

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA
(Associação ampla entre a UEPG e a UNICENTRO)

ELIZA VIOLA LEAL

ESTUDOS DE TRANSCRIPTOMA EM *Astyanax* aff. *scabripinnis*
(JENYNS, 1842)

PONTA GROSSA
2015

ELIZA VIOLA LEAL

ESTUDOS DE TRANSCRIPTOMA EM *Astyanax aff. scabripinnis*
(JENYNS, 1842)

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta Grossa em associação com a Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração em Biologia Evolutiva)

Orientador: Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni.
Co-orientadores: Prof. Dr. Juan Pedro M. Camacho
Prof. Dr. Mohammed Bakkali

PONTA GROSSA
2015

L435 Leal, Eliza Viola
Estudos de transcriptoma em *Astyanax aff. scabripinnis* (Jenyns, 1842) /
Eliza Viola Leal. Ponta Grossa, 2015.
60 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Área de Concentração:
Biologia Evolutiva), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni.
Coorientador: Prof. Dr. Juan Pedro M Camacho.
Coorientador: Prof. Dr. Mohammed Bakkali.

1. Cromossomo. 2. Microarray. 3. RNAseq.. I. Artoni, Roberto Ferreira. II.
Camacho, Juan Pedro M. III. Bakkali, Mohammed. IV. Universidade Estadual de
Ponta Grossa. Biologia Evolutiva. V.T.

CDD: 576



Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva



Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa (Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética) e a Universidade Estadual do Centro Oeste (Departamento de Ciências Biológicas).



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº. 09/2015

Ata referente à Defesa de Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, uma Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa e a Universidade Estadual do Centro-Oeste, pela candidata **Eliza Viola Leal**.

Aos sexto dias do mês de março de dois mil e quinze, no auditório do Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, sob a presidência do Dr. Roberto Ferreira Artoni em sessão pública, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação do (a) aluno (a) **Eliza Viola Leal**, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-área de concentração Biologia Evolutiva, visando o título de Mestre, constituída pelos: Dr. Roberto Ferreira Artoni (Orientador UEPG), Dr. Marcelo de Bello Cioffi (UFSCar) e Dra. Jesiane Stefania da Silva Batista (UEPG). Atestada pela colenda Congregação do Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia Evolutiva. Iniciados os trabalhos a presidência deu conhecimento aos membros da Comissão e ao (a) candidato (a) das normas que regem a defesa de dissertação. A seguir a candidata passou a defesa de sua dissertação intitulada: **"Estudos de transcriptoma em *Astyanax aff. scabripinnis* (Jenyns, 1842)"**. Encerrada a defesa, procedeu-se ao julgamento e a Comissão Examinadora considerou o (a) candidato (a) **APROVADA**. A Presidência ressaltou que a obtenção do título de Mestre está condicionada ao disposto da atual aprovação de outorga do Título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de concentração em Biologia Evolutiva, **com validade de trinta dias**; assim como comprovante de envio de um artigo científico proveniente de seu trabalho de dissertação a revista com Qualis igual ou superior a B1 (Biodiversidade – Capes) **até o prazo máximo de 60 dias após a defesa**; o não depósito da versão definitiva de Dissertação, bem como as cópias em CD (PDF) com todas as correções feitas e atestadas pelo (a) orientador (a) assim como o comprovante de envio do artigo nestes prazos anulará toda possibilidade de outorga definitiva do Título, recebimento de Certidão e outros documentos, bem como a solicitação do Diploma. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Observação (se necessário)

Alteração de Título: sim ☐ não ☒

Novo título: _____

Ponta Grossa, 06 de março de dois mil e quinze.

Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni (UEPG) _____

Prof. Dr. Marcelo de Bello Cioffi (UFSCar) _____

Profa. Dra. Jesiane Stefania da Silva Batista (UEPG) _____

Dedico este trabalho às minhas mães Maria Elisabeth Viola e Angela Maria Rezende Viola e ao meu companheiro Eduardo da Silva Duboc.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha mãe, Maria Elisabeth Viola, e à minha tia, Angela Maria Rezende Viola, pela vida, pelos cuidados, pelo amor. Por todos os ensinamentos dados. Por me tornarem quem sou hoje e por me permitirem voar. Se cheguei até aqui foi porque vocês me permitiram isso. Amo vocês incondicionalmente. Ao meu amor, Eduardo da Silva Duboc, pelo apoio em todos os sentidos. Pelo amor, carinho e compreensão. Por estar acreditando em mim e trilhando comigo esse caminho. Te amo. A toda minha família Viola, pelo apoio e carinho dados, por tudo que me ensinaram, pelo tempo que me permitiram aprender, com cada um, coisas que levo hoje comigo e que me ajudaram a construir quem eu sou. Vocês vão sempre estar presentes em meu coração, mesmo que estejam distantes. À família Silva Duboc por também fazer parte desse caminho trilhado, pela chance de conviver e por tudo que fizeram por mim. À minha família de quatro patas, todos os muitos, sem exceção, com vocês eu aprendi valiosas lições; aos que estão comigo hoje, Brigith, Mozi e Xuca, vocês foram muito importantes neste caminho.

Aos amigos, de longe, em especial Thaiana Monzo, Felipe Cruz, Esdras Barbosa, Cristine Nascimento, Ana Carolina Farani e Felipe Martins pela longa amizade, que resiste ao tempo e a distância. Por entenderem a minha ausência e por me apoiarem. Aos amigos, de perto, em especial Emmanuele Maciel, Marcio Petrucci, Karine Petilo, Foppe Duboc, Flaviane Vollenhaupt e Luiz Martins, pela presença constante na minha vida, saídas, papos e alegrias compartilhadas. À Luiz Oliveira pelos mantras que me acalmaram e Patrícia Barbosa por toda orientação, ensinamentos e amizade dados. Obrigada pela oportunidade de conviver com vocês. À minha grande família “ruralina”, principalmente as meninas do F1 e Bio 2007-I, pessoas que passaram pela minha vida e deixaram um pouquinho de si, pessoas que

estarão guardadas para sempre em meu coração. Família e amigos, eu amo cada um de vocês!!!

A todos do laboratório de Genética Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta Grossa, que apenas pela presença e conversas me ajudaram a seguir com este trabalho. Aos que me iniciaram na pesquisa, Prof. Dr. Fabiano Salgueiro, Prof^a. Dr^a. Maria Amélia Menk Soares e a Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Cunha Dornelles, por terem me mostrado o caminho. Ao Prof. Dr. Mateus Santos, por toda ajuda dada ao trabalho. À Regina Sasahara, pelos ensinamentos, paciência e carinho compartilhados em apenas uma semana, porém muito valiosos para mim. Ao meu orientador, Prof. Dr. Roberto Artoni, primeiramente por ter me aceitado como orientada, por acreditar em mim e ter me dado a chance de realizar mais um sonho, também por todos os ensinamentos e paciência dados. A todos vocês, meu muito obrigada!

À Universidade Estadual de Ponta Grossa e a todos do curso de Pós Graduação em Biologia Evolutiva, pela oportunidade e à CAPES pela concessão da bolsa de Mestrado.

O conhecimento torna a alma jovem e
diminui a amargura da velhice.
Colhe, pois, a sabedoria.
Armazena suavidade para o amanhã.
Leonardo da Vinci

RESUMO

Os peixes são um grupo amplamente diversificado e distribuído, sendo que os Characiformes são a ordem com maior número de espécies na região Neotropical. Dentro desta ordem, o gênero *Astyanax* se destaca pela incerteza taxonômica e grande diversidade de suas espécies, constituindo assim a lista de *Incertae sedis*. *Astyanax scabripinnis* é um complexo de espécies deste gênero, descrito por Jenyns em 1842, e que possui uma ampla variabilidade tanto morfológica quanto cariotípica entre os seus indivíduos e suas populações. Dentro do complexo há a presença de cromossomos extranumerários, também conhecidos como cromossomos B, que estão presentes em alguns indivíduos de determinadas populações. Este cromossomo ainda não tem uma função reconhecida neste complexo, porém em outras espécies onde é encontrado já mostrou sinais de transcrição. O estudo de transcriptomas, utilizando como ferramentas sequenciadores de próxima geração (RNAseq) ou ensaios de microarranjos, estão sendo amplamente realizados para determinação de diferenciação na expressão de genes entre indivíduos. O presente estudo, utilizando-se destas ferramentas, mostrou em tecido gonadal a diferenciação na expressão de genes entre fêmeas que são portadoras e as que não são portadoras do cromossomo extranumerário, assim como entre os sexos. Isso pode ser evidenciado em diferentes ensaios, primeiramente na análise transcriptômica por RNAseq e também pelo ensaio de microarranjos. Os resultados sugerem a participação do cromossomo B na transcrição de genes gonadais de fêmeas de *Astyanax* aff. *scabripinnis*. Os ensaios de microarranjos corroboram os achados por sequenciamento de próxima geração e também mostraram a diferenciação na expressão gênica entre fêmeas e machos.

