



UNIVERSIDADE FEDERAL DE RORAIMA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO SAÚDE E BIODIVERSIDADE

FABIANO BARRETO

**ANÁLISE DE PARÂMETROS FISIOLÓGICOS E CITOGENÉTICOS EM
TAMBAQUIS (*Colossoma macropomum*, CUVIER 1816) PARASITADOS**

BOA VISTA, RR
2023

FABIANO BARRETO

**ANÁLISE DE PARÂMETROS FISIOLÓGICOS E CITOGÊNÉTICOS EM
TAMBAQUIS (*Colossoma macropomum*, CUVIER 1816) PARASITADOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós -
Graduação em Saúde e Biodiversidade - PPGSBio
da Universidade Federal de Roraima, como parte
dos requisitos para obtenção do título de Mestre em
Saúde e Biodiversidade. Área de concentração:
Interdisciplinar.

Orientadora: Prof. Dra. Leila Braga Ribeiro.
Coorientadora: Prof. Dra. Nívia Pires Lopes.

BOA VISTA, RR
2023

Dados Internacionais de Catalogação na publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Roraima

B273a Barreto, Fabiano.

Análise de parâmetros fisiológicos e citogenéticos em Tambaquis
(*Colossoma macropomum*, Cuvier 1816) parasitados / Fabiano
Barreto. – Boa Vista, 2023.

50 f. : il.

Orientadora: Prof. Dra. Leila Braga Ribeiro.

Coorientadora: Prof. Dra. Nívia Pires Lopes.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Roraima,
Programa de Pós-Graduação em Saúde e Biodiversidade.

1 – Tambaqui. 2 – Parâmetros hematológicos. 3 – Glicose. 4 –
Anormalidades nucleares. 5 – Citogenômica. I – Título. II – Ribeiro,
Leila Braga (orientadora). III – Lopes, Nívia Pires (coorientadora).

CDU – 576.89

FABIANO BARRETO

**ANÁLISE DE PARÂMETROS FISIOLÓGICOS E CITOGENÉTICOS EM
TAMBAQUIS (*Colossoma macropomum*, CUVIER 1816) PARASITADOS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Biodiversidade (PPGSBio), para obtenção do grau de Mestre em Saúde e Biodiversidade pela Universidade Federal de Roraima. Área de concentração: Interdisciplinar. Defendida em 26 de outubro de 2023 e avaliada pela seguinte banca examinadora:

Documento assinado digitalmente



LEILA BRAGA RIBEIRO

Data: 22/12/2023 09:37:13-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dra. Leila Braga Ribeiro
Orientador / Presidente (PPGSBio/UFRR)

Documento assinado digitalmente



FABIANA NAKASHIMA

Data: 22/12/2023 10:06:56-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Fabiana Nakashima
Membro Interno (PPGSBio/UFRR)

Documento assinado digitalmente



SANDRO LORIS AQUINO PEREIRA

Data: 22/12/2023 15:54:41-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Sandro Lóris de Aquino Pereira
Membro Externo (EMBRAPA - RORAIMA)

Dedico este trabalho a minha família: aos meus pais, a minha esposa Bruna e aos meus Filhos, Arthus e Aisha.

A REALIZAÇÃO DESSE ESTUDO FOI POSSÍVEL DEVIDO A:

Universidade Federal de Roraima (UFRR) por meio do Programa de Pós – Graduação em Saúde e Biodiversidade (PPGSBio), que forneceu recursos e infraestrutura para a realização do trabalho. À parceria com o Laboratório de Organismos Aquáticos da Amazônia (LOAM) da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA - Roraima), que auxiliou na obtenção do material e na realização do experimento. Ao Laboratório de Genética Animal do Instituto Nacional de Pesquisas Amazônicas (LGA/INPA), onde foram realizadas as técnicas de citogenética e captura das imagens. Ao CNPq que financiou essa pesquisa por meio da Chamada MCTIC/CNPq Nº 28/2018 – Universal (Processo nº 409997/2018-8).

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos vão para todos que contribuíram de alguma forma para que eu chegasse a essa etapa tão importante da minha formação.

Em primeiro lugar, a Deus, por todas as oportunidades e chances que me deu até chegar a esse momento.

À minha orientadora, Dra. Leila Braga Ribeiro, uma pessoa que admiro como profissional e como amiga, obrigado pelas conversas e conselhos que me auxiliaram e deram forças nessa caminhada, se não fosse por uma dedicação e acreditar que eu era capaz, não teria chegado até aqui. Sou grato por ter a chance de conhecer e ser orientado pela Sra. o mundo acadêmico seria muito melhor com peças assim, obrigado.

À minha coorientadora Dra. Nívia Pires Lopes por todo tempo disponibilizado e ensinamentos que me passou, sua ajuda me direcionou para que pudesse concluir esse trabalho, obrigado por todos os conselhos.

Ao Dr. Sandro Loris Aquino Pereira, e aos seus alunos que me auxiliaram na coleta e cuidados com os animais, sem o apoio e disponibilidade de vocês não seria possível a realização desse trabalho.

Aos professores e colegas do PPGSBio por todos os trabalhos em grupo por seus ensinamentos e conselhos, um grupo unido mesmo com todas as dificuldades impostas pela pandemia de Covid-19. Vocês foram fundamentais em minha caminhada.

Aos meus pais, Fleury de Campos Barreto (*in memoriam*) e Dulcinéia Batista Niro, por minha criação e conselhos sem vocês não imagino como seria meu caminho.

Aos meus irmãos Fabício e Ana Paula, por todos os momentos que passamos juntos, em especial ao Fabício que sempre me aconselhou a continuar estudando, me apoiando e orientando, obrigado por fazer parte da minha vida.

Em especial, agradeço a minha esposa Bruna, e aos nossos filhos Arthus e Aisha, por toda paciência, pelas ausências, por todo estresse, vocês são fundamentais na minha vida e sempre me dão forças na construção dos nossos objetivos, amo vocês.

*“Entrega o teu caminho ao Senhor, confia
Nele , e tudo Ele fará”*

Salmos 37:5

RESUMO

O tambaqui (*Colossoma macropomum*), espécie nativa mais cultivada, possui um alto valor comercial e fácil manejo em cativeiro, sendo objeto de diversos estudos. Alguns problemas, no entanto, podem afetar diretamente sua criação como contaminações por parasitas e fungos. Investigar como o parasitismo afeta o tambaqui pode auxiliar na compreensão de respostas fisiológicas e citogenéticas para outras espécies de peixes. Dessa forma, a presente pesquisa teve como objetivo analisar parâmetros hematológicos de exemplares de *C. macropomum* parasitados e não parasitados por *Neoechinorhynchus buttnerae* e fungos, correlacionando os resultados com dados citogenéticos e anormalidades nucleares dos grupos. Em linhas gerais, os procedimentos práticos foram: (i) análises fisiológicas referente aos parâmetros respiratórios (hematócritos, hemoglobina, eritrócitos e metahemoglobina) e níveis de estresse (concentração de glicose); (ii) detecção de heterocromatina (banda C); (iii) mapeamento de elementos transponíveis *Rex* e (iv) avaliação de anormalidades nucleares eritrocíticas. Os resultados obtidos demonstraram desenvolvimento de anemia leve nos espécimes parasitados por *N. buttnerae* e anemia grave quando parasitados por fungos, além de diferenças significativas nos níveis de glicose, que tendem a reduzir quando parasitados. Não foram observadas alterações cromossômicas e anormalidades nucleares significativas, demonstrando que os tipos de parasitismo avaliados não causam alterações no padrão dos marcadores utilizados, necessitando de um acompanhamento mais longo do parasitismo visando confirmar essa afirmação. Conclui-se, portanto, que os efeitos do parasitismo alteram, a curto prazo, parâmetros fisiológicos do tambaqui, demonstrando sua plasticidade fenotípica para os cenários testados.

Palavras-chave: Tambaqui, parâmetros hematológicos, glicose, anormalidades nucleares, citogenômica.

ABSTRACT

The tambaqui (*Colossoma macropomum*), the most cultivated native species, has a high commercial value and is easy to manage in captivity, being the subject of several studies. Some problems, however, can directly affect your breeding, such as contamination by parasites and fungi. Investigating how parasitism affects tambaqui can help in understanding physiological and cytogenetic responses for other fish species. Therefore, the present research aimed to analyze hematological parameters of specimens of *C. macropomum* parasitized and not parasitized by *Neoechinorhynchus buttnerae* and fungi, correlating the results with cytogenetic data and nuclear abnormalities of the groups. In general terms, the practical procedures were: (i) physiological analyzes regarding respiratory parameters (hematocrit, hemoglobin, erythrocytes and methemoglobin) and stress levels (glucose concentration); (ii) detection of heterochromatin (band C); (iii) mapping of Rex transposable elements and (iv) assessment of erythrocytic nuclear abnormalities. The results obtained demonstrated the development of mild anemia in specimens parasitized by *N. buttnerae* and severe anemia when parasitized by fungi, in addition to significant differences in glucose levels, which tend to reduce when parasitized. No significant chromosomal changes or nuclear abnormalities were observed, demonstrating that the types of parasitism evaluated do not cause changes in the pattern of markers used, requiring longer monitoring of the parasitism to confirm this statement. It is concluded, therefore, that the effects of parasitism alter, in the short term, physiological parameters of the tambaqui, demonstrating its phenotypic plasticity for the tested scenarios.

Keywords: Tambaqui, hematological parameters, glucose, nuclear abnormalities, cytogenomics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fluxograma da pesquisa.	19
Figura 2: Local de obtenção dos exemplares parasitados.	20
Figura 3: Transporte e acondicionamento dos espécimes na Embrapa.....	21
Figura 4: Obtenção das amostras. a) Manutenção dos exemplares utilizados no experimento; b) Coleta de sangue.	22
Figura 5: Mapeamento cromossômico do elemento transponível Rex3 em <i>C. macropomum</i> parasitados por <i>N. buttnerae</i> . a) DAPI; b) Rex3 (sinal vermelho, rodamina); c) Dapi + Rex3. Escala 10µm.....	34
Figura 6: Bandeamento C em <i>C. macropomum</i> parasitados por <i>N. buttnerae</i> . As setas indicam grandes blocos heterocromáticos em par metacêntrico. Escala 10µm.	35
Figura 7: Exemplos de anormalidades nucleares observadas em <i>C. macropomum</i> . a) Micronúcleo; b) Núcleo lobado; c) Núcleo segmentado; d) Núcleo em forma de rim. Escala 100 µm.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores de Hematócritos (Ht%) de <i>C. macropomum</i> nos grupos estudados apresentando os valores médios e desvio padrão obtidos ($p < 0,05$).	29
Tabela 2: Concentração de hemoglobina (Hb) de <i>C. macropomum</i> nos grupos estudados ($p < 0,05$).	30
Tabela 3: Número de eritrócitos circulantes (RBC) em <i>C. macropomum</i> nos grupos estudados ($p < 0,05$).	31
Tabela 4: Níveis de metahemoglobina de <i>C. macropomum</i> nos grupos estudados ($p < 0,05$).	32
Tabela 5: Níveis de glicose de <i>C. macropomum</i> nos grupos estudados.	33
Tabela 6: Número de ocorrências de anormalidades nucleares em exemplares de <i>C. macropomum</i> : ANE = Anormalidades nucleares eritrocíticas; NR = Núcleo em forma de rim; NL = Núcleo lobado; NS = Núcleo segmentado, MN = Micronúcleo; TA = Total de anormalidades (NR+NL+NS+MN); TLA = Total de lâminas analisadas; LA = Lâminas que apresentaram anormalidades.	36
Tabela 7: Anormalidades nucleares eritrocíticas observadas em <i>C. macropomum</i> dos grupos estudados ($p < 0,05$).	37

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Colossoma macropomum.....	12
1.2 PARASITISMO EM C. macropomum	13
1.3 EFEITOS DO PARASITISMO EM PEIXES	15
1.4 ANÁLISES CITOGENÉTICAS.....	16
2 OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVO GERAL.....	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3 MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 DELINEAMENTO AMOSTRAL.....	20
3.2 ANÁLISES FISIOLÓGICAS DOS ESPÉCIMES ESTUDADOS	22
3.2.1 <i>Parâmetros respiratórios</i>	22
3.2.2 <i>Níveis de estresse</i>	24
3.3 ANÁLISES CITOGENÉTICAS DOS ESPÉCIMES ESTUDADOS	24
3.3.1 <i>Obtenção de cromossomos metafásicos</i>	24
3.3.2 <i>Deteção de heterocromatina (Banda C)</i>	25
3.3.3 <i>Hibridização in situ por fluorescência – FISH</i>	26
3.3.4 <i>Processamento de imagens</i>	27
3.4 ANORMALIDADES NUCLEARES ERITROCÍTICAS (ANE)	27
3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	28
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5 CONCLUSÃO	39
REFERÊNCIAS	40

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Colossoma macropomum*

Incluída na ordem Characiformes, a família Serrasalmidade é composta por 97 espécies e 17 gêneros, sendo um já extinto (EIGENMANN, 1915; JÉGU, 2003; CIONE et al., 2009; FRICKE et al., 2022). Os gêneros *Catoprion*, *Pristobrycon*, *Pygocentrus*, *Pygopristis* e *Serrasalmus* incluem peixes conhecidos pelo comportamento agressivo e chamados popularmente de piranhas, enquanto *Acnodon*, *Colossoma*, *Metynnis*, *Myleus*, *Mylesinus*, *Myloplus*, *Mylossoma*, *Ossubtus*, *Piaractus* e *Tometes* abrangem espécies de pacus (JÉGU 2003; NELSON et al. 2016). Grande parte dos serrasalmídeos são populares devido ao seu valor econômico, com espécies importantes na pesca e/ou aquicultura, como os representantes dos gêneros *Colossoma*, *Mylossoma* e *Piaractus* (JUNK 1985; ARAÚJO-LIMA; GOULDING 1998).

