de retrotransposição, a sequência de DNA de LINE esteja integrada em local alvo (LUAN et al., 1993).

3.3. GÊNERO *Apareiodon*

A ordem Characiformes compreende 18 famílias e entre estas encontra-se a Parodontidae. Esta família é formada por um grupo relativamente pequeno de peixes neotropicais, com aproximadamente 32 espécies, divididas em três gêneros: *Parodon* Valenciennes, 1850; *Apareiodon* Eigenmann, 1916; e *Saccodon* Kner, 1863 (PAVANELLI; BRITSKI, 2003).

Espécimes do gênero *Apareiodon* possuem, em geral, um formato robusto, apresentam barbatanas peitorais fortes, assim como as ventrais e caudais e corpos fusiformes (Figura 2) (PAVANELLI; BRITSKI, 2003; BELLAFRONTTE et al., 2012; NASCIMENTO et al., 2018). Entretanto, a taxonomia da família é controversa, pois os membros necessitam de traços morfológicos confiáveis para a realização de uma análise filogenética (INGENITO, 2008; BELLAFRONTTE, 2012).

Figura 3 - Representante do gênero *Apareiodon*.



Fonte: Adaptado de Nascimento (2019).

Análises citogenéticas revelam que o gênero *Apareiodon*, apresenta número diploide de 54 cromossomos, de modo que a maioria destes, são metacêntricos ou submetacêntricos, e

poucos subtelocêntricos, com registros de acrocêntricos apenas na espécie *Apareiodon affinis* (NASCIMENTO et al., 2018; SANTOS et al., 2019). Ademais, diversos estudos citogenéticos realizados com o gênero abordam os cromossomos sexuais, os quais não assumem organização padrão, sendo possível observar espécies sem cromossomos sexuais heteromórficos, com protocromossomos sexuais, sistema de cromossomos sexuais simples (ZZ/ZW) ou múltiplo (ZZ/ZW1W2) (BELLAFRONTÉ et al., 2012; NASCIMENTO et al., 2018; SANTOS et al., 2019).

Diversos estudos de localização *in situ* associando elementos repetitivos e cromossomos sexuais já foram realizados, os quais evidenciaram que o cromossomo sexual W de Parodontidae apresenta uma natureza heterogênea quanto a composição dos DNA repetitivos, com repetições *in tandem* e dispersas, de diferentes tipos (VICENTE et al., 2003; VICARI et al., 2010; SCHEMBERGER et al., 2011, 2014, 2016; ZIEMNICZAK et al., 2014). Em adição, tais estudos também inferiram que grande parte da diversificação cariotípica observada na família é devido ao acúmulo e movimentação de DNAs repetitivos (BELLAFRONTÉ et al., 2011; TRALDI et al., 2016; NASCIMENTO et al., 2018).

No entanto, estudos de caracterização molecular/funcional de TEs são escassos em peixes Neotropicais (SCHEMBERGER et al., 2019; NASCIMENTO, 2019). Portanto, estudos com diferentes abordagens precisam ser realizados para um melhor entendimento da função e atividade dos elementos repetitivos no genoma de peixes da família Parodontidae.

4 METODOLOGIA

4.1. TIPO DE PESQUISA

Essa pesquisa se caracteriza por ser do tipo qualitativa, pois trata-se de uma análise e caracterização do elemento transponível LINE-2 no genoma de *Apareiodon* sp. Possuindo, portanto, natureza de pesquisa básica e com objetivo exploratório, ou seja, busca construir hipóteses em relação ao problema abordado, de modo a deixá-lo mais explícito (GIL, 2002). Por fim, visa caracterizar e avaliar as propriedades dos domínios proteicos de LINE-2 em *Apareiodon* sp.

4.2. ÁREA DE ABRANGÊNCIA

O material cromossômico de DNA foi coletado no Rio Verde, no município de Ponta Grossa, estado do Paraná e encontra-se depositado no banco de preparações cromossômicas e tecidos do Laboratório de Biologia Cromossômica: Estrutura e Função da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG).

4.3. AMOSTRA

A pesquisa foi realizada com amostras da espécie de peixe *Apareiodon* sp. que foram obtidas via coleta na natureza com licença do Ministério do Meio Ambiente e ICMBIO (Licença permanente para coleta de material zoológico MMA/ICMBIO/SISBIO: 15117-1). Os procedimentos estavam de acordo com o Comitê de Ética do Uso de Animais da Universidade Estadual de Ponta Grossa (Protocolo: 13/2014).

O trabalho consiste na utilização de dados de duas bibliotecas genômicas de *Apareiodon* sp. (uma para cada sexo) que foram obtidas por sequenciamento genômico pela plataforma Illumina HiSeq 2000 (*100-base paired-end reads*), com cobertura genômica, após a filtragem, de ~ 42x para macho e ~ 47x para fêmea (SCHEMBERGER et al, 2019).

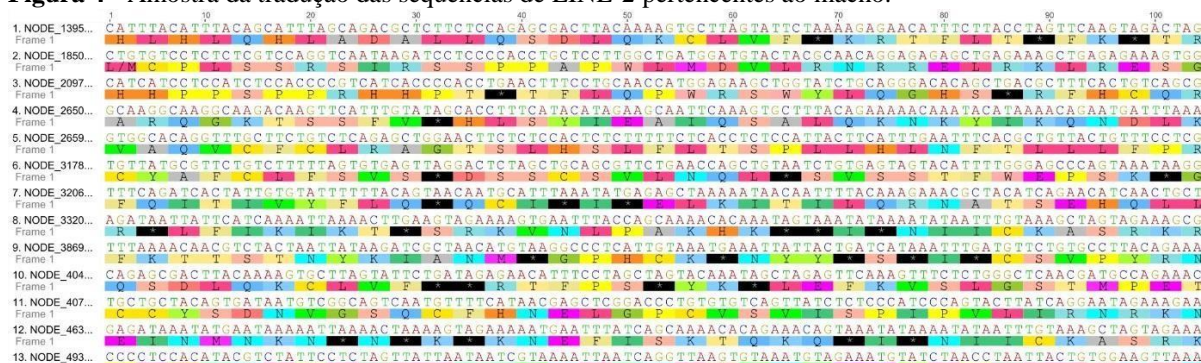
Os elementos repetitivos foram previamente identificados utilizando o software RepeatMasker (SCHEMBERGER et al, 2019).