Palavras-chave: cromossomo B; *microarray*; RNAseq.

ABSTRACT

Fish are a widely diverse group and distributed, and the Characiformes are the order with the largest number of species in the Neotropics. Within this order, the genus *Astyanax* is distinguished by uncertainty and taxonomic diversity of their species, constituting the list of *Incertae sedis*. *A. scabripinnis* is a species complex of this genus, described by Jenyns in 1842, and has a wide variability morphologic and karyotype among its individuals and their populations. Within the complex there is the presence of supernumerary chromosomes, also known as B chromosomes that are present in some individuals to certain populations. This chromosome does not have a recognized role in this complex, but in other species where it is found already showed transcription signals. The transcriptome study, using as tools the next generation sequencers (RNAseq) or microarray assays are widely carried out to determine difference in gene expression between individuals. This study, using these tools, shown in gonadal tissue differentiation in gene expression between females who are suffering and those who do not carry the supernumerary chromosome, as well as between the sexes. This can be evidenced in different tests, first in transcriptomics analysis RNAseq and also by microarray assay. The results suggest the involvement of chromosome B in the transcription of female gonadal genes in *Astyanax* aff. *scabripinnis*. The microarray tests corroborate the findings by next generation sequencing and also showed the difference in gene expression between males and females.

Keywords: B chromosome; microarray; RNAseq.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Exemplar de <i>Astyanax aff. scabripinnis</i> coletado em Ribeirão Grande (Campos do Jordão-SP).....	13
Figura 2: Cariótipo de <i>Astyanax scabripinnis</i> com $2n = 51$. Fonte: A autora	14
Figura 3: Representação da possível origem de alguns cromossomos B em <i>A. scabripinnis</i> (Moreira-Filho et al., 2004)	15
Figura 4: Imagem retirada de Sanger et al., 1977, mostrando gel de poliacrilamida com o resultado de um sequenciamento.	18
Figura 5: Imagem ilustrativa com dados retirados de Illumina (2010), mostrando como ocorre o sequenciamento.....	20
Figura 6: Imagem retirada do protocolo da Agilent Technologies, mostrando as etapas de um ensaio de microarray. Neste protocolo as amostras de RNA são inicialmente convertidas em cDNA, para então serem marcadas com os respectivos fluoróforos (Cy3 ou Cy5), formando então uma molécula de RNA complementar (cRNA). As amostras já marcadas podem então ser misturadas e adicionadas à lâmina com oligonucleotídeos para hibridação.....	22
Figura 7: Imagem ilustrativa dos locais de coleta, Córrego Fazenda Lavrinha e Rio Ribeirão Grande, Estado de São Paulo, Brasil.....	25
Figura 8: Metáfase representativa de indivíduos de <i>A aff. scabripinnis</i> , população Córrego Fazenda Lavrinha com ausência (A) e presença (B) do cromossomo B confirmado por bandamento C, onde está evidenciado o cromossomo B totalmente heterocromático (seta), marcado pela técnica.	34
Figura 9: Gráfico Profile Plot e dendograma, gerados através do software Gene Spring, mostrando diferenciação da expressão entre machos e fêmeas de <i>A. aff. scabripinnis</i> . A diferenciação sexual é mostrada em uma escala de cores, onde azul representa genes menos expressos, amarelos com expressão normalizada e vermelho mais expressos em relação ao controle.	35
Figura 10: Gráfico Profile Plot e dendograma, gerados através do software Gene Spring, mostrando diferenciação da expressão em fêmeas de <i>A aff. scabripinnis</i> com presença e ausência do cromossomo B. A diferenciação na expressão dos genes é mostrada em uma escala de cores, onde azul representa genes menos expressos,	

amarelo com expressão normalizada e vermelho mais expressos em relação ao controle.	36
Figura 11: Metáfase de indivíduo $2n = 50 + 1$ da população de Ribeirão grande, evidenciando cromossomo B marcado com sonda. Barra de 10 μ m.	44
Figura 12: Mapa de processos biológicos gerado a partir do transcriptoma total de gônadas de fêmeas de <i>Astyanax</i> aff. <i>scabripinnis</i>	45
Figura 13: Diagrama de Venn e gráfico mostrando a diferença numérica de expressão dos genes em indivíduos de <i>A. aff. scabripinnis</i> com presença e ausência de cromossomo B.	46
Figura 14: Mapa de processos biológicos gerado a partir do transcriptoma total de gônadas de fêmeas de <i>Astyanax</i> aff. <i>scabripinnis</i> , sem a presença do cromossomo B.	47
Figura 15: Mapa de processos biológicos gerado a partir do transcriptoma total de gônadas de fêmeas de <i>Astyanax</i> aff. <i>scabripinnis</i> , com a presença do cromossomo B.	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tabela de comparação dos métodos de sequenciamento de Sanger e os métodos de próxima geração	19
Tabela 2: Dados de numeração, sexo, ausência ou presença de cromossomo B e RIN dos indivíduos.	35
Tabela 3: Dados de numeração, sexo, ausência ou presença de cromossomo B e RIN dos indivíduos	44

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 <i>Astyanax scabripinnis</i>	13
1.2 CROMOSSOMO B.....	14
1.3 TRANSCRIPTOMA	16
1.4 SEQUENCIAMENTO DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS.....	17
1.5 MICROARRAY	20
1.6 BIOINFORMÁTICA	22
2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	24
3 MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 COLETA E MATERIAL BIOLÓGICO.....	25
3.2 PREPARAÇÕES E ANÁLISES CITOGENÉTICAS	26
3.3 EXTRAÇÃO DO RNA.....	26
3.4 SEQUENCIAMENTO NGS E ANÁLISES.....	27
3.5 ENSAIOS DE MICROARRANJOS	28
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5 CONCLUSÕES	51
REFERÊNCIAS.....	52
ANEXO A - PREPARAÇÕES CITOGENÉTICAS	59
ANEXO B - HETEROCROMATINA CONSTITUTIVA (BANDA C)	60

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Astyanax scabripinnis*

Astyanax é um gênero da ordem Characiformes, pertencente à família Characidae, descrito por Baird e Girard em 1854, popularmente conhecidos como lambaris ou piabas. São peixes pequenos, geralmente menores que 15 cm de comprimento, alongados, possuem linha lateral completa, duas fileiras de dentes pré-maxilares, a primeira com muitos dentes e a segunda com 5, e dentes mandibulares variando de nenhum a dez (EIGENMAN, 1921).

Astyanax scabripinnis (Figura 1) é uma espécie descrita por Jenyns em 1842 e tem sido caracterizada como um complexo de espécies, por possuir variações morfológicas e cromossômicas dentre seus indivíduos (MOREIRA-FILHO; BERTOLLO, 1991). Por apresentar esta grande diversidade morfológica e cariotípica, tem sido um excelente material para estudos evolutivos (FERRO *et al.*, 2001).