O tambaqui (*Colossoma macropomum*) destaca-se nesse grupo devido ao seu valor comercial para a pesca e aquicultura. Corresponde ao segundo maior peixe de água doce da América do Sul, podendo chegar a medir 108 cm de comprimento e 40 kg de peso corporal (COSTA, 2018). Na natureza é encontrado em águas de lagos e rios de águas pretas, claras e brancas, sendo endêmico das bacias Orinoco e Amazonas (COSTA, 2018).

Colossoma macropomum é a segunda espécie em importância na produção aquícola brasileira, fatores que corroboram esse fato são: sucesso na reprodução em cativeiro, robustez, resistência às condições hipóxicas e águas ácidas, apresenta ainda alta taxa de fertilidade, rápido crescimento, fácil adaptação aos mais diversos ambientes (SAINT-PAUL, 2017; VALLADÃO et al., 2018; BRANDÃO et al., 2021). Associados a esses fatores podemos destacar ainda, excelente adaptação à ração, boa demanda aos mercados de consumo nacional e internacional, além de grande potencial zootécnico (RODRIGUES, 2014; RIBEIRO et al., 2016; CASTRO et al., 2020).

O aumento da demanda de alimentos em consequência do crescimento populacional, tem contribuído para expansão da produção aquícola nos últimos anos. A aquicultura está em amplo crescimento apresentando grande relevância econômica e social, pois é um importante produtor de proteína animal (RITTER et al., 2014; FAO, 2018). No Brasil, a produção da piscicultura foi de 485.253,7 toneladas em 2017, IBGE

(2018) e isso inclui o tambaqui.

Mesmo sendo considerada uma espécie rústica, *C. macromopum* é vulnerável à mudança de temperatura e ao estresse ocasionado pelo ambiente de criação, o que propicia uma queda de imunidade e pode predispor o tambaqui à infecções parasitárias (MALTA *et al.*, 2001; DO CARMO BARRETO *et al.* 2019). Assim, já foram realizados diversos estudos com o intuito de avaliar a resposta fisiológica do tambaqui às variadas condições ambientais e de sanidade, como por exemplo, a avaliação de parâmetros hematológicos frente a dietas com suplementação e a infecção por parasitas (PINHEIRO *et al.*, 2015; . RIBEIRO *et al.*, 2016; 2018; ROCHA *et al.*, 2018; COSTA *et al.*, 2023).

Da perspectiva citogenética, a espécie apresenta um número diploide de 54 cromossomos (ALMEIDA-TOLEDO *et al.*, 1987, NAKAYAMA *et al.*, 2012; RIBEIRO *et al.*, 2014), com caracterização do padrão de heterocromatina constitutiva e mapeamento de sequências de DNA ribossomais (5S e 18S) e de elementos transponíveis *Rex* já realizados (RIBEIRO *et al.*, 2014; FERREIRA *et al.*, 2019; FAVARATO *et al.*, 2021; SILVA *et al.*, 2023). Entretanto, estudos correlacionando aspectos citogenéticos e infecção parasitária em peixes não são conhecidos. Pesquisas com essa temática ainda são incipientes, principalmente no que diz respeito às espécies amazônicas de interesse comercial.

1.2 PARASITISMO EM *C. macromopum*

O acréscimo na produção de peixes e maiores densidades de estocagem, juntamente com práticas de manejo inadequadas, podem vir a causar alterações fisiológicas que comprometam a vida da espécie cultivada (COSTA *et al.*, 2018). Distúrbios causados por parasitos em peixes são responsáveis por grandes perdas na produção, podendo levar os animais a morte ou a letargia, retardando seu crescimento e conseqüentemente reduzindo seu valor comercial (DO CARMO BARRETO *et al.* 2019).

Da mesma forma que outros peixes redondos, o tambaqui é suscetível à infestação e/ou infecção de vários agentes patogênicos em todas suas fases de desenvolvimento. Diferentes grupos de parasitas vem sendo descritos em *C. macropomum*, como helmintos, protozoários, crustáceos e mixosporídeos; e

dependendo de condições fitossanitárias inadequadas, pode ocorrer a proliferação desses parasitas causando doenças (FUJIMOTO et al., 2015; JERÔNIMO et al., 2017; CASTRO et al., 2020).

A fauna parasitária do *C. macropomum* é composta por espécies de parasitos pertencentes aos grupos: Monera (bactérias) (Pilarski et al., 2008; DO CARMO BARRETO et al. 2019); Protozoa (SANTOS et al., 2018; DO CARMO BARRETO et al. 2019); Myxozoa (MOLNÁR e BÉKÉSI, 1993; DO CARMO BARRETO et al. 2019), Platyhelminthes: Monogenea (KRITSKY et al., 1979; THATCHER e KRITSKY, 1983; FISCHER et al., 2003; MORAIS et al., 2009; SANTOS et al., 2018; DO CARMO BARRETO et al. 2019), Digenea (FISCHER et al., 2003; SANTOS et al., 2018); Cestoda (BÉKÉSI, 1992), Nematoda (FISCHER et al., 2003; DO CARMO BARRETO et al. 2019), Acanthocephala (MALTA et al., 2001; FISCHER et al., 2003; DO CARMO BARRETO et al. 2019) e Arthropoda: Copepoda (THATCHER e PAREDES, 1985; THATCHER e BOEGER, 1984, FISCHER et al., 2003; DO CARMO BARRETO et al. 2019); Branchiura (MALTA e VARELLA, 1983; DO CARMO BARRETO et al. 2019); Isopoda (FISCHER et al., 2003; TAVARES-DIAS, 2014; DO CARMO BARRETO et al. 2019).

Devido à essa diversidade, as doenças relatadas para o tambaqui não são comuns entre todas as regiões onde se cultiva a espécie. Os parasitas com maior incidência em tambaquis são os metazoários do grupo acantocéfalo *Neoechinorhynchus buttnerae* Golvan, 1956, com a maior parte das ocorrências referidas na região norte do Brasil (CHAGAS et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2015; JERÔNIMO et al., 2017; PEREIRA e MOREY, 2018), as quais decorrem da intensificação dos sistemas reprodutivos na região sem aplicação de boas práticas de manejo (CHAGAS et al., 2015). *N. buttnerae* pertence a um grupo de parasitas intestinais cuja infecção ocasiona uma perda de peso significativa em seu hospedeiro e, conseqüentemente, prejuízos econômicos (SEIXAS et al., 2022).

Acantocéfalos são endoparasitos de peixes que ocorrem em animais da natureza e cultivo (NICKOL, 2006). O ciclo de vida desse grupo é indireto, sendo necessário um artrópode como hospedeiro intermediário e um vertebrado como hospedeiro definitivo (SANTOS et al., 2013). Este parasito é provido de uma probóscide na região anterior, que ao se prender na parede intestinal do hospedeiro causa danos significativos como inflamação, formação de tecido granular, proliferação de tecido conjuntivo e mobilização de células como neutrófilos, linfócitos e fibroblastos,

formando uma camada fibrosa composta, junto com os mastócitos locais, no tecido inflamado (WANSTALL et al., 1986; PURIVIROJKUL, 2012; MATOS et al., 2017).

As infecções já relatadas por esses parasitas intestinais mostraram-se severas e evidenciaram uma perda de massa corporal nos tambaquis, afetando a saúde dos peixes e também sua produtividade (OLIVEIRA *et al.*, 2015; PEREIRA e MOREY, 2018; CHAGAS et al. 2015; BENAVIDES et al. 2020; JESUS e AQUINO-PEREIRA 2020).

1.3 EFEITOS DO PARASITISMO EM PEIXES

Os efeitos do parasitismo em peixes variam de acordo com o órgão atingido, a espécie de parasita e a intensidade da infestação ou infecção. Em ambiente natural ocorre um equilíbrio entre a fauna parasitária e o hospedeiro, no entanto, em ambiente artificial e com cultivo intensivo a relação parasito-hospedeiro é alterada, ficando os peixes expostos à fatores como alta densidade de animais, maior disponibilidade de alimentos, variação dos parâmetros químicos, físicos e biológicos da água e instalações inadequadas (MALTA *et al.*, 2001; DO CARMO BARRETO et al. 2019).

Infecções parasitárias podem causar alterações hematológicas e metabólicas, de forma a comprometer a saúde dos animais cultivados. Sabe-se que a permanência de peixes em um ambiente alterado pode desencadear no animal respostas como alterações na glicose, íons e parâmetros hematológicos, podendo influenciar negativamente o desenvolvimento do indivíduo, interferindo até mesmo no crescimento do mesmo (BARTON, 2002; PÖRTNER e PECK, 2010).

Considerando que o tecido sanguíneo está envolvido em funções como respiração, osmorregulação e defesa, a análise de parâmetros hematológicos é de grande importância para avaliação do estado de saúde de peixes cultivados. Além de contribuir para o conhecimento dos valores de referência, análises fisiológicas auxiliam no entendimento de alterações causadas por estresse e infecções parasitárias (TAVARES-DIAS et al., 2009; HOSHINO et al., 2017).

Diversos trabalhos apontam que enfermidades causadas por parasitas estão relacionadas com alterações em seu hemograma. Dentre os parâmetros mais utilizados pode-se destacar os valores de hematócrito, hemoglobina, eritrócitos, concentração de glicose e triglicérides (TAVARES-DIAS *et al.*, 2009; PINHEIRO et al.,

2015; HOSHINO et al., 2017; ROCHA et al., 2018).

A glicose está relacionada a uma série de agentes estressores, entre eles, a variação de temperatura, o manuseio e o transporte. Dessa forma, ela é empregada como indicador de distúrbio fisiológico, por ser a principal fonte de energia utilizada pelos peixes para suportar situações adversas (MORGAN; IWAMA, 1997; URBINATI et al., 2004).

Análises de alterações morfológicas nucleares também se mostram promissoras na avaliação dos efeitos do parasitismo em peixes, uma vez que tais alterações podem surgir como resposta entre a exposição genotóxica e a eficiência dos mecanismos fisiológicos de defesa dos organismos (HAYASHI, 2016), permitindo a identificação do aumento da frequência de mutações em células (CARVALHO et al., 2002; UCHÔA; MAGALHÃES, 2020). Segundo Carrasco et al. (1990), essas alterações podem ser classificadas em quatro categorias: micronúcleo (M), núcleo lobado (L), núcleo segmentado (S) e núcleo em forma de rim (K).

1.4 ANÁLISES CITOGENÉTICAS

Além dos marcadores citogenéticos considerados clássicos, sequências de DNA repetitivo como os elementos transponíveis (ETs) vêm sendo amplamente estudadas na detecção de alterações citogenéticas e análise da resposta do genoma às condições ambientais. A identificação e caracterização de ETs tornaram-se de grande importância nos estudos citogenéticos com peixes, pois acredita-se que desempenhem um papel importante na dinâmica evolutiva desse grupo, atuando na recombinação por rearranjos cromossômicos e na capacidade adaptativa dos organismos devido à sua variabilidade genética (KIDWELL e LISCH 2000; KIDWELL 2002; KAZAZIAN 2004). A associação de sequências repetitivas à heterocromatina sugere que a localização dessas sequências não se dá de forma aleatória no cariótipo, e que a localização preferencial por essas regiões está relacionada com a manutenção das sequências no genomas de diferentes organismos (MAZZUCHELLI e MARTINS 2009).