4.4. SELEÇÃO DAS SEQUÊNCIAS LINE-2 E ANÁLISE DE DADOS

As sequências TE anotadas por RepeatMasker que apresentaram tamanho superior a 100 bp e similaridade $\geq 60\%$ foram selecionadas de ambos os genomas de *Apareiodon* sp (macho e fêmea), utilizando a biblioteca de *Danio rerio* como referência. Estas sequências foram submetidas ao software online Sensor Giri Repbase (KOHANY et al. 2006) para confirmação de similaridade com o retrotransposon LINE-2. As sequências que não apresentaram similaridade foram removidas da análise.

As sequências, de macho e fêmea, foram submetidas ao software Geneious® (BIOMATTERS versão 7.1.3), e traduzidas para aminoácidos (figuras 3 e 4), gerando seis quadros de leitura. Estes, por sua vez, foram submetidos ao HMMER (versão 3.1b1) usando parâmetros padrão com base na última versão do banco de dados PFAM, para análise da presença e integridade dos domínios proteicos.

Figura 4 - Amostra da tradução das sequências de LINE-2 pertencentes ao macho.



Fonte: A autora (2021).

Figura 5 - Amostra da tradução das sequências de LINE-2 pertencente à fêmea.



Fonte: A autora (2021).

Por fim, as sequências que apresentaram domínios proteicos íntegros foram anotadas e as regiões conservadas foram identificadas utilizando o software Geneious®.

5 RESULTADOS

A análise do RepeatMasker nos genomas de *Apareiodon* sp. resultou em 212.794 *contigs* com sequências LINE-2, representando 7,96% da fração dos elementos repetitivos no genoma de macho e 198.929 para o genoma de fêmea, representando 7,85% da fração dos repetitivos. O tamanho das sequências LINE-2 em *Apareiodon* sp. variou de 3.538 a 10 pb para macho e de 3.427 a 10 pb para fêmea. Todas as sequências apresentaram similaridade mínima de 65% com *Danio rerio* (SCHEMBERGER et al, 2019).

As sequências LINE-2 com tamanho >100pb foram extraídas dos *contigs* recuperados das bibliotecas genômicas de macho e fêmea de *Apareiodon* sp. Um total de 101 sequências de macho e 100 sequências de fêmea foram recuperadas.

A análise do Sensor Giri Repbase confirmou similaridade de 95 sequências LINE-2 para macho e 93 para fêmea. Um total de 6 sequências de macho e 7 sequências de fêmea não apresentaram similaridade e foram removidas da análise.

Das 95 sequências LINE-2 de macho submetidas ao Pfam, 11 sequências não apresentaram domínios, 84 sequências apresentaram domínios truncados, sendo 75 sequências apenas com domínios para a TR, 8 sequências com domínios tanto para TR quanto para EN, e 1 sequência com domínio apenas para EN. A partir disso, apenas 1 sequência apresentou domínio íntegro para a TR. Já em fêmea, das 93 sequências, 18 sequências não apresentaram domínios, 75 apresentaram domínios truncados, sendo 74 sequências com domínio apenas para TR e 1 sequência com domínio tanto para TR quanto para EN. Apenas 1 sequência de fêmea apresentou domínio íntegro para a TR, conforme demonstrado na Tabela 1.

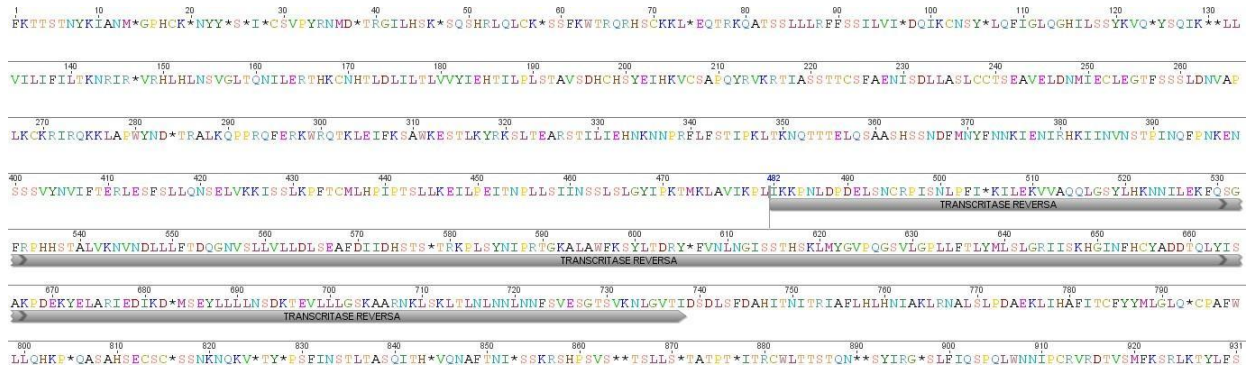
Tabela 1 - Compilação dos resultados obtidos através da análise PFAM das sequências de macho e fêmea.

	N. de sequências analisadas	Sequências com domínios íntegros TR	Sequências com domínios truncados TR	Sequências com domínios truncados EN
Macho	95	1	75 + 8 = 83	1 + 8 = 9
Fêmea	93	1	74 + 1 = 75	1

Legenda: TR – Transcriptase reversa; EN – Endonuclease. Fonte: A autora (2021).