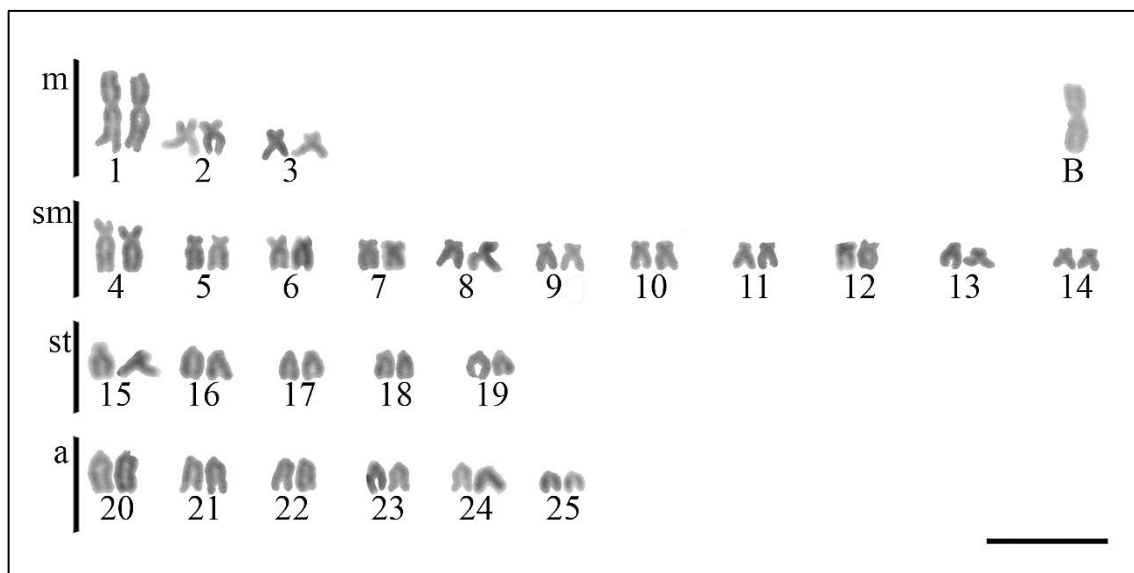
Figura 1: Exemplar de *Astyanax* aff. *scabripinnis* coletado em Ribeirão Grande (Campos do Jordão-SP).



O conjunto cromossômico (cariótipo) mais encontrado em *A. scabripinnis* é de indivíduos com número diploide ($2n$) igual a 50 cromossomos, como ocorre na maioria das espécies do gênero *Astyanax* (FAUAZ *et al.*, 1994), porém existem indivíduos com $2n = 46$ a $2n = 50$ (MOREIRA-FILHO; BERTOLO, 1991). Nesta espécie também são relatadas triploidias, tendo seu cariótipo representado por $2n = 3x = 75$ cromossomos (FAUAZ *et al.*, 1994). Ainda podemos citar a presença de cromossomos

supranumerários, ou cromossomos B (Figura 2), em indivíduos deste complexo (SALVADOR; MOREIRA-FILHO, 1992).

Figura 2: Cariótipo de *Astyanax scabripinnis* com $2n = 51$. Fonte: A autora.



São encontrados diferentes tipos de cromossomo B em *A. scabripinnis*, como um grande metacêntrico, similar ao primeiro par de cromossomos, um grande submetacêntrico e um pequeno metacêntrico, podendo as três formas coexistir em uma mesma população (FERRO *et al.*, 2003), adicionalmente um mesmo indivíduo pode possuir dois cromossomos B com morfologias diferentes (MACHADO, 2012). Sendo que microcromossomos B também já foram encontrados (MIZOGUCHI; MARTINS SANTOS, 1997).

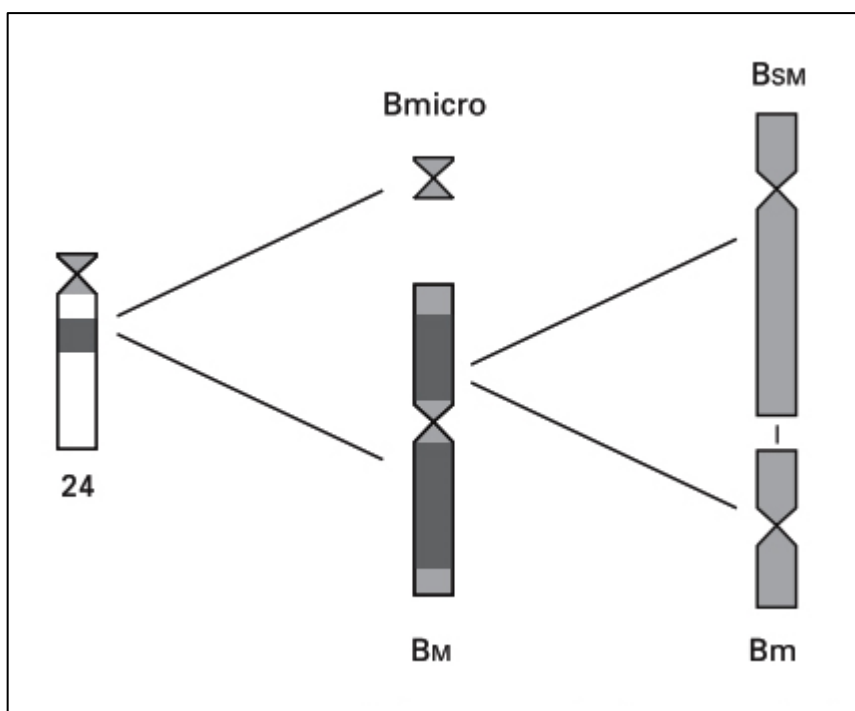
1.2 CROMOSSOMO B

Os cromossomos B, ou cromossomos supranumerários, estão presentes em muitas espécies de fungos, plantas e animais, sendo considerados dispensáveis, pois sua ausência não influencia no crescimento normal do indivíduo (HOUBEN *et al.*, 2013). Apresentam herança irregular e não mendeliana, não pareiam com cromossomos A e podem estar presentes ou ausentes em indivíduos de uma mesma população (JONES; HOUBEN, 2003).

A origem destes cromossomos é ainda muito discutida, e a hipótese mais aceita é que estes elementos se originaram de cromossomos do complemento A

(JONES; REES, 1982, CAMACHO *et al.*, 2000). Em *A. scabripinnis* uma das teorias é que estes cromossomos se originaram de um cromossomo A subtelocêntrico ou acrocêntrico (VICENTE *et al.*, 1996, MESTRINER *et al.*, 2000, VICARI *et al.*, 2011). Este cromossomo subtelocêntrico ou acrocêntrico, por sua vez, teria dado origem a dois cromossomos B: um microcromossomo e um cromossomo grande e metacêntrico. O cromossomo B grande e submetacêntrico teria se originado deste cromossomo grande e metacêntrico, e ambos poderiam ter dado origem ao cromossomo B metacêntrico de tamanho menor (NÉO *et al.*, 2000; MOREIRA-FILHO *et al.*, 2004) (Figura 3).

Figura 3: Representação da possível origem de alguns cromossomos B em *A. scabripinnis* (MOREIRA-FILHO *et al.*, 2004)



Os cromossomos B podem estar correlacionados à epigenética, e também podem funcionar como reguladores de expressão de genes presentes nos cromossomos do complemento A (HOUBEN *et al.*, 2013). Há evidências moleculares de produtos de transcrição deste cromossomo em *Crepis capillaris*, como adicionais na transcrição de genes de RNA ribossomal (RNAr) (LEACH *et al.*, 2005). Também foram encontrados transcritos de regiões repetitivas específicas do cromossomo B em arroz (CARCHILAN *et al.*, 2007).

Em peixes, estudos recentes têm mostrado relação da presença de cromossomos B com a razão sexual em ciclídeos africanos (YOSHIDA *et al.*, 2011), assim como o sequenciamento massivo de DNA microdissectado evidenciou pelo menos três genes ativos no cromossomo B de *Astatotilapia latifasciata* (VALENTE *et al.*, 2014). Entretanto até o momento não há relatos de estudos do genoma funcional no complexo *A. scabripinnis*. Contudo, algumas evidências apontam para a necessidade de prospectar possíveis funções atribuídas ao cromossomo B, a exemplo da presença de sequências de DNA ribossomal (DNAr) 18S e do gene da histona H1 neste cromossomo (SILVA *et al.*, 2014).

1.3 TRANSCRIPTOMA

O termo transcriptoma refere-se ao conjunto de transcritos e foi criado como analogia ao termo genoma, que representa o conjunto de genes de um organismo (PASSOS; JORDAN, 2000). É possível utilizar o termo transcriptoma para tratar de transcritos de uma única célula ou de todo um organismo em uma condição específica (MOROZOVA *et al.*, 2009).