Na aquicultura os elementos transponíveis podem ser utilizados com o objetivo de inserir genes de traços quantitativos importantes para a piscicultura, como aqueles relacionados ao aumento do crescimento, melhor performance reprodutiva, dentre

outros, sendo de grande valia para a geração de novos produtos biotecnológicos e para compreensão de mecanismos de resposta a condições estressantes (PHILLIPS; REED 1996; LARGAESPADA 2003; TAFALLA et al. 2006; DA SILVA et al, 2023), mostrando a importância da localização cromossômica de elementos transponíveis em espécies de alto valor comercial.

Dentre os retrotransposons podemos destacar os ETs do tipo Rex (*Rex1*, *Rex3*, *Rex6*) (VOLFF et al. 1999; 2000; 2001a), os quais são amplamente estudados a fim de entender sua estrutura, seu envolvimento na regulação gênica, distribuição e evolução no genoma (VOLFF et al. 1999; 2000; 2001a; 2001b; MAZZUCHELLI e MARTINS 2009; TEIXEIRA et al. 2009; COSTA et al. 2013; SCHNEIDER et al. 2013; SANTOS et al. 2016; FAVARATO et al. 2017; FERREIRA et al. 2021; DA SILVA et al, 2023).

A transposição dessas sequências pode ser desencadeada por sinais celulares, poluição ambiental, choques térmicos, dentre outras condições estressantes (LAUDENCIA-CHINGCUANCO e FOWLER 2012; MIOUSSE et al. 2015; SILVA et al. 2016; RIBEIRO et al. 2017; FERREIRA et al. 2021;). Em *C. macropomum*, FERREIRA e colaboradores (2021) verificaram que os retrotransposons do tipo Rex possuem comportamento dinâmico e são bons marcadores para detecção de estresses ambientais. *Rex1* e *Rex3* mostraram ter sua dispersão ativada em mudanças de temperatura e estarem relacionados a blocos heterocromáticos, levando a crer que há uma relação entre a dispersão dessas sequências e ativação de mecanismos epigenéticos.

Sendo assim, o estudo de elementos retrotransponíveis *Rex1*, *Rex3* e *Rex6*, em nível cromossômico em *C. macropomum*, submetidos a diferentes condições sanitárias, comparando animais parasitados e não parasitados, é relevante para compreender o comportamento dos elementos transponíveis frente às infecções parasitárias, fornecendo dados acerca da organização genômica da espécie mais representativa da piscicultura regional.

2 OBJETIVOS

Para responder as perguntas norteadoras desta pesquisa foram formulados os seguintes objetivos:

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar parâmetros hematológicos de exemplares de *C. macropomum* parasitados por *Neoechinorhynchus buttnerae* e infectados por fungos aquáticos, correlacionando os resultados com dados citogenéticos e anormalidades nucleares.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar análise de parâmetros respiratórios e de determinação de nível de estresse em tambaquis parasitados e não parasitados;
- Determinar o padrão de distribuição de heterocromatina e de elementos *Rex* em tambaquis parasitados e não parasitados;
- Verificar a presença de anormalidades nucleares entre os indivíduos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Para o desenvolvimento da pesquisa foram seguidas as etapas que constam no fluxograma apresentado na Figura 1. Ressalta-se ainda que, por meio do fluxograma, a definição da metodologia partiu da pergunta principal e dos objetivos estabelecidos.

Figura 1 – Fluxograma da pesquisa



Fonte: Elaboração própria.

3.1 DELINEAMENTO AMOSTRAL

Os espécimes de *C. macropomum* foram obtidos em uma piscicultura localizada no município de Caracaraí (Figura 2). No local foram retirados peixes com problemas com infecção parasitária por *acontecéfalo*. Enquanto que os peixes saudáveis foram cedidos pela EMPRAPA/RR e utilizados na indução de infecção fúngica e também como grupo controle.

Foram utilizados 60 exemplares, sendo 20 exemplares contendo parasitas de *Neoechinorhynchus buttnerae*; e 40 saudáveis, dos quais 20 tiveram indução de fungos por raspagem da mucosa simulando estresse no transporte, e 20 permaneceram saudáveis para serem utilizados como controle.

Figura 2 – Local de obtenção dos exemplares parasitados



Fonte: Google Maps.

Os animais foram transportados para o Laboratório de Organismos Aquáticos da Amazônia da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (LOAM/Embrapa-RR), onde ficaram acondicionados em tanques no sistema RAS (Sistema de Recirculação de Água) e foram alimentados diariamente (Figura 3).

Figura 3 – Transporte e acondicionamento dos espécimes na Embrapa



Fonte: Próprio autor.

Após três semanas de aclimação foi realizada a coleta de sangue para as análises fisiológicas, conforme a Figura 4. Para esses procedimentos, foram coletadas amostras sanguíneas de dez indivíduos de cada grupo: (i) saudáveis, (ii) parasitados e (iii) acometidos por fungos, sendo preparadas duas amostras por indivíduo, uma para analisar os parâmetros respiratórios e outra para determinar os níveis de estresse.

Na quarta semana, os animais foram estimulados ao aumento de células em divisão por 24 horas, e em seguida, foram eutanasiados com eugenol para coleta de porções do rim para obtenção de preparações celulares. O manuseio e eutanásia dos animais obedeceram as normas das diretrizes brasileiras para ética no uso de animais de laboratório, publicadas pelo CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal), conforme aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFRR) da Universidade Federal De Roraima sob protocolo n° 23/2019.

Figura 4 – Obtenção das amostras. a) Manutenção dos exemplares utilizados no experimento; b) Coleta de sangue



Fonte: Próprio autor.

3.2 ANÁLISES FISIOLÓGICAS DOS ESPÉCIMES ESTUDADOS

As análises fisiológicas consistiram na avaliação dos parâmetros respiratórios e dos níveis de estresse. Nas duas avaliações, foram realizados testes laboratoriais utilizando as amostras de sangue extraídas de cada grupo estudado, conforme descrito a seguir.

3.2.1 Parâmetros respiratórios

Na análise dos parâmetros respiratórios foram avaliados os seguintes parâmetros: hematócrito, hemoglobina, eritrócitos e metahemoglobina.

3.2.1.1 Porcentagem de Hematócrito (Ht)

A amostra de sangue coletada foi acondicionada em tubo de microhematócrito que teve uma das extremidades vedada com fogo, e em seguida centrifugada a

12000rpm por 10 minutos. A leitura da porcentagem de sedimentação dos eritrócitos foi realizada com auxílio de cartão padronizado.

3.2.1.2 *Concentração de hemoglobina [Hb]*

A concentração de hemoglobina foi determinada utilizando o método da cianomethohemoglobina descrito por Kampen e Zijlstra (1964), que consiste em colocar 15µL de sangue em um tubo de ensaio contendo 3mL de solução Drabkin (KCN 0,5g; KH₂PO₄ 1,4g; K₃[Fe(CN)₆] 2,0g em 1 litro de água destilada). Os tubos foram agitados e permaneceram por 15 minutos em repouso para efetivação da hemólise. O conteúdo do tubo foi colocado em uma cubeta de plástico e a absorbância medida em um espectrofotômetro, em 540nm. A determinação da concentração de hemoglobina (em gramas por 100mL de sangue) foi obtida pela equação:

$$[\text{Hb}] \text{ (g/dl)} = \text{absorbância (540nm)} \times 0,146 \times \text{diluição da amostra,}$$

onde: 0,146 = fator de correção.

3.2.1.3 *Contagem de eritrócitos (RBC)*

A contagem de eritrócitos foi realizada pelo método usual colocando em um tubo de ensaio uma amostra de 10µL de sangue diluída em 2mL de Formol Citrato (3,8g de citrato de sódio; 2,0mL formol e água destilada q.s.p. 100mL). Após homogeneização, a contagem dos eritrócitos (10⁶/mm³) foi feita em câmara de Neubauer, com objetiva de 40X.

3.2.1.4 *Determinação da taxa de metahemoglobina (MetaHb)*

A taxa de metahemoglobina foi determinada segundo o método descrito por Benesch et al. (1973). O método consiste na mistura de 50mL de uma amostra de sangue em 3mL de tampão fosfato 35mM, pH 7,3. A mistura foi agitada em um agitador automático de tubos e centrifugada por 5 minutos à 3000 rpm. A absorbância da mistura foi medida em espectrofotômetro Genesis-2, em 560, 576 e 630nm.

A determinação da taxa de metahemoglobina foi calculada pela somatória das fórmulas descritas a seguir, sendo o valor encontrado corrigido relativamente à concentração total de hemoglobina. Os resultados foram expressos em %.

$$\text{OxyHb} = (\text{Abs.576} \times (1,013) - \text{Abs.630} \times (0,3269) - \text{Abs.560} \times (0,7353)) \times 10^{-4}$$

$$\text{DeoxyHb} = (\text{Abs.560} \times (1,373) - \text{Abs.576} \times (0,747) - \text{Abs.630} \times (0,737)) \times 10^{-4}$$

$$\text{FerriHb} = (\text{Abs.630} \times (2,985) + \text{Abs.576} \times (0,194) - \text{Abs.560} \times (0,4023)) \times 10^{-4}$$

3.2.2 Níveis de estresse

Para a avaliação dos níveis de estresse foram avaliadas a glicose plasmática e anormalidades nucleares eritrocíticas, conforme descrito abaixo.

3.2.2.1 Glicose plasmática

Inicialmente, foi utilizado o Kit Medidor de Glicemia Accu-Chek Active. O uso de glicosímetro portátil baseia-se na técnica da pirroloquinolina quinona com a presença de beta D-glicose reduzida pela glicose desidrogenase, tornando sua cor vermelha (NEWMAN; TURNER, 2005, CARVALHO et al., 2021). O glicosímetro já foi testado em algumas espécies de peixes incluindo o *C. macropomum*. (BARTOŇKOVÁ, HYRŠL; VOJTEK, 2017; CARVALHO et al., 2021).

3.3 ANÁLISES CITOGENÉTICAS DOS ESPÉCIMES ESTUDADOS

Nas análises citogenéticas foram, inicialmente, obtidos os cromossomos metafásicos, seguido da detecção da heterocromatina, Hibridização in situ por fluorescência – FISH e processamento de imagens cromossômicas.

3.3.1 Obtenção de cromossomos metafásicos

Para a obtenção de um maior número de células em metáfase foi utilizada a técnica de indução de mitoses, onde preparou-se uma solução de fermento biológico na proporção de 0,5g de fermento, 0,5g de açúcar e 20 mL de água destilada. Em seguida, esta solução foi incubada em estufa a 40°C por cerca de 20 minutos e, posteriormente, injetada na região intraperitoneal do animal vivo, na proporção de 1 mL para cada 100 g de peso.

Os peixes foram mantidos em tanques no sistema RAS por um período de 24 horas antes da coleta das amostras para análise citogenética (OLIVEIRA et al. 1988b; MORAIS. 2021). Após esse período foram obtidos cromossomos mitóticos, seguindo

o protocolo de Gold et al. (1990). A técnica foi realizada trilhando os seguintes passos:

1. O animal foi previamente anestesiado em uma solução de Eugenol. Em seguida eutanasiado para a retirada e coleta de porções dos rins.
2. O material foi transferido para uma cubeta contendo de 5 a 10 mL de meio RPMI e então dissociado com auxílio de uma seringa hipodérmica desprovida de agulha, através de movimentos de absorção e expulsão, para a obtenção de uma suspensão homogênea de células.
3. Foram adicionados 100 a 200 μ L de colchicina 0,0125%, ressuspendendo, cuidadosamente, o material com auxílio de uma pipeta Pasteur, e então a suspensão foi incubada em uma estufa a 37°C por cerca de 25 minutos.
4. Posteriormente, o material foi transferido para um tubo de centrifuga de 15mL, ressuspendido e centrifugado por 10 minutos a 900 rpm.
5. O sobrenadante foi descartado, com auxílio de uma pipeta de Pasteur, tomando cuidado para não ressuspendar o material e acrescentando cerca de 10 a 12 mL solução de KCL 0,075M, ressuspendendo o material e deixando em estufa a 37°C por 45 minutos.
6. Em seguida, foi adicionado 1 mL de fixador Carnoy (3 partes de metanol para 1 parte de ácido acético glacial) ao material, o qual foi centrifugado por 10 minutos a 900 rpm, o sobrenadante foi retirado com auxílio de uma pipeta Pasteur e acrescentando cerca de 10 mL solução de fixador.
7. O sexto passo foi repetido por duas vezes.
8. Terminadas estas etapas, foi eliminado o sobrenadante da última centrifugação e adicionado cerca de 1,5 mL de fixador ao material, transferindo-o para frascos plásticos do tipo *ependorf*, os quais foram armazenados em freezer à - 20°C.