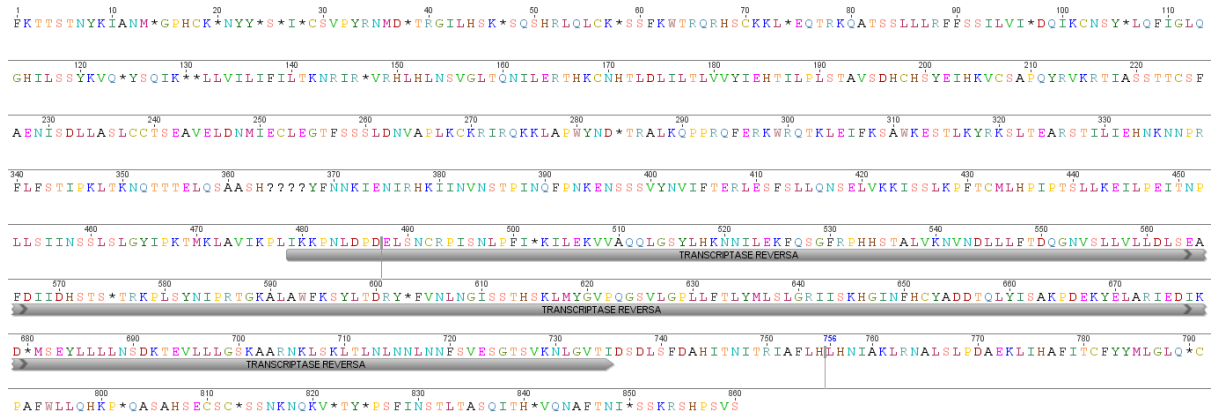
Com a identificação dos domínios íntegros para a TR dentro das sequências, observou-se que este domínio apresenta 257 resíduos de aminoácidos em ambas sequências (Figuras 5 e 6).

Figura 6 - Anotação do domínio íntegro de transcriptase reversa em macho de *Apareiodon* sp.



Fonte: A autora (2021).

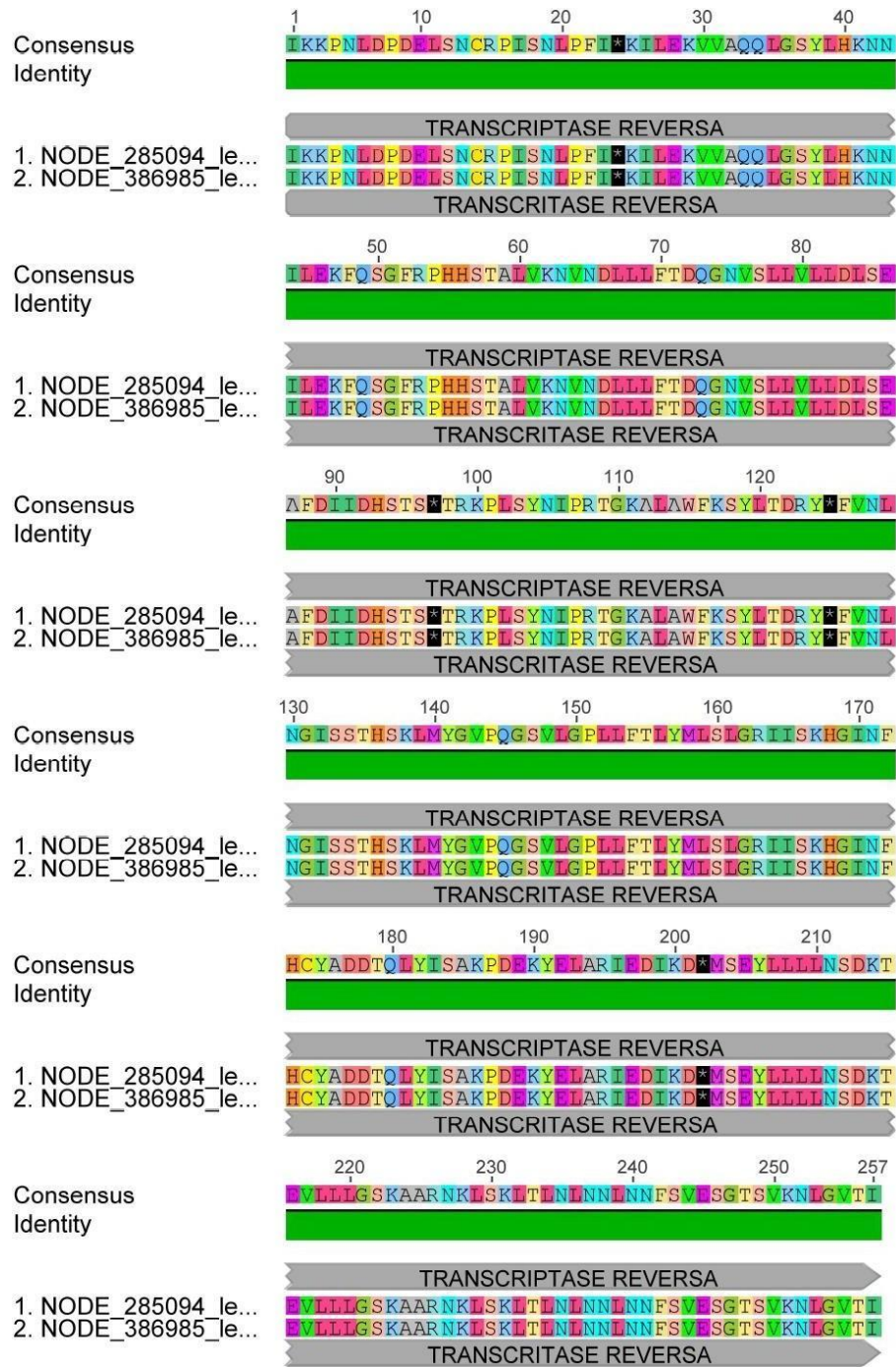
Figura 7 - Anotação do domínio íntegro de transcriptase reversa em fêmea de *Apareiodon* sp.



Fonte: A autora (2021).

Utilizando uma análise comparativa, foi possível observar a presença destas regiões conservadas em ambos os domínios (Figura 7), fato que sugere uma possível atividade do domínio de TR.

Figura 8 - Alinhamento MUSCLE das seqüências de Transcriptase Reversa presentes em indivíduos macho e fêmea de *Apareiodon* sp.