Em organismos pluricelulares, a maioria das células possui o mesmo genoma, porém não é em toda célula que estes genes se encontram ativos, ou seja, a expressão gênica em diferentes células de diferentes tecidos não é a mesma (ADAMS, 2008). Logo, a importância de se estudar os transcritos de um organismo se dá pelo fato de que estes nos revelam os genes que estão sendo expressos em determinadas condições e em tecidos específicos, além de auxiliar na busca de sequências codificantes do genoma (VERLI, 2014).

Transcriptomas de muitas espécies estão sendo descritos, completamente ou parcialmente, a fim de resolver diversas questões como, desvendar padrões de expressão em leveduras (VELCULESCU *et al.*, 1997), possibilitar melhores estudos acerca de silenciamento de genes no câncer (CARON *et al.*, 2001), obter conhecimento para formulação de novas vacinas contra malária (BOZDECH *et al.*, 2003) ou para esclarecer a ação de micro RNAs (miRNAs) em plantas (SCHWAB *et al.*, 2005). Estudos com transcriptoma (transcriptômica) também estão sendo muito utilizados para tratar a diferença de expressão gênica entre indivíduos de uma mesma espécie submetidos a tratamentos diferentes, ou que possuem tipos de vida ou habitats diferentes, como diferenciação em peixes de superfície e caverna (GROSS

et al., 2013) algas em condições diferentes de hidratação (CONTRERAS-PORCIA *et al.*, 2013) ou presença e ausência de virose (YUAN *et al.*, 2014).

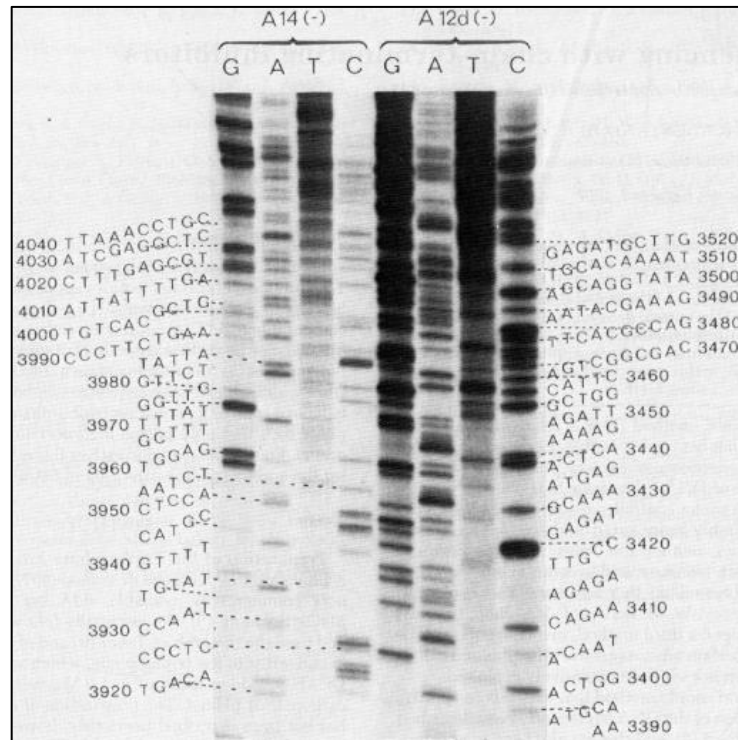
Astyanax mexicanus já teve seu transcriptoma elucidado. Foi a primeira espécie do gênero *Astyanax* a ter seus transcritos conhecidos por técnicas de sequenciamento de próxima geração. O resultado deste estudo mostrou diferenciação na transcrição de genes entre indivíduos que vivem em habitats diferentes (peixes de superfície e peixes de caverna). Estes indivíduos já possuíam fenótipos bastante diversificados, tendo como uma das características principais alterações morfológicas nos olhos dos peixes de caverna (GROSS *et al.*, 2013).

Estudos relacionados a expressão gênica necessitam de amostras de RNA de alta qualidade, ou seja, que não estejam degradadas. Para esta finalidade tem se adotado o RIN (*RNA integrity number* – número de integridade de RNA), que é obtido por eletroforese microfluídica no Bioanalyzer 2100 (JAHN *et al.*, 2008). O RIN varia em uma escala de 1 a 10, onde 1 a amostra encontra-se totalmente degradada e 10, onde teríamos um RNA sem sinais de degradação (SCHROEDER *et al.*, 2006). Este número é determinado baseado em características geradas pela leitura das amostras, como a proporção de RNA total (que se encontra dividindo a área das bandas pela área geral do eletroferograma) e a altura do pico 18S (IMBEAUD *et al.*, 2005).

1.4 SEQUENCIAMENTO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS

Em 1977, Sanger e colaboradores propuseram um novo método de sequenciamento, que consistia na replicação do DNA por uma DNA polimerase I. Para o início da replicação eram utilizados iniciadores (*primers*), um por reação, e eram colocados na reação, os desoxinucleosídeos trifosfato (dNTP) e os didesoxinucleosídeos trifosfato (ddNTP), que não permitem a continuação da extensão da fita de DNA pela polimerase, e eram marcados com ³²P. Eram feitas quatro reações, e cada ddNTP era colocada em uma destas reações. Logo, os resultados eram diversos fragmentos com diferentes tamanhos que eram, posteriormente, separados em gel de poliacrilamida. Cada poço correspondia a uma reação com determinado ddNTP, e obtinha-se a sequência lendo as bandas de baixo para cima, e adicionando a base nitrogenada correspondente (Figura 4).

Figura 4: Imagem retirada de Sanger et al., 1977, mostrando gel de poliacrilamida com o resultado de um sequenciamento.



Pode-se notar a dificuldade de se analisar um gel e a montagem da sequência, o que fez surgir os sequenciadores automáticos, criados pela Applied Biosystems em 1986. O método era o mesmo proposto por Sanger, porém ao invés dos ddNTPs serem marcados com ^{32}P , estes passam a ser marcados com fluorescência, que era lida por um laser, com a migração dos fragmentos pelo gel, ou mesmo por eletroforese capilar (MegaBACE®).

O método de sequenciamento automatizado de Sanger pode ser considerado um método de “primeira geração” e os novos métodos que vem surgindo são chamados de “próxima geração”, tendo como benefícios ser robusto e ter um custo reduzido (tabela 1 - comparativo entre os métodos). Dentre outros, são considerados sequenciadores de próxima geração: Roche/454, Illumina/Solexa, Life/APG, Helicos Biosciences (METZKER, 2010).