3.3.2 Detecção de heterocromatina (Banda C)

A análise da heterocromatina foi realizada seguindo a técnica descrita por Summer (1972), com adaptações. As lâminas foram inicialmente tratadas com ácido clorídrico (HCl 0,2N) por 2 minutos à 45°C, lavadas em água destilada à temperatura ambiente e secas ao ar. Em seguida, as lâminas foram colocadas em solução de hidróxido de bário a 5%, a a 45°C, por 1:30 minutos, sendo em seguida imersas em HCl (0,2N) para retirar o excesso de bário, e lavadas com água destilada.

Após secas, as lâminas foram incubadas em solução 2xSSC (Cloreto de Sódio

0,3M e Citrato Trisódico 0,03M, pH 6,8) em banho-maria a 60°C, por um período de 30 minutos, lavadas e secas ao ar; e por fim, coradas com solução de Giemsa a 5% em solução tampão fosfato pH 6,8 durante 10 minutos. Após cada tratamento, as lâminas foram lavadas em água destilada e deixadas ao ar livre até secar totalmente.

3.3.3 Hibridização *in situ* por fluorescência – FISH

A técnica de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH), seguiu protocolo descrito por PINKEL, STRAUME e GRAY (1986) com modificações. Os produtos de PCR serviram como sondas para o mapeamento dos elementos transponíveis pela técnica de FISH. Para esse processo utilizou-se o kit Biotina-16-dUTP (Roche Applied Science) para a marcação das sondas e a detecção foi realizada usando Estreptavidina, e o kit Digoxigenina-11-dUTP (Roche Applied Science) para a marcação das sondas e a detecção do sinal realizada usando anti-digoxigenina-rodamina (Roche Applied Science). Ambos processos foram realizados de acordo com as especificações do fabricante.

3.3.3.1 Extração de DNA

A extração do DNA foi realizada a partir de tecido muscular utilizando-se o Kit de extração Wizard® (Promega), segundo as recomendações do fabricante. Em um tubo tipo *ependorf* de 1,5mL foi adicionado o tecido, juntamente com 300µL de solução de EDTA + *Nuclei Lysis Solution* (50 µL de EDTA 0,5M + 250 µL de *Nuclei Lysis Solution*) e 10 µL de proteinase K. Esta mistura foi incubada por cerca de 3 horas à 55°C, e após a dissociação do tecido, adicionou-se RNase a mistura, que foi acondicionada em estufa por 30 minutos à 37°C. Após a ação da RNase foi adicionado à mistura uma solução *protein precipitation solution* e o tubo levado ao vortex por 20 segundos. Após isso a solução foi mantida no freezer por 5 minutos. Os tubos, contendo a solução, foram centrifugados por 8 minutos à 13.000 rpm, o sobrenadante transferido para tubos novos, adicionando 300 µL de isopropanol gelado, centrifugando-se novamente por 8 minutos à 13.000 rpm. O sobrenadante foi descartado, 300 µL de etanol 70% gelado adicionado e novamente centrifugado por 8 minutos à 13.000 rpm. Ao fim os tubos foram deixados à 37°C para secarem, adicionou-se 50 µL de *DNA Rehydration Solution* e o material foi mantidos à 37°C por 16 horas, até ser armazenado em freezer 20°C.

3.3.3.2 *Isolamento de sequências repetitivas por PCR*

Para a amplificação dos elementos transponíveis do tipo Rex foi utilizada a técnica de PCR (Polimerase Chain Reaction) em termociclador (T100™ Thermal Cycler) com os seguintes primers: para Rex3 RTX3-F3 (5'-CGG TGA YAA AGG GCA GCC CTG-3') e RTX3-R3 (5'-TGG CAG ACN GGG GTG GTG GT-3') (Volf et al. 1999; 2001a); e Rex6-Medf1 (5'- TAA AGC ATA CAT GGA GCG CCA C-3'), e Rex6-Medr2 (5'- GGT CCT CTACCA GAG GCC TGG G-3') para Rex6 (Volf et al., 2001b). A eficácia da reação foi verificada após corrida em gel de agarose 1% e as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro NanoVue Plus (GE Healthcare).

3.3.4 **Processamento de imagens**

Todas as lâminas cromossômicas foram analisadas em fotomicroscópio de epifluorescência Olympus BX-51. As imagens capturadas com uma câmera digital (Olympus DP51) e com o programa DP Manager e processadas por meio do programa Adobe Photoshop 7.0. Para a montagem do cariótipo, os cromossomos foram organizados em ordem decrescente de tamanho e classificados segundo LEVAN, FREDGA e SANDBERG (1964).

3.4 ANORMALIDADES NUCLEARES ERITROCÍTICAS (ANE)

Na avaliação da presença de anormalidades nucleares eritrocíticas foram realizados esfregaços sanguíneos. Os esfregaços sanguíneos foram fixados com metanol por 10 minutos e depois de secos foram corados com uma solução May-Grünwald por 2 minutos, May-Grünwald e água destilada 1:1 por 10 minutos e Giemsa e água destilada 1:6 por 10 minutos. Em seguida foram lavados com água destilada e secos à temperatura ambiente (SANCHEZ-GALAN et al., 1998).

As anomalias nucleares (ANs) foram determinadas segundo a metodologia de Carrasco et al. (1990). Foram contadas 1000 células adultas de cada indivíduo com o auxílio de microscópio óptico da marca MOTIC com aumento de 100X. O resultado foi expresso em porcentagem (%) de ANE, considerando a soma de todas as lesões (M+L+S+K). As imagens foram capturas em Microscópio Zeiss, programa ZEN

Microscopy Software.

3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para as análises estatísticas dos resultados foi utilizado o programa computacional Microsoft Excel 365 para calcular as somas e as médias dados. Em seguida, foi utilizado o programa BioEstat 5.3 sendo, inicialmente, realizada uma ANOVA (análise de variância) entre parâmetros de hematócrito, RBC e glicose. Onde houve significância, os dados foram submetidos ao teste de Tukey ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados referentes aos parâmetros respiratórios evidenciaram poucas variações entre os grupos analisados. Os valores correspondentes à porcentagem de hematócritos (%Ht), em média, foram de 25,38% para os animais saudáveis, 17,75% para os parasitados e 20,19% para os acometidos por fungos, não havendo diferença significativa entre os grupos analisados (Tabela 1). Mudanças nos parâmetros sanguíneos, como diminuição no valor de Ht, foram relatadas por TAVARES-DIAS et al. (2007) na análise de peixes parasitados, sendo atribuídas secundariamente, ao fato de se alimentarem do sangue do hospedeiro (SILVA, 2021). Embora a diferença entre os exemplares de *C. macropomum* não tenha sido estatisticamente significativa, observa-se que a porcentagem de hematócritos reduziu em peixes não saudáveis, em especial, quando acometidos pelo endoparasita *N. buttnerae*, corroborando com o já observado em peixes.

Tabela 1 – Valores de Hematócritos (Ht%) de *C. macropomum* nos grupos estudados apresentando os valores médios, desvio padrão ($p < 0,05$) e coeficiente de variação obtidos

GRUPOS			
	CONTROLE	PARASITADOS	ACOMETIDO POR FUNGOS
EXEMPLARES	26.33	18.89	24.50
	30.76	11.3	19.07
	24.17	17.66	18.45
	24.61	18.17	22.59
	29.53	17.13	19.99
	22.89	15.14	16.27
	24.5	17.61	16.92
	15.66	20.04	21.56
	29.95	22.2	18.97
	25.38	19.37	23.56
MÉDIAS*	25.38±3.35a	17.75±1.98a	20.19±2.29a
COEFICIENTE DE VARIAÇÃO	13.2	11.2	11.3

A concentração de hemoglobina apresentou pouca diferença entre o controle (7,58 mg/dL) e animais parasitados (8,07 mg/dL), apresentando redução e diferença significativa nos indivíduos acometidos por fungos com média de 4,99 mg/dL, conforme Tabela 2. Junior et al. (2014) verificaram um padrão de hemoglobina nos

peixes saudáveis de $9,49 \pm 1,65$ mg/dL, semelhante ao encontrado na presente pesquisa, demonstrando que são valores normais para *C. macropomum*. Já os dados de concentração de hemoglobina nos peixes submetidos à infecção fúngica demonstram que esse tipo de parasitismo causa anemia no tambaqui. Acredito que a relação entre os organismos não tenha sido de parasitismo.

Tabela 2 – Concentração de hemoglobina (Hb) de *C. macropomum* nos grupos estudados apresentando os valores médios, desvio padrão ($p < 0,05$) e coeficiente de variação obtidos

GRUPOS			
	CONTROLE	PARASITADOS	ACOMETIDOS POR FUNGO
EXEMPLARES	7.38	9.61	6.73
	3.55	9.14	6.12
	10.09	7.47	6.06
	7.02	8.35	0.22
	11.6	6.56	5.59
	8.64	7.55	5.48
	9.5	6.52	3.36
	7.33	10.18	5.26
	6.61	7.33	5.58
	3.86	7.97	5.51
MÉDIAS*	$7.58 \pm 2.55a$	$8.07 \pm 1.25a$	$4.99 \pm 1.89b$
COEFICIENTE DE VARIAÇÃO	33,6	15,5	37,9

Foram observadas diminuições significativas no número de eritrócitos no sangue de *C. macropomum* dos animais parasitados (1,22) em relação ao grupo controle (1,91) e mais intensamente nos animais contaminados por fungos (0,56), conforme Tabela 3. Valores entre $1,82 \pm 0,21$ e $1,91 \pm 0,46$ eritrócitos por $106/\mu\text{L}$ já foram relatados para o tambaqui (JUNIOR et al., 2014), sugerindo que os dados aqui apresentados estão dentro do padrão da espécie.

Em contrapartida, *Pimephales promelas* (fathead minnow) e *Siphateles bicolor* (tui chub), a baixa infecção por nematoides *Contracaecum* sp. não alterou o número total de eritrócitos (MARTINS et al., 2017; TAVARES-DIAS, CHAGAS e MACIEL., 2021). Assim como em *Prochilodus lineatus*, os baixos níveis de infecção por acantocéfalos *Neoechinorhynchus curemai* não influenciou no número total de eritrócitos (BELO et al., 2013., TAVARES-DIAS, CHAGAS e MACIEL., 2021). Nas amostras de *C. macropomum* analisadas nesse estudo não foram observadas alterações significativas no número total de eritrócitos.

Como o número de eritrócitos está diretamente ligado ao desempenho fisiológico dos peixes, alterações nesse parâmetro podem indicar doenças ou distúrbios de saúde. O aumento no número de eritrócitos, conhecido como eritrocitose, pode significar proliferação das células vermelhas por tecidos hematopoiéticos ou câncer, enquanto a diminuição do número caracteriza anemia (SERIANI et al., 2014). No presente trabalho foi observado uma redução no número de eritrócitos quando parasitados tanto por acantocéfalos quanto por fungos, e diminuição na concentração de Hb nos animais acometidos por fungos. Essas duas condições estão relacionadas ao surgimento de anemia, podem portanto afetar o seu crescimento e até mesmo a sobrevivência dos indivíduos, levando à queda na produtividade.

Tabela 3 – Número de eritrócitos circulantes (RBC) em *C. macropomum* nos grupos estudados apresentando os valores médios, desvio padrão ($p < 0,05$) e coeficiente de variação obtidos

GRUPOS			
	CONTROLE	PARASITADOS	ACOMETIDOS POR FUNGO
	1.28	1.41	1.01
	1.29	1.25	1
	1.56	1.45	0.71
	2.25	1.34	0.37
	2.34	1.49	0.37
EXEMPLARES	1.88	1.25	0.17
	2.55	0.81	0.57
	1.65	1.81	0.62
	1.93	0.73	0.55
	2.4	0.7	0.18
MÉDIAS*	1.91±0.46a	1.22±0.37b	0.56±0.30c
COEFICIENTE DE VARIAÇÃO	24,1	30,3	53,6

Ao avaliar as taxas de metahemoglobina (meta-Hb) no sangue dos exemplares de *C. macropomum* infectados por *N. buttnerae* foi possível verificar que houve um aumento das taxas quando comparadas com as taxas do exemplares do controle, no entanto, sem diferenças significativas. Enquanto que nos exemplares acometidos pelos fungos, houve redução das taxas, conforme Tabela 4.

Hb, RBC e Ht são considerados índices hematológicos que mostram a resposta primária dos parâmetros dos glóbulos vermelhos. Indicam a capacidade de transporte de oxigênio através do sangue e a sua utilização pelo organismo (RANDALL, 1982), no entanto, também podem ser utilizados para indicar o estado nutricional (ARIDE et

al., 2007; ARIDE et al., 2010; ARIDE et al., 2020). Os índices de Hb, no presente estudo apresentaram parâmetros semelhantes aos estudos mencionados; RBC por sua vez apresentou índices mais baixos nos animais acometidos por fungos em comparação aos animais analisados por Aride et al. (2020).