Legenda: Verificação de similaridade entre as seqüências de aminoácidos que compõem os domínios de TR em ambos os sexos. Acima das seqüências é demonstrado o resultado da comparação destas, sendo a barra verde o sinalizador para um alto nível de similaridade entre ambas. Fonte: A autora (2021).

6 DISCUSSÃO

Os TEs ocupam uma parcela significativa do genoma de *Apareiodon* sp., no entanto pouco se sabe sobre sua estrutura e função (SCHEMBERGER et al., 2019). Com o sequenciamento de próxima geração surgiu a oportunidade de conhecer a estrutura destes elementos, bem como investigar o papel dos TEs neste genoma. No entanto, sequências repetitivas são desafios constantes aos bioinformatas por dificultarem a montagem dos genomas e gerar erros de montagem.

O genoma de *Apareiodon* sp. possui 56 superfamílias de TEs (SCHEMBERGER et al., 2019) os quais precisam ser estudados mais detalhadamente, dentre eles o LINE-2 é um dos que merecem atenção, por ser abundante neste genoma.

De acordo com Sugano et al. (2006), LINEs correspondem à TEs observados em diversas classes de organismos eucariontes, além de serem transponíveis caracterizados como retrotransposons, devido aos seus mecanismos de mobilização. Ademais, o estudo de tais elementos mostra-se bastante importante no que diz respeito à análise da evolução de genomas eucarióticos, tendo em vista que este grupo de transponíveis apresenta um grande impacto genômico (KAZAZIAN, 2004; SUGANO, 2006).

O genoma de *Apareiodon* sp. apresenta grande quantidade de sequências LINE-2, no entanto, apenas 101 sequências de um organismo macho e 100 sequências de um organismo fêmea apresentam tamanho maior que 100 pb, evidenciando que a maioria das sequências LINE-2 estão em nível avançado de degeneração. Ainda, corroborando com estes dados observamos a ausência ou a presença de domínios truncados em 99% das sequências.

Sabe-se que transponíveis pertencentes à superfamília L2 apresentam em sua estrutura duas ORFs, de modo que a segunda (ORF2) possui domínios tanto para EN, quanto para TR (SUGANO, 2006; DEZORDI, 2016). Desta maneira, ao submeter o material das sequências à análise, esperou-se encontrar ambos os domínios. A importância da identificação destas regiões conservadas se dá em razão da atividade de cada domínio, pois correspondem a regiões essenciais para a ativação do mesmo. Assim, a partir da análise comparativa, foi possível observar a presença destas regiões conservadas em ambas as sequências, fato que sugere uma possível a atividade do domínio de TR nestas duas sequências analisadas. Embora tenha sido observada a presença deste domínio ativo, a sua presença em apenas uma sequência para cada um dos sexos demonstra a improbabilidade de que tal TE esteja ativo no genoma.

Pesquisas acerca dos elementos pertencentes à ordem LINE têm sido cada vez mais realizadas, entretanto, trabalhos que abordem L2 ainda se mostram bastante escassos, sendo

estes, geralmente, associados a estudos envolvendo L1. Contudo, estes trabalhos podem auxiliar na compreensão de L2, principalmente no que diz respeito à presença deste elemento em diferentes grupos de organismos, sua frequência e atividade nos mesmos.

Partindo deste princípio e buscando investigar a distribuição e evolução de L2 em grupos de Deuterostômios, o estudo desenvolvido por Lovsin et al. (2001) apresenta um parâmetro geral de distribuição e atividade do transponível em grupos taxonômicos pertencentes à Deuterostomia. Ao especificar os resultados obtidos para grupos de peixes ósseos, foi possível observar um alto nível de propagação entre peixes teleósteos, com o registro do elemento em oito ordens distintas destes animais, sendo estas: Beloniformes, Tetraodontiformes, Cyprinodontiformes, Cypriniformes, Siluriformes, Salmoniformes, Perciformes e Pleuronectiformes.

No entanto, apesar de se mostrar bastante difundido e apresentar um nível relativamente alto de conservação das sequências (40% à 50%), as taxas evolutivas estimadas se mostraram muito baixas, fato que leva à suposição de que, após um evento de intensa disseminação de L2 em um ancestral dos Deuterostômios, o transponível passa por um processo de extinção bastante lento, fato que pode ser ilustrado por grupos de mamíferos e répteis, em que L2 é representado apenas por sequências degeneradas e inativas (LOVSIN; GUBENSEK; KORDIS, 2001).

De modo a corroborar com o estudo realizado por Lovsin et al. (2001), a pesquisa de Schemberger et al. (2019) revela a presença do transponível em *Apareiodon* sp., o que prova a grande disseminação de L2, o qual corresponde à ~7,96% e ~7,85% da composição da parcela de DNA repetitivo em macho e fêmea, respectivamente. Ademais, através da análise de frequência dos TEs reportados, foi possível concluir que LINE-2, juntamente com o transponível Rex-Babar, corresponderam aos elementos mais frequentes pertencentes à ordem LINE, em ambos os sexos (SCHEMBERGER et al., 2019).

Para além de concordar com a alta taxa de disseminação proposta no estudo de Lovsin et al. (2001), o presente trabalho evidencia, também, que, apesar da grande frequência do transponível presente no genoma de *Apareiodon* sp. e preservação de suas sequências, o mesmo encontra-se majoritariamente inativo, apresentando apenas um domínio íntegro para cada um dos sexos analisados, ilustrando o processo de extinção mencionado anteriormente.

A ORF1 do LINE é a menos estudada, portanto não apresenta comparativos definitivos para este trabalho. Entretanto, a ORF2 com os domínios para EN e TR possibilita uma comparação com os resultados encontrados a partir da análise realizada no presente estudo. Desta maneira, a partir dos resultados obtidos na análise dos domínios íntegros presentes em ambos os sexos de *Apareiodon* sp., observou-se que apenas uma sequência, em cada um dos

sexos, apresentou domínio íntegro para TR. De modo que, os diversos domínios de EN e TR presentes encontraram-se truncados, fato que está associado a um processo de inativação e extinção do transponível, o qual pode ocorrer por diferentes fatores (KIDWELL; LISCH, 1997).