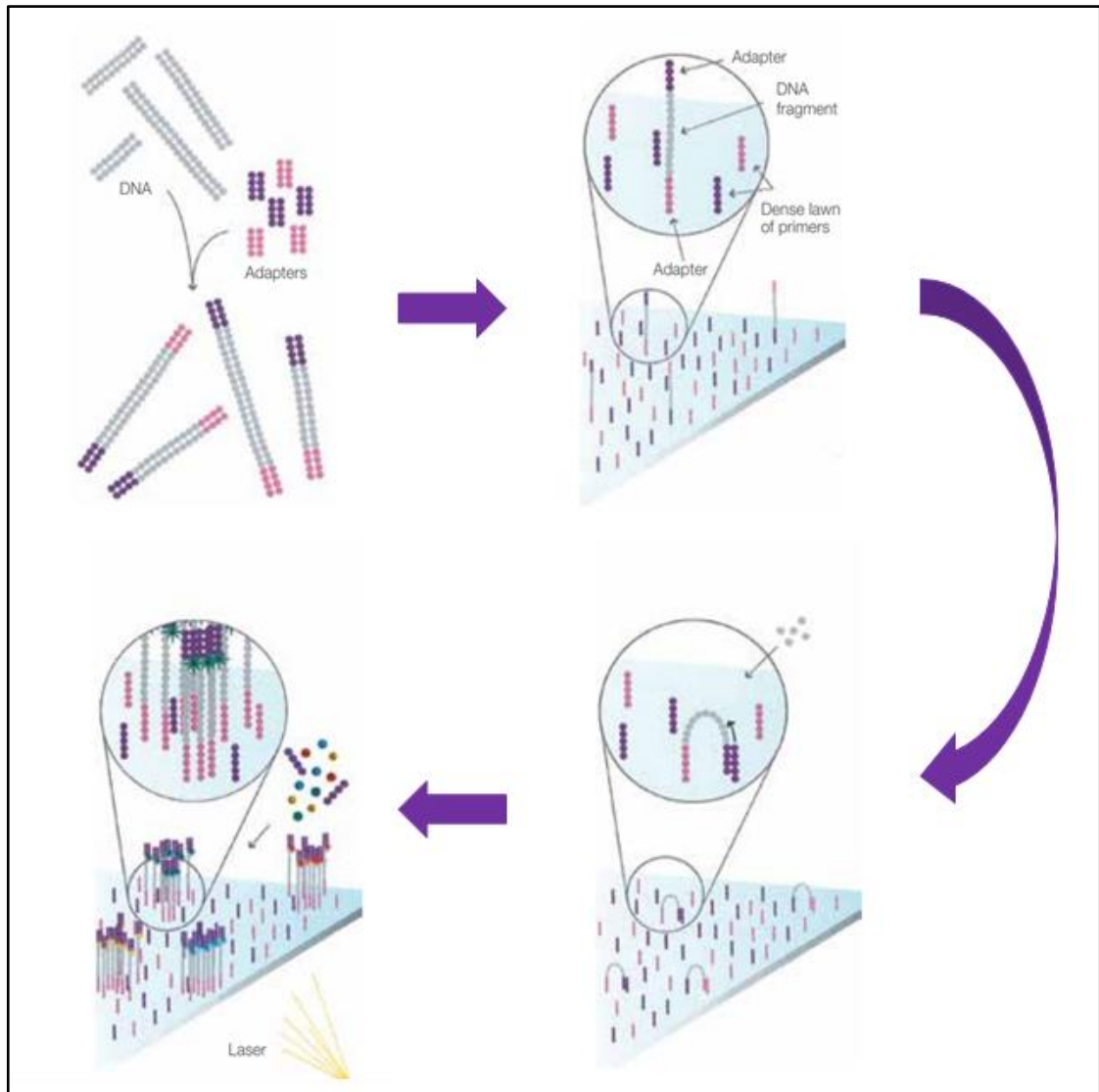
Tabela 1: tabela de comparação dos métodos de sequenciamento de Sanger e os métodos de próxima geração.

Sequenciamento Sanger	Sequenciamento NGS
meses	dias
Um <i>read</i> /amostra	Milhares <i>reads</i> /amostra
700 pb	50-400 pb
Menor erro	Maior erro

Cada um dos sequenciadores possui especificidade quanto à química, detecção das bases nitrogenadas, método de amplificação entre outros. Por isso, para exemplificar como ocorre o sequenciamento das amostras em sequenciadores de próxima geração, utilizaremos o processo do sequenciador Illumina, como é descrito pelo fabricante, que consiste inicialmente na fragmentação do DNA ou cDNA e ligação de adaptadores. Estes fragmentos vão se ligar a moldes já imobilizados em uma superfície própria, onde haverá a amplificação dos fragmentos. Após a amplificação, se inicializa o sequenciamento propriamente dito com replicação e adição de nucleotídeos marcados com fluorescência. Quando estes nucleotídeos são incorporados à fita de DNA ou cDNA, liberam o fluoróforo que é lido por um laser, e assim ocorre a leitura das bases (Figura 5).

Esta grande produção está fazendo com que os grandes centros de pesquisas também aumentem os estudos e isto gera um grande número de dados que vão além da capacidade de armazenamento. Além disso, os sequenciadores de próxima geração geram uma alta quantidade de sequências, porém com tamanhos reduzidos (35-250pb, aproximadamente) e isto é também um grande desafio, principalmente para montagem das sequências. Por isso, é preciso um grande avanço da bioinformática, para caminhar junto com as novas tecnologias de sequenciamento e conseguir analisar com eficiência os dados gerados por esses sequenciadores (POP; SALZBERG, 2008).

Figura 5: Imagem ilustrativa com dados retirados de Illumina (2010), mostrando como ocorre o sequenciamento.



1.5 MICROARRAY

A tecnologia conhecida como *microarray*, ou microarranjo, tem transformado a área de biologia molecular, liderando estudos relacionados a funções biológicas de genes e proteínas, ajudando a esclarecer dúvidas a respeito das atividades celulares (HOHEISEL, 2006).

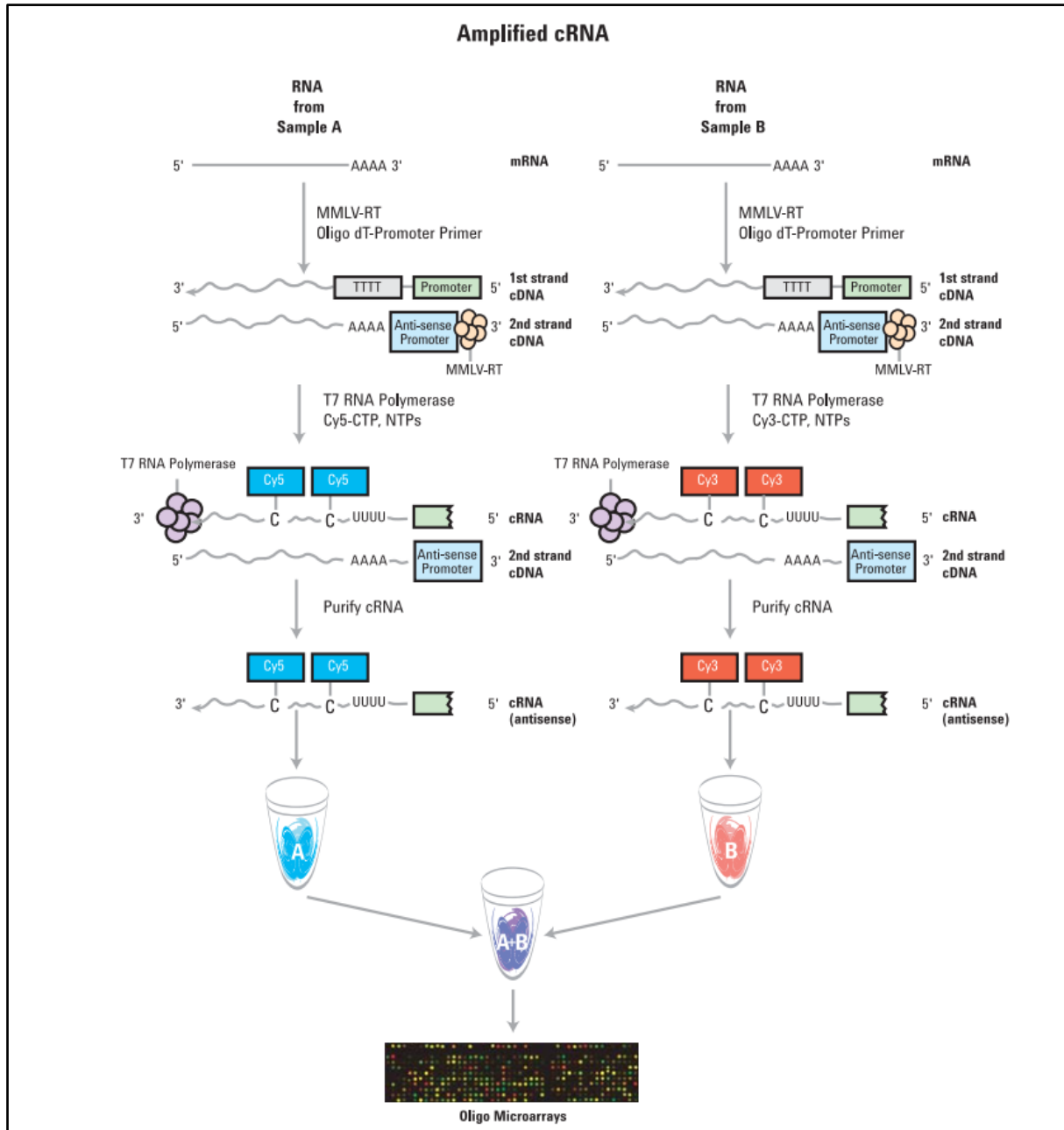
Basicamente, os microarranjos consistem na hibridação de ácidos nucleicos com a amostra a ser estudada em uma lâmina de vidro. As amostras são marcadas com fluorescência e posteriormente é visualizada a expressão dos genes de acordo

com o padrão de cores (RUSSELL *et al.*, 2009), como pode ser demonstrado na Figura 6. Um dos pioneiros da técnica foi Mark Shena e colaboradores (1995), que, utilizando como modelo a planta *Arabidopsis thaliana*, estudaram a expressão de 45 genes.