Tabela 4 – Níveis de metahemoglobina de *C. macropomum* nos grupos estudados ($p < 0,05$) apresentando os valores médios, desvio padrão ($p < 0,05$) e coeficiente de variação obtidos

GRUPOS			
	CONTROLE	PARASITADOS	ACOMETIDOS POR FUNGO
EXEMPLARES	605.38	625.42	1012.05
	2106.5	3574.35	62.3
	229.87	1558.09	969.53
	2807.98	2040.68	324.73
	243.22	505.84	45.67
	1492.02	2637.79	1786.5
	244.87	1648.39	1938.43
	918.66	4817.85	169.21
	419.62	2350.55	37.18
	887.51	657.31	330.39
MÉDIAS*	995.56±880.84ab	2041.63±1381.49a	667.60±723.19b
COEFICIENTE DE VARIAÇÃO	88,5	67,7	108,3

Os níveis de estresse foram avaliados por alterações nas concentrações de glicose. De acordo com os testes, verificou-se que as concentrações de glicose apresentaram diferenças significativas ($p < 0.05$), quando comparado o grupo controle com os demais, sendo observada uma redução desses níveis caracterizando uma condição de estresse (Tabela 5).

De forma consistente, os dados disponíveis na literatura suportam que os níveis de glicose em peixes indicam efeitos tóxicos de certos estressores (AERTS et al. 2015; SADOUL e GEFFROY 2019). A exposição dos peixes aos diferentes estressores ambientais pode levar ao aumento de sua susceptibilidade aos agentes infecciosos (vírus, bactérias e fungos) e parasitários (protozoários, monogeneas, nematodas e crustáceos). O parasitismo é também considerado um agente estressor para os peixes e promove alterações osmorregulatórias e hematológicas (CASTRO, 2006; TAVARES-DIAS et al., 2007; ARAÚJO et al., 2009; CASTRO; FERNANDES, 2009).

Considerando que os valores médios de glicose mensurados para os

exemplares *C. macropomum* apresentaram diferenças em relação os resultados encontrados em outros estudos para a espécie (ARIDE et al., 2020, FERREIRA et al., 2021), pressupõe-se que variações observadas no presente trabalho são decorrentes do estresse causado pela infecção por acantocéfalo e fungos.

Tabela 5 – Níveis de glicose de *C. macropomum* nos grupos estudados apresentando os valores médios, desvio padrão ($p < 0,05$) e coeficiente de variação obtidos

	GRUPOS		
	CONTROLE	PARASITADOS	ACOMETIDOS POR FUNGO
EXEMPLARES	147	59	121
	131	94	92
	126	74	124
	133	90	39
	108	109	103
	114	95	85
	160	121	69
	155	87	141
	75	81	100
	157	81	85
MÉDIAS*	130.6±26.52a	89.1±17.46b	95.9±29.32b
COEFICIENTE DE VARIAÇÃO	20,3	19,6	30,6

O estresse é tido como a resposta fisiológica de um indivíduo a uma mudança ambiental que reduz o fitness de um organismo (Hoffmann e Parsons 1991). A percepção de uma situação de estresse pelo organismo pode induzir alterações genéticas e gerar respostas fisiológicas rápidas para o organismo tolerar as mudanças ambientais, alterando assim a atividade de genes de defesa, que podem ser ativados ou inativados, inclusive por processos epigenéticos. Ainda nesse contexto, também pode haver a indução do processo de transposição de elementos transponíveis, gerando assim uma fonte de diversidade genética necessária para sobrevivência em condições estressantes (CAPY et al. 2000).

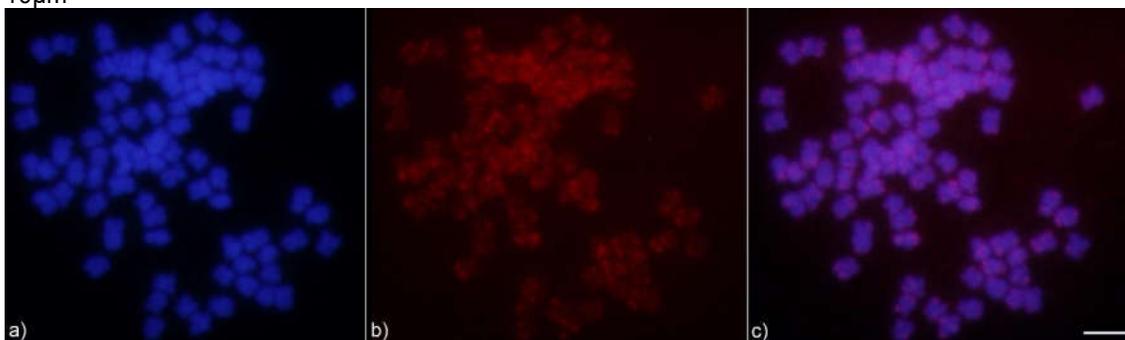
Com relação às análises cromossômicas, verificou-se um número diploide igual a 54 cromossomos (26m + 28sm) e número fundamental (NF) de 108 para todos os exemplares analisados, conforme já descrito para a espécie (NAKAYAMA et al. 2012; RIBEIRO et al., 2014). Destaca-se que para os indivíduos acometidos por fungos, os quais encontravam-se mais debilitados, o número de metáfases por animal foi menor,

com aproximadamente 6 metáfases por lâmina.

Quanto ao mapeamento das sequências retrotransponíveis do tipo *Rex* observaram-se marcações dispersas na totalidade dos cromossomos para todos os indivíduos mapeados. Para *Rex6* os espécimes apresentaram marcações sutis e pouco visíveis, diferindo de relatos anteriores onde observou-se grande número de marcações dessa sequência (FERREIRA et al, 2019; RIBEIRO et al., 2017).

Em contrapartida, no mapeamento do retroelemento *Rex3* (Figura 5) os espécimes apresentaram marcações evidentes na maioria dos cromossomos, mostrando dispersão da sequência em porções heterocromáticas e eucromáticas. O *Rex3* possui uma distribuição intersticial e espalhada em vários cromossomos do complemento de *C. macropomum*, semelhante ao já descrito para outras espécies da ordem Characiformes, como *Erythrinus erythrinus* (CIOFFI et al. 2010), *Brycon amazonicus* (Spix; Agassiz, 1829) e *B. orbignyanus* (RUIZ-SILVA 2012) e para o próprio tambaqui (FERREIRA et al, 2019; RIBEIRO et al., 2017). Esse padrão de distribuição difuso pode ser devido ao fato desses elementos transponíveis possuírem funções estruturais e regulatórias, que justifiquem sua dispersão em ambos os tipos de cromatina.

Figura 5 – Mapeamento cromossômico do elemento transponível *Rex3* em *C. macropomum* parasitados por *N. buttnerae*. a) DAPI; b) *Rex3* (sinal vermelho, rodamina); c) Dapi + *Rex3*. Escala 10µm



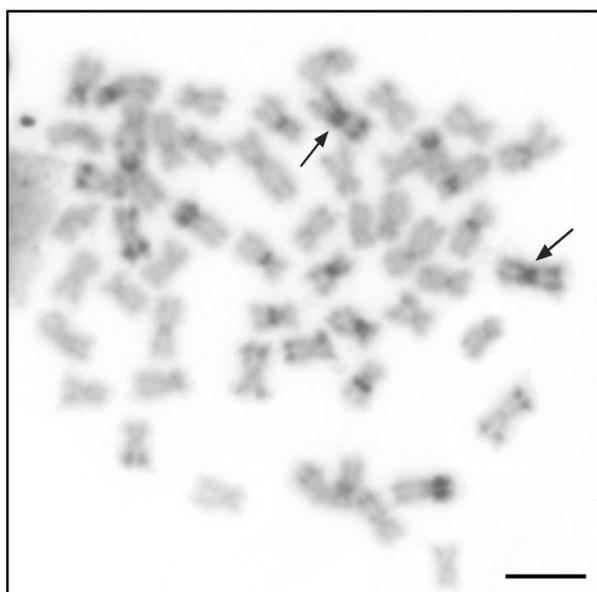
Fonte: Elaboração própria.

A localização dos elementos transponíveis da família *Rex* (*Rex1*, *Rex 3* e *Rex6*) em *C. macropomum* varia entre um padrão disperso e o acúmulo dessas sequências em blocos cromossômicos (FERREIRA et al., 2019; RIBEIRO et al., 2017; DA SILVA et al., 2023). Entretanto, o acréscimo na quantidade de cópias de *Rex* já foi relatado para a espécie em situações de estresse, tais como aumento de temperatura e contaminação por sulfato de cobre ((FERREIRA et al., 2019; DA SILVA et al., 2023).

Assim, considerando que não foi observado aumento no número e/ou na intensidade das marcações entre os indivíduos analisados, entende-se que o estresse causado pelos parasitas não desencadeia a atividade de transposição das sequências mapeadas. A localização dispersa observada nas três condições testadas, corrobora com o padrão já relatado para tabaquis saudáveis e em condições naturais.

Os perfis heterocromáticos dos espécimes de tabaqui dos diferentes grupos de tratamento mostraram semelhanças na distribuição dos blocos heterocromáticos, com marcações nas porções centroméricas da maioria dos cromossomos. Entretanto, nos animais parasitados pelo acantocéfalo e nos acometidos por fungos, marcações conspícuas foram vistas na porções pericentromérica e terminal de um grande par metacêntrico, além de marcações biteloméricas em outros pares cromossômicos (Figura 6).

Figura 6 – Bandeamento C em *C. macropomum* parasitados por *N. buttnerae*. As setas indicam grandes blocos heterocromáticos em par metacêntrico. Escala 10 μ m.



Fonte: Elaboração própria.

O surgimento desses blocos heterocromáticos nos exemplares não saudáveis pode estar relacionada à uma resposta epigenética à infecção, uma vez que mecanismos epigenéticos como modificações de histonas, metilação do DNA, heterocromatinização podem surgir como uma resposta rápida a mudanças ambientais. Diversos estudos já evidenciaram o surgimento de heterocromatina no tabaqui e em outros organismos expostos a agentes estressores (AYOUB et al.,

1999; HUNTER et al., 2009; ANDRES et al., 2012; RIBEIRO et al., 2013; FERREIRA et al., 2019; DA SILVA et al., 2023), o que regularia a expressão de sequências em regiões heterocromáticas sem alterar a sequência de DNA, dando uma resposta adaptativa rápida à situação de estresse.

As anormalidades nos núcleos foram analisadas para se avaliar os danos causados por contaminantes. As tabelas 6 e 7 apresentam o número de ocorrências das anormalidades e suas médias, enquanto a Figura 7 demonstra alguns exemplos observados.