Esse processo pode ser corroborado pela pesquisa realizada por Schemberger et al. (2019), a qual demonstra os períodos de invasão, em milhões de anos, dos transponíveis observados em *Apareiodon* sp., sendo L2 um dos elementos mais recentes a serem observados, atingindo seu ápice há ~3 milhões de anos atrás, atingindo 0,25% do genoma, e logo em seguida, há ~2,5 milhões de anos atrás, ocorre o início de seu processo de senescência, o qual resultou em uma cobertura menor à 0,05% do genoma.

De acordo com Kidwell e Lisch (1997), o ciclo de vida de um elemento transponível pode durar por um período que varia entre milhares e milhões de anos, sendo composto por três estágios principais:

- a) Replicação dinâmica (*dynamic replication*): remete ao surgimento do transponível, seja a partir de um processo de mutação, recombinação de sequências genômicas ou através de uma transferência horizontal, a qual ocorre entre espécies, e permite que o ciclo de vida do transponível inicie-se em um novo grupo de organismo;
- b) Inativação: após um período curto de propagação do elemento, através do aumento de cópias do mesmo, é iniciada a fase de inativação, a qual dura longos períodos;
- c) Degradação: ocorre devido a diversos processos de degeneração dos TEs, como recursos epigenéticos presentes no genoma do hospedeiro e, também, pode ser ocasionado devido ao acúmulo de mutações presente.

Um destes mecanismos epigenéticos, é conhecido como co-opção, exaptação ou domesticação molecular, o qual identifica-se como um processo em que o genoma consegue se utilizar de sequências de transponíveis como matéria-prima para a formação de genes com novas funções, os quais garantem maiores benefícios ao genoma (MILLER; MCDONALD; PINSKER, 1997).

Além disso, outro fator que atua no processo de senescência de TEs pode ser ilustrado por pesquisas como as de Senti e Brennecke (2010) e Guo e Wu (2013), as quais relatam o processo de silenciamento de TEs a partir de *Piwi-Interacting RNA* (piRNA), sendo estes uma classe que pequenos RNAs não codificantes que interagem com proteínas Piwi, e são originados a partir de regiões específicas do genoma, com alta ocorrência de elementos repetitivos, relatados em diversos estudos (GRIVNA et al., 2006; GIRARD et al., 2006; LAU et al., 2006). Isso acontece, pois a presença de TEs corresponde a uma ameaça à estabilidade genômica, em decorrência do processo de retrotransposição, o qual pode resultar em diversas mutações, as

quais são prejudiciais, principalmente, às células germinativas. De modo que a este grupo de RNAs não codificantes atua como um ‘Guardião do Genoma’, a fim de impedir que alterações sejam transmitidas à prole (GRIMSON et al., 2008; SENTI; BRENNECKE, 2010; GUO; WU, 2013; WATANABE et al., 2015).

Por fim, além da inativação por piRNAs, o L2 pode ser inativado, em vertebrados, por outro mecanismo de defesa conhecido como proteínas da família AID/APOBEC as quais são citidinas deaminases (CDA), cujo mecanismo envolve o processo de metilação do DNA, a qual é caracterizada pela adição de um grupo metil (CH₃) a uma base nitrogenada, e que possui como objetivo, também, a garantia de uma estabilidade genômica, através do silenciamento de TEs (LINDIC et al., 2013; MENDONÇA, 2017). A partir disso, tais fatores de silenciamento, combinados ao processo de extinção do transponível, explicam a presença do elemento no genoma de *Apareiodon* sp., bem como sua inatividade, a qual foi observada nos resultados obtidos no presente trabalho.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir da análise realizada neste estudo comparada aos resultados obtidos na literatura, pôde-se sugerir a inatividade do transponível L2 em *Apareiodon* sp. Fato que corrobora para o pressuposto de que, apesar de bastante disseminado, o elemento em questão encontra-se inativo atualmente, tendo seu período de atividade na ascensão de organismos Deuterostômios. Tais inativações podem ocorrer através da presença de RNAs não codificadores e proteínas reguladoras, com a finalidade de manter uma estabilidade no genoma. Contudo, existe a possibilidade de que erros ocorridos durante a montagem do genoma possam ter gerado sequências pequenas o que dificultou a análise do LINE-2.

REFERÊNCIAS

ALLEN, E. et al. High concentrations of long interspersed nuclear element sequence distinguish monoallelically expressed genes. **PNAS**, Washington, vol.100, n.17, p. 9940-9945, 2003.

ARKHIPOVA, I. R. Using bioinformatic and phylogenetic approaches to classify transposable elements and understand their complex evolutionary histories. **Mobile DNA**, London, vol. 8, n. 19, p. 1-14, 2017.

BARBOSA, P. et al. Identification and chromosome mapping of repetitive elements in the *Astyanax scabripinnis* (Teleostei: Characidae) species complex. **Genetica**, Switzerland, 2014.

BEJERANO, G.; LOWE, C. B.; AHITUV, N.; KING, B.; SIEPEL, A.; SALAMA, S. R.; RUBIN, E. M.; KENT, W.J.; HAUSSLER, D. A distal enhancer and an ultraconserved exon are derived from a novel retroposon. **Nature**, London, ano 4, vol. 441, n. 7089, p. 87-90, 2006.

BELLAFRONTE, E. et al. Chromosomal markers in Parodontidae: an analysis of new and reviewed data with phylogenetic inferences. **Fish Biology and Fisheries**, Berlin, vol. 21, n. 3, p. 559-570, 2011.

BELLAFRONTE, E. et al. Sex chromosome system ZZ/ZW in *Apareiodon hasemani* Eigenmann, 1916 (Characiformes, Parodontidae) and a derived chromosomal region. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, vol. 35, n. 04, p. 770-776, 2012.

BISCOTTI, M. A.; OLMO, E.; HESLOP-HARRISON, P. Repetitive DNA in eukaryotic genomes. **Chromosome research**, Switzerland, 2015.