Os microarranjos estão sendo utilizados para estudos de expressão em diversos organismos, mas estão ganhando destaque cada vez maior em estudos de doenças humanas, como as neurodegenerativas, as autoimunes, e principalmente em estudos sobre o câncer (RUSSELL *et al.*, 2009).

Em peixes, os microarranjos também estão sendo amplamente utilizados para estudos de expressão gênica, como citado em Nielsen e Pavey, 2010. Em *A. mexicanus*, também foram feitas análises de expressão gênica utilizando a técnica dos microarranjos (STRICKLER E JEFFERY, 2009). A grande dificuldade encontrada para estudos com esta técnica é a montagem dos chips de DNA, que requerem um certo grau de conhecimento sobre o genoma de referência, o que ainda é uma limitação. Porém, estudos tem demonstrado que a técnica obtém sucesso, mesmo quando o organismo em questão não pertence a mesma espécie do organismo referência (KAYO *et al.*, 2001).

Figura 6: Imagem retirada do protocolo da Agilent Technologies, mostrando as etapas de um ensaio de microarray. Neste protocolo as amostras de RNA são inicialmente convertidas em cDNA, para então serem marcadas com os respectivos fluoróforos (Cy3 ou Cy5), formando então uma molécula de RNA complementar (cRNA). As amostras já marcadas podem então ser misturadas e adicionadas à lâmina com oligonucleotídeos para hibridação.



1.6 BIOINFORMÁTICA

A bioinformática pode ser definida como um conjunto de ferramentas computacionais que são usadas para tentar solucionar problemas na área da biologia (VERLI, 2014). Surgiu pela necessidade de se ter ferramentas de análise de dados, pois estes cresciam exponencialmente logo que foram criados os sequenciadores

capilares, tornando-se impossível a análise manual de sequências (PROSDOCIMI, 2007).

A bioinformática é uma área que cresce a cada dia, por isso exige atenção a novos métodos e requerimentos. Logo, um programa que tem uma ampla utilização em pouco tempo pode se tornar obsoleto (VERLI, 2014).

Com a revolução dos sequenciadores, que produzem um número cada vez maior de dados com tempo e custo cada vez menor, a bioinformática é uma ferramenta indispensável e que precisa estar sempre em avanço, junto com os novos métodos (POP; SALZBERG, 2008). Esta ferramenta também é indispensável para processar as informações geradas em ensaios de microarranjos, possibilitando assim a interpretação biológica destas informações (ZHANG *et al.*, 2009).

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Vários estudos têm sido realizados em espécimes de *Astyanax scabripinnis*, devido a sua alta variabilidade cariotípica e especialmente em relação a presença de cromossomos B. Porém, até o momento, nenhum trabalho tem sido conduzido com o objetivo de investigar a expressão diferencial de genes em fêmeas e machos, portadores e não portadores destes cromossomos supranumerários.

Por isso, com o intuito de auxiliar no esclarecimento de questões relativas à função deste cromossomo e da expressão gênica destes indivíduos, nossa proposta foi realizar ensaios de RNAseq e microarranjos. Estudos como estes podem elucidar se há diferenças significativas entre indivíduos machos e fêmeas que possuam e que não possuam o cromossomo B, e ainda analisar se há genes ou pseudogenes ativos no cromossomo B de *A. scabripinnis*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 COLETA E MATERIAL BIOLÓGICO

Os espécimes de *A. scabripinnis* foram coletados em dezembro de 2012 e maio e novembro de 2014 no Córrego Lavrinhas, Rio Paraíba do Sul, com 1.900m de altitude e coordenadas de 22° 40' 49,5"S e 45° 23'W, no Município de Guaratinguetá, São Paulo e em agosto de 2013, no rio Ribeirão Grande, com 1.850m de altitude e coordenadas de 22°43'59.22"S e 45°27'32.81"W, Município de Pindamonhangaba, ambos no Estado de São Paulo (Figura 7).

Figura 7: Imagem ilustrativa dos locais de coleta, Córrego Fazenda Lavrinha e Rio Ribeirão Grande, Estado de São Paulo, Brasil.



Os espécimes foram transportados vivos para o Laboratório de Genética Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta Grossa, acondicionados em aquários aerados e seguiram os procedimentos para a obtenção de cromossomos mitóticos e amostras de tecidos gonadais para confirmação do sexo e análises de expressão gênica.

O Estudo está de acordo com as recomendações do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Ponta Grossa (parecer nº 02/2008) e autorização para coleta de material zoológico do Ministério do Meio Ambiente, Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (MMA/IBAMA/ICMBio nº 15115-1). Os exemplares foram identificados pelo Dr. Oscar Akio Shibatta e depositados no Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina (MZUEL), sob números 5654 (População do Córrego Lavrinhas) e 5657 (População Rio Ribeirão Grande).

Para o NGS foram utilizados quatro indivíduos da população de Ribeirão Grande, sendo duas fêmeas com cariótipo $2n = 50 + 1$ e duas fêmeas $2n = 50$. Para a realização dos ensaios de microarranjos, foram utilizados doze indivíduos da população do Córrego da Fazenda Lavrinha, sendo três indivíduos fêmeas com cariótipo $2n = 50 + 1$, três indivíduos fêmeas $2n = 50$, três indivíduos machos $2n = 50 + 1$ e três indivíduos machos $2n = 50$.

3.2 PREPARAÇÕES E ANÁLISES CITOGENÉTICAS

Para a preparação citogenética o protocolo seguido foi de Bertollo *et al.*, 1978 (Anexo 1). Os indivíduos foram anestesiados com benzocaína 0,01% antes da retirada do rim anterior que serviu de material doador de células em divisão. As gônadas foram retiradas para sexagem e armazenadas em RNAlater (Life Technologies) conforme recomendações do fabricante.

Para a confirmação da presença de cromossomos B foi empregada a técnica de bandamento C de Sumner (1972) (Anexo 2). A análise citogenética foi realizada em microscópio de campo claro e metáfases representativas foram fotografadas com o auxílio do Microscópio Zeiss AxioPhot e o software ZEN pro 2011 (Carl Zeiss®) em Câmara Zeiss AxioCam MRm de Captura Monocromática com sensor CCD e resolução de 1.4 mega pixels.

3.3 EXTRAÇÃO DO RNA

Para a realização da extração de RNA das amostras foram utilizadas as gônadas previamente armazenadas em RNAlater (Life Technologies) a -80°C , com

indivíduos em estágios de desenvolvimento gonadal similares (em maturação), para evitar diferenças de transcritos. Para tanto, foram empregados os kits comerciais *Illustra RNAspin Mini RNA Isolation* (GE Healthcare) e o *Kit Ambion Pure Link RNA Mini* (Life Technologies), conforme instruções dos fabricantes, respectivamente.

As amostras seguiram análise quantitativa em espectrofotômetro NanoVue afim de obter a razão 280/260, para verificação da pureza do RNA, e a concentração em nanogramas por microlitro. A qualidade das amostras foi testada em eletroforese microfluídica no Bioanalyzer 2100, para confirmar a integridade das amostras expressas na forma de RIN.

3.4 SEQUENCIAMENTO NGS E ANÁLISES

As amostras de RNA total das gônadas foram encaminhadas para a construção das bibliotecas e sequenciamento RNAseq, realizados no Centro de Genômica Funcional da USP, Campus “Luiz de Queiroz”, SP, Brasil. Antes do sequenciamento houve a construção das bibliotecas de cDNA, que foi realizada com a utilização do kit “*TruSeq RNA Sample Preparation*” (Illumina), seguindo protocolo indicado pelo fabricante. A quantificação do cDNA foi determinada por PCR quantitativo, sendo utilizado o kit *KAPA Library Quantification* (KAPA Biosystems) e a qualidade da biblioteca foi validada por eletroforese microfluídica no Bioanalyzer (Agilent) antes de ser submetido ao sequenciamento. A clusterização foi realizada no equipamento cBot-HS (Illumina – San Diego, EUA) utilizando o *TruSeq PE Cluster Kit v3* (Illumina – San Diego, EUA). O sequenciamento foi realizado no equipamento HiSeq 2000 (Illumina).