Tabela 6: Número de ocorrências de anormalidades nucleares em exemplares de *C. macropomum*: ANE = Anormalidades nucleares eritrócíticas; NR = Núcleo em forma de rim; NL = Núcleo lobado; NS = Núcleo segmentado, MN = Micronúcleo; TA = Total de anormalidades (NR+NL+NS+MN); TLA = Total de lâminas analisadas; LA = Lâminas que apresentaram anormalidades

Grupos analisados	Número e descrição das ANE							
	Nº da amostra	NR	NL	NS	MN	TA	TLA	LA
Saudáveis	01	02	01	01	01	07	02	02
	02	01	01	01	02	05	02	01
	03	03		03	01	09	02	02
	04	01		02	01	04	02	01
	05	04		06	04	14	02	02
	06	04		03	01	10	02	02
	07	07		05	02	17	02	02
	08	03			01	04	02	01
	09	03	01	01	01	06	02	02
	10	03	01	03	01	08	02	02
Parasitados	11	03		04		09	02	02
	12	05		02		07	02	02
	13	04	01	02	01	08	02	02
	14	03		02		05	02	02
	15	01		01		03	02	01
	16	01				02	02	01
	17	01				02	02	01
	18	02		01		03	02	01
	19	02	01			04	02	02
	20	04		02		06	02	02
Acometidos por Fungos	21	01		03		05	02	02
	22		02	01		03	02	01
	23	03		01	01	06	02	02
	24	02		01	02	06	02	02
	25	02	02		01	05	02	02
	26	05	02	02		11	02	02
	27	04	01	02	01	08	02	02
	28	04		03	02	09	02	02
	29	03		01	01	05	02	01
	30	02		01	01	04	02	01

NRs: 3,1 / NRAcant: 2,6 / Nrfun: 2,9 TAs: 8,4 / TAacant: 4,9 / TAFun: 6,2

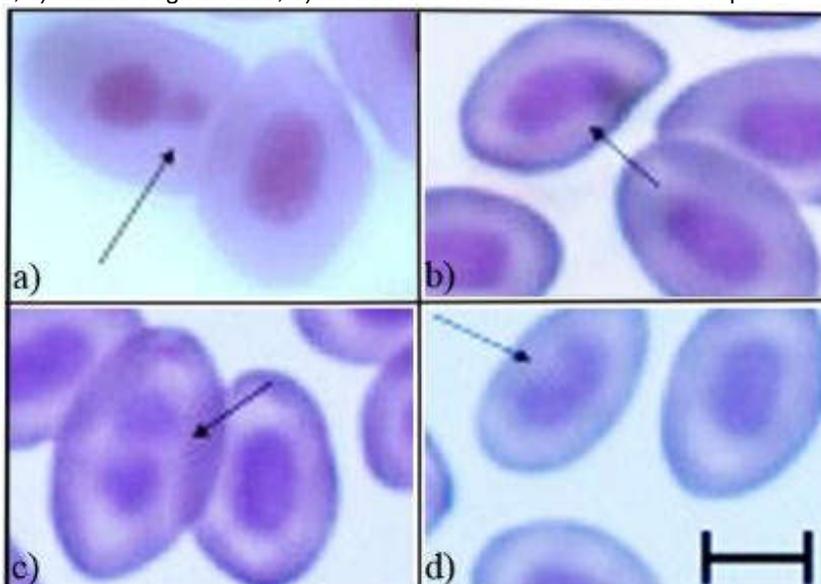
Nos peixes, os eritrócitos são ovais e têm núcleo central acompanhando o

formato da célula, com cromatina compactada e sem nucléolos. Os eritrócitos contêm o pigmento respiratório, a hemoglobina que tem por função transportar o O₂ e parte do CO₂ no sangue. Qualquer deficiência no eritrócito será traduzida como uma falta de O₂ nos tecidos. A forma do eritrócito e sua extrema plasticidade favorecem sua circulação nos capilares e, assim, qualquer modificação na forma acarretará perturbação circulatória e favorecerá sua destruição (RANZANI et al., 2004).

Tabela 7 – Anormalidades nucleares eritrocíticas observadas em *C. macropomum* dos grupos estudados ($p < 0,05$)

	CONTROLE	PARASITADO	ACOMETIDO POR FUNGO
EXEMPLARES	5	7	4
	5	7	3
	7	8	5
	4	5	5
	14	2	5
	8	1	9
	14	1	8
	4	3	9
	6	3	5
	8	6	4
MÉDIAS*	7.5±13.8a	4.3±6.9a	5.7±4.6a
COEFICIENTE DE VARIAÇÃO	184,0	160,5	80,7

Figura 7 – Exemplos de anormalidades nucleares observadas em *C. macropomum*. a) Micronúcleo; b) Núcleo lobado; c) Núcleo segmentado; d) Núcleo em forma de rim. Escala 100 µm



Fonte: Elaboração própria.

A patogenicidade causada por endoparasitas é muito variável, e está diretamente relacionada com a espécie, a intensidade da infecção, o órgão ou tecido afetado, a fixação do parasito no tecido do hospedeiro, entre outros fatores (DEZFULI et al., 2016., TAVARES-DIAS, CHAGAS e MACIEL., 2021).

Vários autores tem demonstrado a susceptibilidade de *Geophagus* spp. aos efeitos genotóxicos (aumento na frequência de micronúcleos, indicando danos no DNA) e danos teciduais em brânquias e fígado quando expostos a poluição aquática por metais pesados (DORIA 2017; LOPEZ et al. 2016; SANTOS, 2018; GOMES et al. 2019). Assim, considerando a baixa ocorrência de ANE nos indivíduos analisados, pode-se inferir que os danos causados pela infecção causada tanto por acantocéfalos quanto por fungos no presente estudo não causou danos de forma citotóxica. Provavelmente, esse tipo de dano seria evidente se houvesse uma exposição mais duradoura aos agentes biológicos, ou uma exposição química dos espécimes.

5 CONCLUSÃO

As análises dos parâmetros respiratórios demonstraram que a infecção por fungos e por *N. buttnerae* ocasionam um quadro de anemia em *C. macromopomum*, a qual pode ser branda ou aguda. Além disso, a variação nos níveis de glicose também evidenciou que o parasitismo leva a espécie à uma condição de estresse. Em ambos os casos, os animais podem ter seu desenvolvimento e sua sobrevivência afetados, resultando em uma queda na produtividade.

Contrariamente, tanto os fungos quanto o acantocéfalo, parecem não causar danos ao material genético nas condições avaliadas, uma vez que não foram observadas diferenças significativas em relação às anormalidades nucleares e localização dos elementos transponíveis da família *Rex*. O único indicativo observado foi em relação ao surgimento de blocos heterocomáticos nos indivíduos infectados, o que sugere resposta regulatória rápida as mudanças ambientais, sem necessariamente representar um dano.

Diante do exposto, pode-se concluir que os efeitos do parasitismo alteram, a curto prazo, parâmetros fisiológicos do tambaqui, demonstrando sua plasticidade fenotípica para os cenários testados.

Como recomendações futuras, deve-se realizar a avaliação da qualidade da água dos tanques, o isolamento e a identificação dos fungos visando correlacionar com fungos patogênicos já descritos por infectar peixes, além de exposição por um espaço de tempo maior para que sejam confirmadas a ausência de alterações citogenéticas.

REFERÊNCIAS

- AERTS, J. et al. Scales tell a story on the stress history of fish. **PLoS One**, v. 10, n. 4, p. 1-17, abril, 2015. DOI:10.1371/journal.pone.0123411
- ALMEIDA-TOLEDO, Lurdes Forest et al. Cytogenetic studies in *Colossoma mitrei*, *C. macropomum* and their interspecific hybrid. In: Tiews K editors. **Selection, Hybridization and Genetic Engineering in Aquaculture**. pp. 189–195. 1987.
- ANDRES, F.; COUPLAND, G. The genetic basis of flowering responses to seasonal cues. **Nature reviews. Genetics**, v. 13, n. 9, p. 627-639, 2012. doi:10.1038/nrg3291
- ARAÚJO-LIMA, C.; GOULDING, M. **Os frutos do tabaqui: ecologia, conservação e cultivo na Amazônia**. Brasília: Sociedade Civil Mamirauá/CNPq/Rainforest Alliance, 1998. 186p.
- AYOUB, N.; GOLDSCHMIDT, I.; COHEN, A. Position effect variegation at the mating-type locus of fission yeast: A cis-acting element inhibits covariegated expression of genes in the silent and expressed domains. **Genetics**, v. 152, n. 2, p. 495–508, 1999.
- BARTOŇKOVÁ, J.; HYRŠL, P.; VOJTEK, L. Glucose determination in fish plasma by two different moderate methods. **Acta Veterinaria Brno**, v. 85, n. 4, p. 349-353, 2017.
- BÉKÉSI, L. Evaluation of data on ichthyopathological analyses in the Brazilian Northeast. **Ciência e Cultura**, v. 44, n. 6, p. 400-403, 1992.
- BELO, M. A. A. et al. Haematological response of curimbas *Prochilodus lineatus*, naturally infected with *Neoechinorhynchus curemai*. **Journal of Fish Biology**, v. 82, p. 1403-1410, 2013.
- BENAVIDES, M. V. et al. Identificação do acantocéfalo *Neoechinorhynchus buttnerae* em plâncton de viveiros de produção de tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, v. 33, p. 1- 18, 2020.
- BENESCH, R.E.; Benesch, R.; Yung, S. 1973. Equation for the spectrophometric analysis of hemoglobin mixtures. *Anal. Biochem.*, 55: 215-218.
- BRANDÃO, Franmir Rodrigues et al. Anesthetic potential of the essential oils of *Aloysia triphylla*, *Lippia sidoides* and *Mentha piperita* for *Colossoma macropomum*. **Aquaculture**, volume 534, 2021. doi:10.1016/j.aquaculture.2020.736275.
- CARVALHO, F. V. de B. et al. Uso do glicosímetro como alternativa para a análise sanguínea em peixes: um estudo com tambaqui, *Colossoma macropomum*. **Engenharia de pesca: Aspectos teóricos e práticos**, v. 1, n. 1, p. 311-320, 2021.
- CASACUBERTA, E.; GONZÁLEZ, J. The impact of transposable elements in environmental adaptation. **Molecular ecology**, v. 22, n. 6, p. 1503-1517, 2013.
- CASTRO, L. A. et al. Occurrence, pathogenicity, and control of acanthocephalosis

caused by *Neoechinorhynchus buttnerae*: A review. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 29, n. 3, p. 1-7, 2020. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612020070>.

CESTARI, M. M.; GALETTI, P. M. Jr. Chromosome evolution in the genus *Serrasalmus* and cytotaxonomic considerations about Serrasalminae (Characidae, Pisces). **Brazilian Journal of Genetics**, v. 15, n. 3, p. 555–567. 1992b.

CESTARI, M. M.; GALETTI, P. M. Jr. Chromosome studies of *Serrasalmus spilopleura* (Characidae, Serrasalminae) from the Paraná-Paraguay River: evolutionary and cytotaxonomic considerations. **Copeia**, v. 1, p. 108–112. 1992a. <https://doi.org/10.2307/1446541>.

CHAGAS, E. C. et al. *Neoechinorhynchus buttnerae* parasitic infection in tambaqui (*Colossoma macropomum*) on fish farms in the state of Amazonas. **Boletim do Instituto de pesca**, Manaus, v. 45, n. 2, fev. 2019. DOI: 10.20950/1678-2305.2019.45.2.499

CHAGAS, E. C.; MACIEL, P. O.; AQUINO-PEREIRA, S. L. Infecções por acantocéfalos: Um problema para produção de peixes In: Tavares-Dias, M., Mariano, W. S. (Org.). **Aquicultura no Brasil: novas perspectivas**. v 1. São Carlos: Pedro & João Editores, 2015. pp. 305-328.

CIONE, A. L. et al. *Megapiranha paranensis*, a new genus and species of Serrasalmidae (Characiformes, Teleostei) from the upper Miocene of Argentina. **Journal of Vertebrate Paleontology**, v. 29, n. 2, p. 350-358, 2009.

COSTA, G. W. W. F.; CIOFFI, M. B.; BERTOLLO, L. A. C.; MOLINA, W. F. Transposable elements in Fish Chromosomes: A Study in the Marine Cobia Species. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 141, p. 126-132, 2013.

COSTA, O. T. F. da et al. The effects of stocking density on the hematology, plasma protein profile and immunoglobulin production of juvenile tambaqui (*Colossoma macropomum*) farmed in Brazil. **Aquaculture**, v. 499, p. 260-268, 2018. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2018.09.040

DA SILVA, H. C. M. et al. Impacts of Stress Caused by Copper Sulfate (CuSO₄) on the Genome of the Tambaqui (*Colossoma macropomum*): Quantification of Rex1 and Heterochromatic Profile. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 66, p. 1-10, 2023. DOI 10.1590/1678-4324-2023220170

DAGOSTA, F. C. P; PINNA, M. De. "The Fishes of the Amazon: Distribution and Biogeographical Patterns, with a Comprehensive List of Species," **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 431, p. 1-163, jun. 2019. <https://doi.org/10.1206/0003-0090.431.1.1>

DE OLIVEIRA, A. M.; VAL, A. L. Effects of climate scenarios on the growth and physiology of the Amazonian fish tambaqui (*Colossoma macropomum*) (Characiformes: Serrasalmidae). **Hydrobiologia**, v. 789, p. 167-178, 2017. DOI 10.2312/ActaFish.2017.5.1.1-9

DEZFULI, B. S. et al. Fish innate immunity against intestinal helminths. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 50, p. 274-287, 2016.

DIAS, M. K. R. et al. Parasitoses em tambaqui de oito pisciculturas da região Norte do Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, n. 4, p. 1070-1076, 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4162-7592>.

DO CARMO BARRETO, J. et al. Identificação da fauna endoparasitária do tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) cultivados no município de Cacaulândia-RO. **Revista Brasileira de Ciências da Amazônia/Brazilian Journal of Science of the Amazon**, v. 8, n. 4, p. 1-7, 2019.

EIGENMANN, Carl H. The Serrasalmiinae and Myliinae. **Ann Carnegie Mus**, v. 9, p. 226-272, 1915.

FAO – Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação. **A Situação Mundial da Pesca e da Aquicultura**: cumprindo os objetivos de desenvolvimento sustentável. Roma: FAO. 2018. 210p.

FARIAS, C. F. S. et al. Albendazole and praziquantel for the control of *Neoechinorhynchus buttnerae* in tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Aquaculture International**, v. 29, p. 1495-1505, 2021.