BUCHER, E.; REINDERS, J.; MIROUZE, M. Epigenetic control of transposon transcription and mobility in *Arabidopsis*. **ScienceDirect**, vol. 15, p. 503-510, 2012.

BUTELLI, E. et al. Retrotransposons Control Fruit-Specific, Cold-Dependent Accumulation of Anthocyanins in Blood Oranges. **The Plant Cell**, Washington, vol. 24, p. 1242-1255, 2012.

CAPPELLO, J.; HANDELSMAN, K.; LODISH, H. F. Sequence of Dictyostelium DIRS-1: An Apparent Retrotransposon with Inverted Terminal Repeats and an Internal Circle Junction Sequence. **Cell**, San Diego, Vol. 43, p. 105-115, 1985.

CHARLESWORTH, B.; SNIEGOWSKI, P.; WOLFGANG, S. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature**, London, vol. 371, p. 215-220, 1994.

CHERIYEDATH, S. START and STOP Codons. **News Medical**, 2019. Disponível em: <<https://www.news-medical.net/life-sciences/START-and-STOP-Codons.aspx>>.

CLARO, F. L. **Estudos do DNA repetitivo do gênero *Eigenmannia***. 2013. Tese de Doutorado – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, São Paulo, 2013.

DEZORDI, F. Z. **Caracterização e análise evolutiva de elementos transponíveis presentes no genoma de *Leptopilina boulardi***. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em

Biotecnologia) – Universidade Federal do Pampa, São Gabriel, 2016.

EICKBUSH T. H.; MALIK, H. S. Origins and Evolution of Retrotransposons. In: CRAIG, N.; CRAIGIE, R.; GELLERT, M.; LAMBOWITZ, A. (Ed.). **Mobile DNA II**. Washington: ASM Press, 2002. P. 1111-1144.

EVGEN'EV, M. B. et al. Penelope, a new family of transposable elements and its possible role in hybrid dysgenesis in *Drosophila virilis*. **PNAS**, Washington, vol. 94, p. 196-201, 1997.

FESCHOTTE, C. The contribution of transposable elements to the evolution of regulatory networks. **Nature Reviews Genetics**, London, vol. 9, n. 5, p. 397-405, 2008.

FURANO, A. V.; BOISSINOT, S. Long Interspersed Nuclear Elements (LINEs): Evolution. In: Encyclopedia of Life Sciences (ELS). **John Wiley and Sons**, 2008.

GIL, A. C. **Como elaborar projetos de pesquisa**. 4ª ed. São Paulo: Atlas, 2002.

GIRARD, A.; SACHIDANANDAM, R.; HANNON, G. J.; CARMELL, M. A. A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins. **Nature**, vol. 442, p. 199-202, 2006.

GOLDFARB, M. **Caracterização de retrotransposons LTR e variabilidade genética em populações de *Sclerotinia sclerotiorum* do estado de Minas Gerais**. 2014. Tese de doutorado – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2014.

GRIMSON, A.; SRIVASTAVA, M.; FAHEY, B.; WOODCROFT, B. J.; CHIANG, H. R.; KING, N.; DEGNAN, B. M.; ROKHSAR, D. S.; BARTEL, D. P. The early origins of microRNAs and Piwi-interacting RNAs in animals. **Nature**, vol. 455, n. 7217, 2008.

GRIVNA, S. T.; BEYRET, E.; WANG, Z.; LIN, H. A novel class of small RNAs in mouse spermatogenic cells. **Genes Dev.**, vol. 20, p. 1709-1714, 2006.

GUO, M.; WU, Y. Fighting an Old War with a New Weapon – Silencing Transposons by Piwi-Interacting RNA. **International Union of Biochemistry and Molecular Biology**, vol. 65, n. 9, p. 739-747, 2013.

HAWKINS, J. D. A survey on intron and exon lengths. **Nucleic Acids Res.**, vol. 16, p. 9893-9906, 1988.

HIRATANI, I.; LESKOVAR, A.; GILBERT, D. M. Differentiation-induced replication-timing changes are restricted to AT-rich/long interspersed nuclear element (LINE)-rich isochores. **PNAS**, Washington, vol. 101, n. 48, 2004.

HOHJOH, H.; SINGER, M. F. Cytoplasmatic ribonucleoprotein complexes containing human LINE-1 protein and RNA. **The EMBO Journal**, vol. 15, n. 3, p. 630-639, 1996.

HUA-VAN, A.; LE ROUZIC, A.; BOUTIN, T. S.; FILÉE, J.; CAPY, P. The struggle for life of the genome's selfish architects. **Biology Direct**, London, v. 6, n. 19, p. 1-2, mar. 2011

INGENITO, L. F. S. **Análise filogenética da família Parodontidae (Teleostei,**

Characiformes), 2008. Tese de Doutorado – Setor de Ciências Biológicas, Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

IZSVÁK, Z. et al. Short Invertes-Repeat Transposable Elements in Teleost Fish and Implications for a Mechanism of Their Amplification. **Journal of Molecular Evolution**, New York, vol. 48, p. 13-21, 1999.

JIANG, D.; TANG, C.; ZHANG, A. Cluster analysis for gene expression data: a survey. **IEEE Transactions on Knowledge and Data Engineering**, New York, vol. 16, n. 11, 2004.

KAPITONOV, V. V.; JURKA, J. A universal classification of eukaryotic transposable elements implemented in Repbase. **Nature Reviews Genetics**, London, v.9, p. 411-412, 2008.

KAZAZIAN JR, H. H. Mobile Elements: Drives of Genome Evolution. **Science**, vol. 303, n. 1626, p. 1626-1632, 2004.

KIDWELL, M. G.; LISCH, D. R. Transposable elements as sources of variation in animals and plants. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, vol. 94, p. 7704-7711, 1997.

KIDWELL, M. G.; LISCH, D. R. Perspective: Transposable Elements, Parasitic DNA, and genome evolution. **Evolution**, California, vol.55, p.1-24, 2001.

KOBAYASHI, S.; GOTO-YAMAMOTO, N.; HIROCHIKA, H. Retrotransposon-induced mutation in grape skin color. **Science**, Washington, vol. 304, 2004.