As análises de bioinformática foram realizadas em parceria com o Laboratório de Genética Evolutiva da Universidade de Granada, Espanha. Antes da montagem e anotação do genoma, a qualidade das “reads” resultantes do sequenciamento foi checada através do programa FastQC (encontrado em, <http://www.bioinformatics.bbsrc.ac.uk/projects/fastqc/>). Para a realização da primeira etapa da montagem do transcriptoma com vários “k-mers”, o programa Abyss (SIMPSON et al., 2009) foi empregado, utilizando todos os “reads” de sequenciamento em formato fastq. Os k-mers incluem todos os números ímpares de 19 a 95.

Um primeiro conjunto de um transcriptoma por k-mer foi gerado, e uma segunda etapa de montagem foi realizada, a fim de, agrupar todos os transcriptomas

em um, filtrar as sequências no arquivo resultante para remover redundância e estender o restante das sequências não redundantes. Este segundo passo foi baseado no programa Trans-Abyss (ROBERTSON *et al.*, 2010) e nos permitiu montar a sequência do transcriptoma de referência e obter sequências com o maior comprimento possível. Um passo de montagem final adicional foi realizado de modo a aumentar ainda mais os transcritos montados, desta vez usando o software CAP3 (HUANG; MADAN, 1999).

As sequências resultantes, geradas em arquivo fasta, foram então alinhadas contra uma base de dados local, construído com todas as proteínas de “zebrafish” a partir do banco de dados do NCBI. Para isso, as pesquisas locais BLASTX foram realizadas e os hits foram considerados positivos em um limite de e-value de 10^{-6} . O software Blast2GO (CONESA *et al.*, 2005) foi então usado para anotação funcional das sequências alinhadas.

Para a comparação dos níveis de expressão, as sequências alinhadas foram tomadas como o transcriptoma de referência nas anotações em formato Fasta. Os “reads” brutos do sequenciamento (os arquivos Fastq) das bibliotecas das fêmeas com presença e com ausência do cromossomo B foram então alinhadas separadamente com as sequências de referência, utilizando o programa BWA (LI; DURBIN, 2009). O número de “reads” alinhados a cada sequência de referência foram contados utilizando o script htseq-count do programa HTSeq (ANDERS *et al.*, 2014). Para efeito de comparação baseada no número de “reads” alinhados a cada sequência entre as bibliotecas de indivíduos com B e as bibliotecas de indivíduos sem B, realizou-se a normalização das contagens dos “reads” em “reads” por kilobase da sequência de referência por milhões de “reads” na biblioteca (Reads Per Kilobase per Million - RPKM). A Avaliação da significância estatística das diferenças foi baseada em estratégia de contingência de teste Qui-quadrado e correção da taxa de falsas descobertas (BENJAMINI; HOCHBERG, 1995).

3.5 ENSAIOS DE MICROARRANJOS

Para a realização dos ensaios de microarranjos de RNA seguiu-se o protocolo da Agilent Technologies. As amostras foram preparadas e marcadas com cianina 5 (Cy 5), enquanto o controle foi marcado com cianina 3 (Cy 3). Estas foram posteriormente hibridizadas em lâminas com oligonucleotídeos de *Danio rerio*

(Zebrafish - Agilent 258825510001). Os ensaios de microarranjos foram realizados com o equipamento SureScan Microarray Scanner, da Agilent Technologies, seguindo protocolo disponibilizado pelo fabricante. Para a leitura dos dados foi utilizado o software *Agilent Microarray Control*. Foi feita uma análise da qualidade das amostras utilizando o programa *Agilent Feature Extraction*. Os resultados obtidos foram exportados para o software GeneSpring onde foi realizado agrupamento das amostras levando em consideração o sexo e presença e ausência do cromossomo B. Foi realizado teste estatístico Moderated T-test, com 5% de significância, e correção da taxa de falsas descobertas (BENJAMINI; HOCHBERG, 1995). Também foram gerados gráficos de diferenciação na expressão dos genes, como o Profile Plot e árvore de condições hierárquicas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados estão organizados na forma de dois capítulos correspondentes aos artigos científicos.

Capítulo I

Genes diferencialmente expressos identificados por microarranjos na presença de cromossomos B no peixe *Astyanax aff. Scabripinnis*

RESUMO:

Astyanax aff. scabripinnis é um pequeno peixe neotropical modelo para o estudo de cromossomos B, que quando presentes, são geralmente heterocromáticos e tem frequência polimórfica em várias populações desta espécie. Seu papel evolutivo ainda é contestado, porém a hipótese mais aceita, até o momento é de que seja um elemento parasítico ao genoma destes peixes. Ensaios de microarranjo de RNA foram empregados na tentativa de identificar genes diferencialmente expressos (DEGs) em gônadas de machos e fêmeas de *A. aff. scabripinnis* na presença e ausência de cromossomos B. Os resultados da hibridização cruzada em chip de oligonucleotídeos de zebrafish possibilitaram identificar DEGs entre os sexos, assim como entre fêmeas com e sem este cromossomo supranumerário. Esta evidência sugere que o cromossomo B parece ter alguma função na transcrição de genes em fêmeas destes peixes, conferindo algum papel heterótico para os mesmos.

Palavras-chave: transcriptoma, diferenciação sexual, FIN TRIM

ABSTRACT:

Astyanax aff. scabripinnis is a small fish neotropical model for the study of B chromosomes, when present, are usually heterochromatic and has polymorphic frequency in various populations of this species. Their evolving role is still disputed, but the most accepted hypothesis so far is that it is a parasitic element to the genome of these fish. RNA microarray assays were used in an attempt to identify differentially expressed genes (DEGS) in gonads of male and female of *A. aff. scabripinnis*, in the presence and absence of chromosomes B. The results of cross-hybridization on oligonucleotide zebrafish chip allowed to identify DEGS between the sexes and between females with and without this supernumerary chromosome. This evidence suggests that the B chromosome appear to have a role in the transcription of these genes in female fish, giving a heterotic role in this individuals.

Keywords: transcriptome, sexual differentiation, FINTRIM

Introdução:

Astyanax scabripinnis (JENYNS, 1842) é uma espécie de peixe de água doce neotropical com ampla distribuição pela América do Sul (LIMA *et al.*, 2003). Moreira-Filho e Bertollo (1991) propuseram que estes peixes formam um complexo de

espécies devido a suas variações morfológicas e cariotípicas intra e interpopulacionais.

O fato de possuir um cromossomo adicional ao cariótipo padrão (SALVADOR; MOREIRA-FILHO, 1992), amplamente estudado (MOREIRA-FILHO ET AL., 2004), faz desta espécie um modelo para estudos evolutivos de cromossomos B. Contudo, estes cromossomos adicionais não possuem uma função biológica relatada até o presente, sendo a hipótese mais aceita a de que representem parasitas do genoma de *A. aff. scabripinnis* (VICENTE *et al.*, 1996), segundo o modelo de Camacho *et al.* (2000). Uma vez que a origem destes cromossomos ainda é muito discutida, a teoria mais aceita é de provavelmente tenham sido originados a partir de um cromossomo acrocêntrico ou subtelocêntrico do complemento A pela formação de um isocromossomo que passou por posterior heterocromatinização (VICENTE *et al.*, 1996, MESTRINER *et al.*, 2000, VICARI *et al.*, 2011). Frequentemente os cromossomos adicionais encontrados em *A. scabripinnis* são identificados como totalmente heterocromáticos (MOREIRA-FILHO *et al.*, 2001). Estes cromossomos têm sido verificados em diversas outras espécies de plantas e animais, e em alguns casos há evidências de que estejam participando direta ou indiretamente da transcrição de genes, como acontece em gafanhoto (RUIZ-ESTÉVEZ *et al.*, 2012), cervo (TRIFONOV *et al.*, 2013) e milho (LIN *et al.*, 2014), por exemplo.

Até o momento nenhum trabalho tem sido conduzido com o objetivo de investigar a expressão diferencial de genes em fêmeas e machos, portadores e não portadores do cromossomo extranumerário, em *Astyanax scabripinnis*. Apesar desta espécie não evidenciar diferenças cariotípicas entre os sexos (NÉO *et al.*, 2000), a ocorrência de cromossomos B em ambos os sexos e o emprego de microarranjos pode ajudar a resolver questões relacionadas ao sexo.