FAVARATO, R. M. et al. Chromosome mapping of Transposable Elements of the Rex Family in the bristle nose Catfish, *Ancistrus* (Siluriformes; Loricariidae), from the Amazon Region. **Journal of Heredity**, v. 108, n. 3, p. 254-261, 2017.

FAVARATO, R. M. et al. Comparative cytogenetics of Serrasalmidae (Teleostei: Characiformes): The relationship between chromosomal evolution and molecular phylogenies. **PLOS ONE**, v. 16, n. 10, 1-16, 2021. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0258003>

FAVARATO, R. M. et al. Cytogenetic characterization of two *Metynnis* species (Characiformes, Serrasalmidae) reveals B chromosomes restricted to the females. **Cytogenet Genome Res**, v. 158, n. 1, p. 38-45, out. 2019. <https://doi.org/10.1159/000499954> PMID: 31079097.

FERREIRA, A. M. V. et al. Chromosomal Mapping of Rex Retrotransposons in Tambaqui (*Colossoma macropomum* Cuvier, 1818) Exposed to Three Climate Change Scenarios. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 1, p. 1, 2019.

FISCHER, C.; MALTA, J. C. O.; VARELLA, A. M. B. A fauna de parasitas do tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) (Characiformes: Characidae) do médio rio Solimões (AM) e do baixo rio Amazonas (PA) e seu potencial como indicadores biológicos. **Acta Amazonica**, v. 33, n. 4, p. 651-662, 2023. doi:10.1590/S0044-59672003000400012

FRICKE, R.; ESCHMEYER, W. N.; FONG, J. D. Species by family/Subfamily, Eschmeyer's. **Catalog of Fishes**. 2022. Disponível em:

<<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesBy-Family.asp>>. Acesso em: 22 abr. 2023.

FUJIMOTO, R. Y. et al. **Doenças parasitárias e manejo profilático de tambaquis (*Colossoma macropomum*) na região do Baixo São Francisco**. Brasília: Embrapa, 2015. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1042153/1/DOC195.pdf>>. Acesso em: 05 nov. 2022.

GOLD, J. R. et al. Improved methods for working with fish chromosomes with a review of metaphase chromosome banding. **Journal of Fish Biology**, v. 37, p. 563-575, 1990.

GOMES, L. C.; SILVA, C. R. Impact of Pound management on tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier), production during growth-out phase. **Aquaculture Research**, v. 40, p. 825-832, 2009.

GOULDING, M.; BARTHEM, R.; FERREIRA, E. J. G. **The Smithsonian Atlas of the Amazon**. Washington; London: Smithsonian Books. 2003. 256 p.

HAGAS, E. C.; MACIEL, P.; AQUINO-PEREIRA, S. L. **Infecções por acantocéfalos: um problema para a produção de peixes**. In: Dias, M.T.; Mariano, W.S. Aquicultura no Brasil: novas perspectivas. São Carlos: Pedro & João Editores. v. 1, 2015. pp. 305-328.

HUNTER R. G. et al. Regulation of hippocampal H3 histone methylation by acute and chronic stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS**, v. 106, n. 49, p. 20912–20917, dez. 2009. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0911143106

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da pecuária municipal**, v. 44, Rio de Janeiro: IBGE, 2016. 53p.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa da Pecuária Municipal. **GEPEC/COAGRO**, Rio de Janeiro, v. 46, p.1-8, 2018. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2018_v46_br_info_rma_tivo.pdf>. Acesso em: 12 abr. 2022.

INOUE, L. A. K. et al. Cultivo de tambaqui em gaiolas de baixo volume: efeito da densidade de estocagem na produção de biomassa. **Ciência Animal Brasileira**, v. 15, n. 4, p. 437-443, 2014.

JÉGU, M. Subfamily Serrasalminae (Pacus and piranhas). In: REIS, R. E.; Kullander, S. O.; Ferraris Jr, C. J. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: Editora da Pontifícia Universidade Católica, 2003. pp. 182-196.

JERÔNIMO, G. T. et al. *Neoechinorhynchus buttnerae* (Acanthocephala) infection in farmed *Colossoma macropomum*: A pathological approach. **Aquaculture**, v. 469, p. 124-127, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.11.027>.

JESUS, C. O. ; AQUINO-PEREIRA, S. L. Potencial de *Lippia microphylla* cham. (Verbenaceae) como tratamento alternativo para acantocefalose no tambaqui

(colossoma macropomum). **Revista Brazilian Journal of Development**, v. 6, p. 6293-6305, 2020.

JUNK, W. J. The Amazon floodplain – a sink or source organic carbon. *Mitteilungen aus dem Geologische-Palaontologische Institut der Universität Hamburg*. **SCOPE/UNEP Sonderband**, v. 58, 267-283, 1985.

KAMPEN, E. J.; ZIJLSTRA, W. G. Standardization of hemoglobinometry. *In: BOROVICZÉNY, C. G. (Ed). Erythrocytometric methods and their standardization. **Bibl. Haematol.***, v. 18, p. 68-72, 1964.

KAZAZIAN, H. H. Mobile elements: drivers of genome evolution. **Science**, v. 303, p. 1626-1632, 2004.

KIDWELL, M.G. Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. **Genetica**, v. 115, n. 1, p. 49-63, 2002.

KIDWELL, M. G.; Lisch, D. R. Transposable elements and host genome evolution. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 15, p. 95-99, 2000.

KOCHHANN, D. et al. Biochemical and behavioral responses of the Amazonian fish *Colossoma macropomum* to crude oil: The effect of oil layer on water surface. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 111, p. 32-41, 2015.

KOLMANN, M. A. et al. Phylogenomics of piranhas and pacus (Serrasalminae) uncovers how dietary convergence and parallelism obfuscate traditional morphological taxonomy. **Systematic Biology**, v. 70, n. 3, p. 576-592, 2021. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syaa065> PMID: 32785670.

KOLMANN, M. A. et al. Tooth and consequences: Heterodonty and dental replacement in piranhas and pacus (Serrasalminae). **Evolution & Development**, v. 21, n. 5, p. 247-262, set. 2019. <https://doi.org/10.1111/ede.12306>.

KRITSKY, D. C.; THATCHER, V. E.; KAYTON, R. J. Neotropical Monogenoidea. 2. The Anacanthorinae Price, 1967, with the proposal of four new species of *Anacanthorus* Mizelle & Price, 1965, from Amazonian fishes. **Acta Amazonica**, v. 9, n. 2, p. 355-361, 1979. doi:10.1590/1809-43921979092355

LAUDENCIA-CHINGCUANCO, D.; FOWER, D. B. Genotype – dependent bursts of transposable element expression in crowns of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) during cold acclimation. **Comparative and Functional Genomics**, v. 2012, p. 1-9, 2011. Doi: 10.1155/2012/2325230.

LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANDBERG, A. A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**, v. 52, p. 201-220, 1964.

LOURENÇO, F. S. Ocorrência de *Neoechinorhynchus (Neoechinorhynchus) buttnerae* Golvan, 1956 (Acantocephala: Neochinorhynchidae) em *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) (Characiformes: Serrasalminae) de uma piscicultura da Amazônia brasileira proveniente. **Folia Amazônica**, v. 26, n. 1, p. 1-8, 2017.

<http://dx.doi.org/10.24841/fa.v26i1.414>

MACHADO, A. A. Estudios sobre la sistemática de la subfamilia serrasalminae (teleostei, characidae). Parte II. Discusión sobre la condición monofilética de la subfamilia. **Acta Biologica Venezuelica**, v. 11, n. 4, p. 145–195, 1983.

MALTA, J. C. O.; VARELLA, A. M. B. Os argulídeos (Crustacea: Argulidae) da Amazônia Brasileira. Aspectos da ecologia de *Dolops striata* Bouvier, 1899 e *D. carvalhoi* Lemos de Castro, 1949. **Acta Amazonica**, v. 13, n. 2, p. 299-306, 1983. doi: 10.1590/1809-43921983132299

MALTA, J. C. O. et al. Infestações maciças por acantocéfalos, *Neoechinorhynchus buttnerae* Golvan, 1956, (Eoacanthocephala: Neoechinorhynchidae) em tambaquis jovens, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) cultivados na Amazônia Central. **Acta Amazonica**, v. 31, n. 1, p. 133-143, 2001. <http://dx.doi.org/10.1590/1809-43922001311143>.

MARTÍNEZ, J. G.; et al. SNPs markers for the heavily overfished 30 tambaqui *Colossoma macropomum*, a Neotropical fish, using next-generation sequencing-based de novo genotyping. **Conservation Genetics Resources**, v. 9, p. 29-33, 2017.

MARTINS, M. L. et al. Hematology and condition factor of tui chub and fathead minnow parasitized by nematode from upper Klamath Lake, Oregon, USA. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 126, p. 257–262, 2017.

MATEUSSI, N. T. B. et al. Phylogenomics of the Neotropical fish family Serrasalminidae with a novel intrafamilial classification (Teleostei: Characiformes). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 153, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2020.106945> PMID: 32861778.

MATOS, L. V. et al. Morphological and histochemical changes associated with massive infection by *Neoechinorhynchus buttnerae* (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) in the farmed freshwater fish *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818 from the Amazon State, Brazil. **Parasitology Research**, v. 116, n. 3, p. 1029-1037, 2017.

MATOS, L. V. et al. Alterações morfológicas e histoquímicas associadas à infecção maciça por *Neoechinorhynchus buttnerae* (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) em peixes de água doce cultivados *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818 do Estado do Amazonas, Brasil. **Pesquisa de Parasitologia**, v. 116, n. 3, p. 1029- 1037, 2017. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-017-5384-3>. PMID: 28124738.

MAZZUCHELLI, J.; MARTINS, C. Genomic organization of repetitive DNAs in the cichlid fish *Astronotus ocellatus*. **Genetica**, v. 136, p. 461-469, 2009.

MOLNÁR, K.; BÉKÉSI, L. Description of a new *Myxolobus* species, *M. colossomatis* n. sp. from the teleost *Colossoma macropomum* of the Amazon River basin. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 9, p. 57-63, 1993. doi:10.1111/j.1439-0426.1993.tb00388.x

MORAES, J. N. **Caracterização cromossômica de seis espécies de peixes da família Curimatidae (Characiformes) da Amazônia**. 2021. 62 f. Dissertação

(Mestrado em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva) – Programa de Pós-graduação em Genética Conservação e Biologia evolutiva – PPG-GCBEV, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 2021.

MORAIS, A. M. et al. A fauna de parasitos em juvenis de tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) (Characidae: Serrasalminae) criados em tanques-rede em lago de várzea da Amazônia Central. **Biologia Geral e Experimental**, v. 9, n. 1, p. 14-23, 2009.

MOREY, G. A.; MALTA, J. C. O. Metazoários Parasitas das Narinas do tambaqui *Colossoma Macropomum* (Cuvier, 1818) (Characiformes: Characidae) coletados em Lagos de Várzea da Amazônia Central, Brasil. **Folia Amazonica**, v. 25, n. 1, p. 71-76, 2016.

NAKAYAMA, C. M.; FELDBERG, E.; BERTOLLO, L. A. C. Karyotype differentiation and cytotaxonomic considerations in species of Serrasalmidae (Characiformes) from the Amazon basin. **Neotropical Ichthyology**, v. 10, n. 1, p. 53-58, 2012. <http://doi.org/10.1590/S1679-62252012000100005>.

NAKAYAMA, C. M. et al. Karyological Evidence for a Cryptic Species of Piranha within *Serrasalmus rhombeus* (Characidae, Serrasalminae) in the Amazon. **Copeia**, v. 2001, n. 3, p. 866-869. 2001. doi:10.2307/1448315. <<http://www.jstor.org/stable/1448315>.

NAKAYAMA, C. M.; FELDBERG, E.; BERTOLLO, L. A. C. Mapping of ribosomal genes and chromosomal markers in three species of the genus *Serrasalmus* (Characidae, Serrasalminae) from the Amazon basin. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 4, p. 868-873, 2008. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572008005000018>

NAKAYAMA, C. M.; PORTO, J. I. R.; FELDBERG, E. Ocorrência de dois cito´tipos em *Serrasalmus spilopleura* Kner, 1958 (Characiformes, Serrasalmidae) na região de confluência dos rios Negro e Solimões, Amazonas, Brasil. **Acta Amazonica**; v. 30, n. 1, p. 149-154, 2000.

NELSON, J. S.; GRANDE, T. C.; WILSON, M. V. H. **Fishes of the world**. 5. ed. Nova York: Wiley, 2016.

NEWMAN, J. D.; TURNER, A. P. Home blood glucose biosensors: a commercial perspective. **Biosensors and bioelectronics**, v. 20, n. 12, p. 2435-2453, 2005.