KOHANY, O.; GENTLES, A. J.; HANKUS, L.; JURKA, J. Annotation, submission and screening of repetitive elements in Repbase: RepbaseSubmitter and Censor. **Bio MedCentral Bioinformatics**. London, vol. 7, n. 474, p. 1-7, 2006.

KOLOSHA, V. O.; MARTIN, S. L. *In vitro* properties of the first ORF protein from mouse LINE-1 support its role in ribonucleoprotein particle formation during retrotransposition. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, vol. 94, p. 10155-10160, 1997.

KOONIN, E. V. Origin and evolution of the genetic code: the universal enigma. **IUBMB Life**, vol. 61, n. 2, p. 99-111, 2008.

LAU, N. C.; SETO, A. G.; KIM, J.; KURAMOCHI-MIYAGAWA, S.; NAKANO, T. et al. Characterization of the piRNA complex from rat testes. **Science**, vol. 313, p. 363-367, 2006.

LINDIC, N.; BUDIC, M.; PETAN, T.; KNISBACHER, B. A.; LEVANON, E. Y.; LOVSIN, N. Differential inhibition of LINE1 and LINE2 retrotransposition by vertebrate AID/APOBEC proteins. **Retrovirology**, vol. 10, n. 156, p. 1-16, 2013.

LÓPEZ-FLORES, I.; GARRIDO-RAMOS, M. A. The Repetitive DNA Content of Eukaryotic Genomes. In: GARRIDO-RAMOS, M. (Ed.). **Repetitive DNA**. Genome Dynamics, vol. 7, Basel: Karger, 2012, p. 1-28.

LOVSIN, N.; GUBENSEK, F.; KORDIS, D. Evolutionary Dynamics in a Novel L2 Clade of Non-LTR Retrotransposons in Deuterostomia. **Mol. Biol. Evol.**, vol. 18, n. 12, p. 2213-2224, 2001.

LUAN, D. D.; KORMAN, M. H.; JAKUBCZAK, J. L.; EICKBUSH, T. H. Reverse Transcription of R2Bm RNA Is Primed by a Nick at the 7. Chromosomal Target Site: A Mechanism for Non-LTR Retrotransposition. **Cell**, vol. 72, p. 595-605, 1993.

MACAS, J.; KEJNOVSKY, E. NEUMANN, P.; NOVAK, P.; KOBLIZKOVA, A.; VYSKOT, B. Next generation sequencing-based analysis of repetitive DNA in the model dioecious plant *Silene latifolia*. **Public Library of Science One**, San Francisco, vol. 6, n. 11, p. 1-12, 2011.

MARTIN, S. L.; CRUCEANU, M.; BRANCIFORTE, D.; WAI-IUN LI, P.; KWOK, S. C.; HODGES, R. S.; WILLIAMS, M. C. LINE-1 Retrotransposition Requires the Nucleic Acid Chaperone Activity of the ORF1 Protein. **J. Mol. Biol.**, vol. 348, p. 549-561, 2005.

MARTINS, C. Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome. In: PISANO, E; OZOUF-COSTAZ, C.; FORESTI, F.; KAPOOR, B. G. (Ed.). **Fish Cytogenetics**. Enfield: Science Publisher, 2007. P. 421-453.

MENDONÇA, A. S. **Caracterização epigenética e funcional do transcrito específico do X inativo (Xist) durante o desenvolvimento embrionário inicial *in vitro* em bovinos**. 2017. Tese de Doutorado (Genética) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2017.

MESTRINER, C. A. et al. Structural and functional evidence that a B chromosome in the characid fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome. **Heredity**, Basingstoke vol.85, p. 1-9, 2000.

MILLER, W. J.; MCDONALD, J. F.; PINSKER, W. Molecular domestication of mobile elements. In: Capy P. (Ed.). **Evolution and Impact of Transposable Elements**. Contemporary Issues in Genetics and Evolution, vol. 6, Dordrecht: Springer, p. 261-270, 1997.

MORGANTE, M. et al. Gene duplication and exon shuffling by helitron-like transposons generate intraspecies diversity in maize. **Nature genetics**, New York, vol. 37, n. 9, p. 997-1002, 2005.

MOURA, B. P. **Análise comparativa de transposons classe II (CACTA e Mutator) nos genomas de *Vigna unguiculada*, *Phaseolus vulgaris* e *Medicago truncatula***. 2015. Dissertação de Mestrado – Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2015.

NASCIMENTO, V. D. et al. Do multiple karyomorphs and population genetics of freshwater darter characines (*Apareiodon affinis*) indicate chromosomal speciation?. **Zoologischer Anzeiger**, Berlin, vol. 272, p. 93-103, 2018.

NASCIMENTO, V. D. **Análise do sequenciamento em larga escala do genoma de *Apareiodon* sp. na caracterização e localização *in situ* de elementos repetitivos**. 2019. Tese de Doutorado – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2019.

OLIVEIRA, C. et al. A LINE2 repetitive DNA sequence from the ciclid fish, *Oreochromis niloticus*: sequence analysis and chromosomal distribution. **Chromosoma**, vol. 108, p. 457-468, 1999.

OLIVEIRA, C. et al. Short interspersed repetitive elements (SINEs) from the cichlid fish, *Oreochromis niloticus*, and their chromosomal localization by fluorescent in situ hybridization. **Caryologia: International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics**, London, vol. 56, n. 2, p.181-189, 2003.

OLIVEIRA, L. C. **DNA Repetitivo centromérico e disperso em espécies de *Solanum***. 2015. Tese de Doutorado – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015.

PAVANELLI, C. S.; BRITSKI, H. A. *Apareiodon* Eigenmann, 1916 (Teleostei, Characiformes), from the Tocantins-Araguaia Basin, with Description of Three New Species. **Copeia**, Lawrence, vol. 2003, n. 2, p. 337-348, 2003.

PALAZZO, A. F.; GREGORY, T. R. The Case for Junk DNA, **Public Library of Science genetics**, San Francisco, vol. 10, n.5, p. 1-8, 2014.