NICKOL, B. B. Phylum Acanthocephala. In: WOO, P.T.K. (Ed.). **Fish Diseases and Disorders: Protozoan and Metazoan Infections**. Canadá: University of Guelph, 2006. pp. 444-465.

NIRCHIO, M. et al. Genotoxic effects of mercury chloride on the Neotropical fish *Andinoacara rivulatus* (Cichlidae: Cichlasomatini). **Revista de Biología Tropical**, v. 67, n. 4, p. 745-754, 2019.

NIRCHIO, M. et al. Caracterização citogenética de descendentes híbridos entre *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1818) e *Piaractus brachypomus* (CUVIER, 1817) de Caicara del Orinoco, Venezuela. **Cariologia**, v. 56, n. 4, p. 405-411, 2003.

<http://doi.org/10.1080/00087114.2003.10589351>.

OLIVEIRA, C. et al. 1988b. Supernumerary chromosomes, Robertsonian rearrangement and multiple NORs in *Corydoras aeneus* (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae). **Caryologia**, v. 41, p. 227-236, 1988b.

OLIVEIRA, C. P. F. **Efeito de cobre e chumbo, metais pesados presentes na água de formação derivada da extração do petróleo da província petrolífera do Urucum, sobre o tambaqui, *Colossoma macropomum* (Curvier, 1818)**. 2003. 70 f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Água doce e Pesca Interior) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais, do convênio IMPA/UFAM, Manaus, 2003.

OLIVEIRA, C. et al. *Chromosome formulae of Neotropical freshwater fishes*. **Revista Brasileira de Genética**, v. 11, p. 577-624, 1988.

OLIVEIRA, M. S. B. et al. Endofauna helmíntica de quatro espécies de peixes do baixo rio Jari, afluente da bacia amazônica no Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 45, n. 1, p. 1-7, 2019. [http:// dx.doi.org/10.20950/1678-2305.2019.45.1.393](http://dx.doi.org/10.20950/1678-2305.2019.45.1.393).

OLIVEIRA, S. R. K. S. et al. Study of the endoparasites in tambaquis, *Colossoma macropomum*, from fish farms of Jamari Valley, State of Rondônia. **Enciclopédia biosfera**, Goiânia, v.11, n. 21, p. 1026-1041, 2015.

ORTÍ, G. et al. Phylogeny of the Serrasalminidae (Characiformes) based on mitochondrial DNA sequences. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 1, p. 343-351, 2008. doi:10.1590/S1415-47572008000200030.

PEREIRA J. N.; MOREY, G. A. M. First record of *Neoechinorhynchus buttnerae* (Eoacantocephala, Neochinorhynchidae) on *Colossoma macropomum* (Characidae) in a fish farm in Roraima, Brazil. **Acta Amazonica**, v 48, n. 1, p. 42-45, 2018. <http://dx.doi.org/10.1590/1809-4392201702411>.

PILARSKI, F., ROSSINI, A. J.; CECCARELLI, P. S. Isolation and characterization of *Flavobacterium columnare* from four tropical fish species in Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, n. 2, p. 409-414, 2008. doi: 10.1590/S1519-69842008000200025

PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J. W. Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the Natural Academy of Science**, v. 83, p. 2934-2938. 1986.

PURIVIROJKUL, W. **Histological Change of Aquatic Animals by Parasitic Infection, Histopathology** - Reviews and Recent Advances, Enrique Poblet Martinez, IntechOpen, 2012. DOI: 10.5772/52769. Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/histopathology-reviews-and-recent-advances/histological-change-of-aquatic-animals-by-parasitic-infection>. Acesso em: 30 maio 2023.

RIBEIRO LB. Chromosomal physical mapping of repetitive elements in *Colossoma macropomum* (Characiformes, Serrasalminidae) associated with fish farming. **Doctoral Thesis**, National Institute for Research in the Amazon. 2013.

RIBEIRO, F. M. et al. Alimentação e nutrição de Pirapitinga (*Piaractus brachypomums*) e Tambaqui (*Colossoma macropomum*): revisão. **PUBVET**, v.10, n.12, p.873-882. 2016. <http://dx.doi.org/10.22256/pubvet.v10n12.873-882>.

RIBEIRO, L. B. et al. Chromosomal mapping of repetitive sequences (Rex3, Rex6, and rDNA genes) in hybrids between *Colossoma macropomum* (Cuvier,1818) and *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). **Zebrafish**, v. 2, p. 155-160, 2017. <http://doi.org/10.1089/zeb.2016.1378>

RIBEIRO, L. B.; MATOSO, D. A.; FELDBERG, E. Chromosome mapping of repetitive sequences in four Serrasalminidae species (Characiformes). **Genetics and Molecular Biology**, v. 37, n. 1, p. 46-53, 2014. doi:10.1590/S1415- 47572014000100009

RITTER, F. et al. Utilização do método Monte Carlo para avaliação econômica de policultivos de jundiás, carpas e tilápias-do-nilo como uma alternativa de modelo de cultivo de peixes para pequenas propriedades. **Revista Produção Online**, v.14, n. 4, p. 1292-1315. 2014.

RODRIGUES, A. P. O. Nutrição e alimentação de tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 40, n. 1, p. 135-145. 2014.

SADOUL, B.; GEFFROY, B. Measuring cortisol, the major stress hormone in fishes. **Journal of Fish Biology**, v. 94, n. 4, p. 540-555, 2019.

SAINT-PAUL, U. Native fish species boosting Brazilian's aquaculture development. **Acta Fisheries Aquatic Resources**, v. 5, n. 1, p. 1-9, 2017.

SANTOS, C. P.; MACHADO, P. M.; SANTOS, E. G. N. **Acanthocephala**. In: PAVANELLI, G. C.; TAKEMOTO, R.M.; EIRAS, J.C. Parasitologia. Peixes de Água Doce. Maringá: Eduem, 2013. pp. 353-370.

SANTOS, F. A. et al. Cytogenetic variation of repetitive DNA elements in *Hoplias malabaricus* (Characiformes – Erythrinidae) from white, black and clear water rivers of the Amazon Basin. **Genetics and Molecular Biology**, v. 39, n. 1, p. 40-48, 2016.

SANTOS, M. A. et al. (2018). Protozoan and metazoan parasites of juvenile tambaqui *Colossoma macropomum* farmed in the Lower São Francisco, Brazil. **ActaFish**, v. 6, n. 1, p. 29-34, 2018.

SCHNEIDER, C. H et al. Evolutionary dynamics of retrotransposable elements Rex1, Rex3 and Rex6 in Neotropical cichlid genomes. **BMC Evolutionary Biology**, v. 13, 152. doi:10.1186/1471-2148-13-152, 2013.

SILVA, C.R.; GOMES, L.C.; BRANDÃO, F.R. Effect of feeding rate and frequency on tambaqui (*Colossoma macropomum*) growth, production and feeding costs during the first growth phase in cages. **Aquaculture**, v. 264, p. 135-139, 2007.

SILVA, F. A. et al. Genomic Organization Under Different Environmental Conditions: *Hoplosternum Littorale* as a Model. **Zebrafish**, v. 13, n. 3, p. 197-208, 2016.

<https://doi.org/10.1089/zeb.2015.1237>

SILVA, G. S. et al. Ras oncogene and Hypoxia-inducible factor-1 alpha (hif-1) expression in the Amazon fish *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) exposed to benzo[a]pyrene. **Genetics and Molecular Biology**, v. 40, n. 2, p. 491-501, 2017.

SILVA, G. E. A. et al. Análise do perfil hematológico e parasitológico de comunidades ribeirinhas da região amazônica. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 3, p. 1-9, 2021.

SILVA, R. M. et al. Fauna parasitária em tambacu híbrido de piscicultura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 8, p. 1049-1057, 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2013000800034>.

SIOLI, H. **Amazônia: Fundamentos da Ecologia da maior região de florestas tropicais**. Terceira edição. Rio de Janeiro: Editora Vozes Ltda, 1983. 36p.

SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**, v. 75, p. 304-306, 1972.

TAVARES-DIAS, M. et al. New hosts and distribution records of *Braga patagonica*, a parasite Cymothoidae of fishes from the Amazon. **Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology**, v. 18, n. 1, p. 91-97, 2014. doi: 10.14210/bjast.v18n1.p91-9

TAVARES-DIAS, M. et al. Changes in blood parameters of hybrid tambacu fish parasitized by *Dolops carvalhoi* (Crustacea, Branchiura), a fish louse. **Veterinarski Arhiv**, v. 77, n. 4, p. 355, 2007.

TAVARES-DIAS, M.; CHAGAS, E. C.; MACIEL, P. O. **Parasitismo e seus efeitos sanguíneos e histopatológicos em peixes**. Aquicultura na Amazônia: estudos técnico-científicos e difusão de tecnologias. 1ed Ponta Grossa: Atena, v. 1, p. 294-310, 2021.

TAVARES-DIAS, M.; MARTINS, M.L. Estimativa geral das perdas causadas por doenças nas pisciculturas brasileiras. **Jornal de Doenças Parasitárias**, v. 41, n. 4, p. 913-918, 2017. <http://dx.doi.org/10.1007/s12639-017-0938-y>. PMID: 29114119.

TAVARES-DIAS, M.; OLIVEIRA, S. R. A review of the blood coagulation system of fish. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 7, n. 2, 2009.

THATCHER, V. E.; BOEGER, W. A. The parasitic crustaceans of fishes of the Brazilian Amazon, 13. *Gamidactylus jaraquensis* gen. et sp. nov. (Copepoda: Poecilostomatoidea: Vaigamidae) from nasal fossae of *Semaprochilodus insignis* (Schomburgki). **Amazoniana**, v. 8, n. 3, p. 421-426, 1984.

THATCHER, V. E.; KRITSKY, D. C. Neotropical Monogenoidea. 4. *Linguadactyloides brinkmanni* gen. et sp. n. (Dactylogyridae: Linguadactyloidea: subfam.n.) with observations on its pathology in a Brazilian freshwater fish, *Colossoma macropomum* (Cuvier). **Proceedings of the Helminthological Society of Washington**, v. 50, n. 2,

p. 305-311, 1983.

THATCHER, V. E.; PAREDES, V. A parasitic copepod *Perulernaea gamitanae* gen. et sp. nov. (Cyclopoida: Lernaeidae), from the nasal fossae of a Peruvian Amazon food fish. **Amazoniana**, v. 9, n. 2, p. 169-175, 1985.

THOMPSON, A. W. et al. A time-calibrated, multi-locus phylogeny of piranhas and pacus (Characiformes: Serrasalminidae) and a comparison of species tree methods. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 81, p. 242–257, 2014. doi:10.1016/j.ympev.2014.06.018

VALLADÃO, G. M. R.; GALLANI, S. U.; PILARSKI, F. South American fish for continental aquaculture. **Reviews in Aquaculture**, v. 10, p. 351-369, 2018. <https://doi.org/10.1111/raq.12164.683757>

VAN DER SLEEN, P.; ALBERT, J. S. **Field guide to the fishes of the Amazon, Orinoco and Guianas**. Princeton University Press, 2017. 464p.

VOLFF, JN. et al. Evolution and discontinuous distribution of *Rex3* retrotransposons in fish. **Molecular Biology and Evolution**, v.18, p. 427-431, 2001a.

VOLFF, JN. et al. Non-LTR retrotransposons encoding a restriction enzyme-like endonuclease in vertebrates. **Journal of Molecular Evolution**, v. 52, p. 351-360, 2001b.

VOLFF, J.-N.; KÖRTING, C.; SCHARTL, M. Multiple lineages of the non-LTR retrotransposon *Rex1* with varying success in invading fish genomes. **Molecular Biology and Evolution**, v. 17, n. 11, p. 1673-1684, nov. 2000. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026266. PMID: 11070055

VOLFF, J.-N.; KÖRTING, C.; SCHARTL, M. The nonLTR retrotransposon *Rex3* from the fish *Xiphophorus* is widespread among teleosts. **Molecular Biology and Evolution**, v. 16, n. 11, p. 1427-1438, nov. 1999. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026055. PMID: 10555274

WANSTALL, S.T.; ROBOTHAM, P.W.J.; THOMAS, J.S. Pathological changes induced by *Pomphorhynchus laevis* Muller (Acanthocephala) in the gut of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, v. 72, p. 105-114, 1986. <https://doi.org/10.1007/BF00927741>

WOOD, C. M. et al. Nitrogen metabolism in tambaqui (*Colossoma macropomum*), a neotropical model teleost: hypoxia, temperature, exercise, feeding, fasting, and high environmental ammonia. **Journal of Comparative Physiology**, v. 187, p. 135–151, 2017.