PHILIPPSEN, G. S. **Estudo da influência de elementos transponíveis nos genomas das algas *C. reinhardtii* e *V. carteri***. 2014. Tese de doutorado – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, W. J. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **PNAS**, Washington, vol. 83, p. 2934-2938, 1986.

PRITHAM, E. J.; PUTLIWALA, T.; FESCHOTTE, C. Mavericks, a novel class of giant transposable elements widespread in eukaryotes and related to DNA viruses. **Gene**, Amsterdam, v. 390, p. 3-17, 2007.

REBOLLO, R.; ROMANISH, M. T.; MAGER, D. L. Transposable Elements: An Abundant and Natural Source of Regulatory Sequences for Host Genes. **Annual Reviews Genetics**, Arlington, vol. 46, p. 21-42, 2012.

RIGAL, M.; MATHIEU, O. A “mille-feuille” of silencing: Epigenetic control of transposable elements. **Biochimica et Biophysica Acta**, France, vol. 1809, p. 452-458, 2011.

RODIC, N.; BURNS, K. H. Long Interspersed Element-1 (LINE-1): Passenger or Driver in Human Neoplasms?. **PLOS Genetics**, California, 2013.

ROUZIC, A. L.; BOUTIN, T. S.; CAPY, P. Long-term evolution of transposable elements. **PNAS**, Washington, vol. 104, n.49, p.19375-19380, 2007.

SANTOS, E. O. et al. Cytogenetics and DNA barcode reveal a undescribed *Apareiodon* species (Characiformes: Parodontidae). **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, vol. 42, n. 2, 2019.

SCHEMBERGER, M. O. et al. Differentiation of repetitive DNA sites and sex chromosome systems reveal closely related group in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes). **Genetica**, vol. 139, n. 11-12, p.1499–1508, 2011.

SCHEMBERGER, M. O. et al. Construction and characterization of a repetitive DNA library in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes): a genomic and evolutionary approach to the degeneration of the W sex chromosome. **Zebrafish**, New York, vol. 11, n. 6, p. 518-527, 2014.

SCHEMBERGER, M. O. et al. Sequence analyses and chromosomal distribution of the Tc1/Mariner element in Parodontidae fish (Teleostei: Characiformes). **Gene**, Amstersam, vol. 593, n. 2, p. 308-314, 2016.

SCHEMBERGER, M. O. et al. DNA transposon invasion and microsatellite accumulation guide W chromosome differentiation in a Neotropical fish genome. **Chromosoma**, Berlin, vol. 128, p. 547-560, 2019.

SENTI, K. A.; BRENNECKE, J. The piRNA Pathway: Guardian of the Genome – A Fly’s Perspective. **Trends Genet.**, vol. 26, n. 12. p. 499-509, 2010.

SLOTKIN, R. K.; MARTIENSSSEN, R. Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. **Nature Reviews**, vol. 8, p. 272-285, 2007.

SUGANO, T.; KAJIKAWA, M.; OKADA, N. Isolation and characterization of retrotransposition-competent LINEs from zebrafish. **Gene**, vol. 365, n. 2006, p. 74-82, 2006.

TAVARES, E. G. M. **Composição, abundância, diversidade e mapeamento cromossômico de DNA repetitivo em ciclídeos neotropicals utilizando dados de sequenciamento de nova geração.** 2016. Dissertação de mestrado - INPA, Manaus, 2016.

TÓTH, G.; GÁSPÁRI, Z.; JURKA, J. Microsatellites in Different Eukaryotic Genomes: Survey and Analysis. **Genome Research**, New York, vol. 10, p. 967-981, 2000.

TRALDI, J. B. et al. Chromosome Analyses of *Apareiodon argenteus* and *Apareiodon davisi* (Characiformes, Parodontidae): An Extensive Chromosomal Polymorphism of 45S and 5S Ribosomal DNAs. **Zebrafish**, New York, vol. 13, n. 1, p. 19-25, 2016.

VALENTE, G. T.; CONTE, M. A.; FANTINATTI, B. E.; CABRAL-DE-MELLO, D. C.; CARVALHO, R. F.; VICARI, M. R.; KOCHER, T. D.; MARTINS, C. Origin and evolution of B chromosomes in the cichlid fish *Astatotilapia latifasciata* based on integrated genomic analyses. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, vol. 31, n. 8, p. 2061-2072, 2014.

VICARI, M. R. et al. Satellite DNA and chromosomes in Neotropical fishes: methods, applications and perspectives. **Journal of fish biology**, London, vol. 76, p. 1094-1116, 2010.

VICENTE, V. E.; BERTOLLO, L. A. C.; VALENTINI, S. R.; MOREIRA-FILHO, O. Origin and differentiation of sex chromosome system in *Parodon hilarii* (Pisces, Parodontidae). Satellite DNA, G and C-banding. **Genetica**, vol. 119, n. 2, p. 115-120, 2003.

VOLFF, J. N. et al. Jule from the Fish *Xiphophorus* Is the First Complete Vertebrate Ty3/Gypsy Retrotransposon from the Mag Family. **Oxford Journals**, vol. 18, p. 101-111, 2001.

WANTANABE, T.; CHENG, E.; ZHONG, M.; LIN, H. Retrotransposons and pseudogenes regulate mRNAs and lncRNAs via the piRNA pathway in the germline. **Genome Research**, vol. 25, p. 368-380.

WICKER, T. et al. A unified classification system for eukaryotic transposable elements. **Nature Reviews Genetics**, London, vol. 8, p. 973- 982, 2007.

ZIEMNICZAK, K. et al. In situ localization of (GATA)_n and (TTAGGG)_n repeated DNAs and W sex chromosome differentiation in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes). **Cytogenetic and Genome Research**, Würzburg, vol. 144, n. 4, p. 325-332, 2014.

ZHOU, Q. et al. Helitron Transposons on the Sex Chromosomes of the Platyfish *Xiphophorus maculatus* and Their Evolution in Animal Genomes. **Zebrafish**, New York, vol. 03, n. 01, p. 39-52, 2006.