O uso de microarranjos em peixes tem ganhado destaque na literatura (NIELSEN; PAVEY, 2010) e, em *Astyanax mexicanus* a técnica evidenciou genes diferencialmente expressos em populações que vivem em superfície e populações de caverna (STRICKLER; JEFFERY, 2009). Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi analisar, através desta técnica, as possíveis diferenças na expressão gênica que ocorrem em gônadas de indivíduos de *A. aff. scabripinnis*, machos e fêmeas portadores e não portadores de cromossomos B.

Material e Métodos:

Ética:

O Estudo está de acordo com as recomendações do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Ponta Grossa (parecer nº 02/2008). Os indivíduos foram mantidos em aquários aerados e eram alimentados uma vez ao dia até a experimentação. Todos os animais foram anestesiados em benzocaína 0,01% antes de serem sacrificados.

Coleta e Preparações citogenéticas:

Os espécimes (6 machos e 6 fêmeas) foram coletados no Córrego Lavrinhas, a 1.900m de altitude e coordenadas de 22° 40' 49,5"S e 45° 23'W, no Município de Guaratinguetá, Estado de São Paulo, Brasil. Foram transportados vivos para o Laboratório de Genética Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta Grossa, onde foram acondicionados em aquários aerados a temperatura de 25°C e fornecimento de ração para peixes *ad libitum* uma vez até a experimentação. Os exemplares foram identificados pelo Dr. Oscar Akio Shibatta e depositados no Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina (MZUEL), sob número 5654. Para a preparação citogenética o protocolo seguido foi de Bertollo *et al.* (1978). Para a confirmação da presença de cromossomos B foi empregada a técnica de bandamento C de acordo com Sumner (1972). A análise citogenética foi realizada em microscópio de campo claro e metáfases representativas foram fotografadas com o auxílio do Microscópio Zeiss AxioPhot e o software ZEN pro 2011 (Carl Zeiss®) em Câmara Zeiss AxioCam MRm de Captura Monocromática com sensor CCD e resolução de 1.4 mega pixels.

Extração de RNA total:

Para a realização da extração de RNA foram utilizadas as gônadas previamente guardadas em RNAlater (Life Technologies) a -80°C de 12 indivíduos (3 fêmeas com e 3 fêmeas sem cromossomos B; 3 machos com e 3 machos sem cromossomos B), que possuíam suas gônadas em estágio de maturação similar (fêmeas em maturação e machos maduros), para evitar diferenças de transcritos intrasexo. Foi utilizado o *Kit Ambion Pure Link RNA Mini*, da Life Technologies, seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante.

As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro NanoVue. A integridade [RIN (*RNA integrity number*)] das amostras foi avaliada em eletroforese microfluídica no Bioanalyzer 2100.

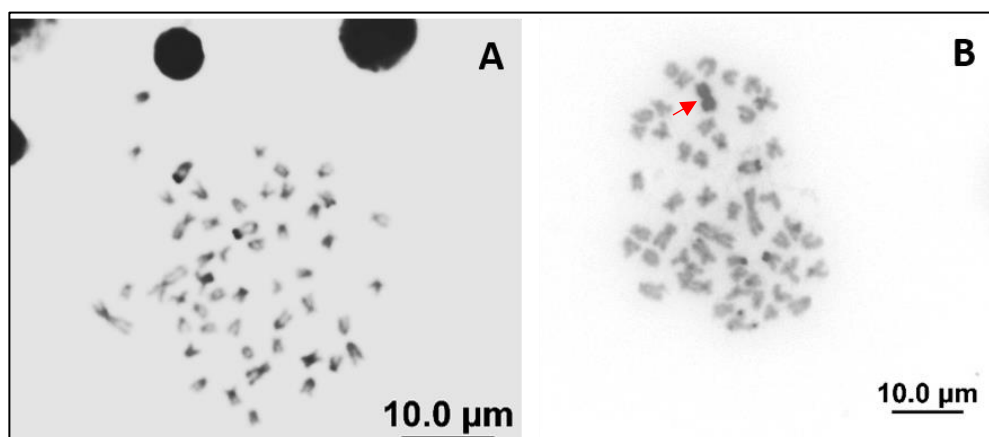
Ensaio de Microarranjos:

Para a realização dos ensaios de microarranjos seguiu-se o protocolo da Agilent Technologies. As amostras foram preparadas e marcadas com cianina 5 (Cy 5), enquanto o controle, composto por um mix de RNA de todos os indivíduos, foi marcado com cianina 3 (Cy 3). Estas foram posteriormente hibridizadas em lâminas com oligonucleotídeos de *Danio rerio* (Zebrafish - Agilent 258825510001). As leituras dos microarranjos foram realizadas com o equipamento SureScan Microarray Scanner (Agilent Technologies), seguindo protocolo disponibilizado pelo fabricante, com o auxílio do software *Agilent Microarray Control*. Foi feita uma análise prévia da qualidade das amostras utilizando o programa *Agilent Feature Extraction*. Os resultados obtidos foram exportados para o software *GeneSpring* (Agilent Technologies), onde foi realizado agrupamento das amostras levando em consideração o sexo e presença e ausência do cromossomo B. Foi realizado teste estatístico Moderated T-test, com 5% de significância, e correção da taxa de falsas descobertas (BENJAMINI; HOCHBERG, 1995). Também foram gerados gráficos de diferenciação na expressão dos genes, como o Profile Plot e dendograma.

Resultados

As amostras de RNA utilizadas neste estudo são originadas de tecido gonadal de fêmeas e machos de *A. aff. scabripinnis* em estado de maturação e maduros, respectivamente. Foram selecionados um total de doze indivíduos, sendo três machos e três fêmeas apresentando número diploide igual a 50 cromossomos, e mais três machos e três fêmeas com cromossomo B no cariótipo representado por $2n = 50 + 1$ (Tabela 1), confirmado pela análise citogenética (Figura 1).

Figura 8: Metáfase representativa de indivíduos de *A. aff. scabripinnis*, população Córrego Fazenda Lavrinha com ausência (A) e presença (B) do cromossomo B confirmado por bandamento C, onde está evidenciado o cromossomo B totalmente heterocromático (seta), marcado pela técnica.



A extração do RNA total gerou amostras de concentração e pureza satisfatórias e em análise do gel virtual e valores de RIN gerados pelo Bioanalyzer 2100 (Agilent). As amostras se mostraram íntegras, todas possuindo RIN acima de 7.9.

As análises realizadas através do software GeneSpring geraram os gráfico Profile Plot Report e dendograma, ambos realizados com teste estatístico (Moderated T-Test p (Corr) cut-off = 0.05), considerando apenas os genes que hibridizaram com pelo menos uma das amostras. Os resultados evidenciam uma diferença na expressão de genes entre machos e fêmeas (Figura 2).

O agrupamento de indivíduos perante a presença e ausência de cromossomo B, desconsiderando-se o sexo, não apresenta diferença significativa de expressão gênica entre os indivíduos, com base nos cálculos realizados. Porém, quando os indivíduos são separados entre machos e fêmeas e posteriormente, em cada um dos dois grupos agrupam-se os indivíduos pela presença e ausência do cromossomo B, verifica-se diferenciação de expressão dos genes nas fêmeas portadoras e fêmeas não portadoras do cromossomo B (Figura 3).

Tabela 2: Tabela com a numeração dos indivíduos, sexo e ausência ou presença de cromossomo B

Indivíduo	Sexo	Cromossomo B	RIN
4089	macho	ausente	8,4
4090	macho	ausente	8,7
4271	macho	ausente	9,4
4082	macho	presente	9,6
4088	macho	presente	8,2
4115	macho	presente	9,2
3513	fêmea	ausente	8,7
3522	fêmea	ausente	8
3529	fêmea	ausente	9,7
3526	fêmea	presente	8,7
3530	fêmea	presente	8,4
4315	fêmea	presente	7,9

Figura 9: Gráfico Profile Plot e dendrograma, gerados através do software Gene Spring, mostrando diferenciação da expressão entre machos e fêmeas de *A. aff. scabripinnis*. A diferenciação sexual é mostrada em uma escala de cores, onde azul representa genes menos expressos, amarelos com expressão normalizada e vermelho mais expressos em relação ao controle.

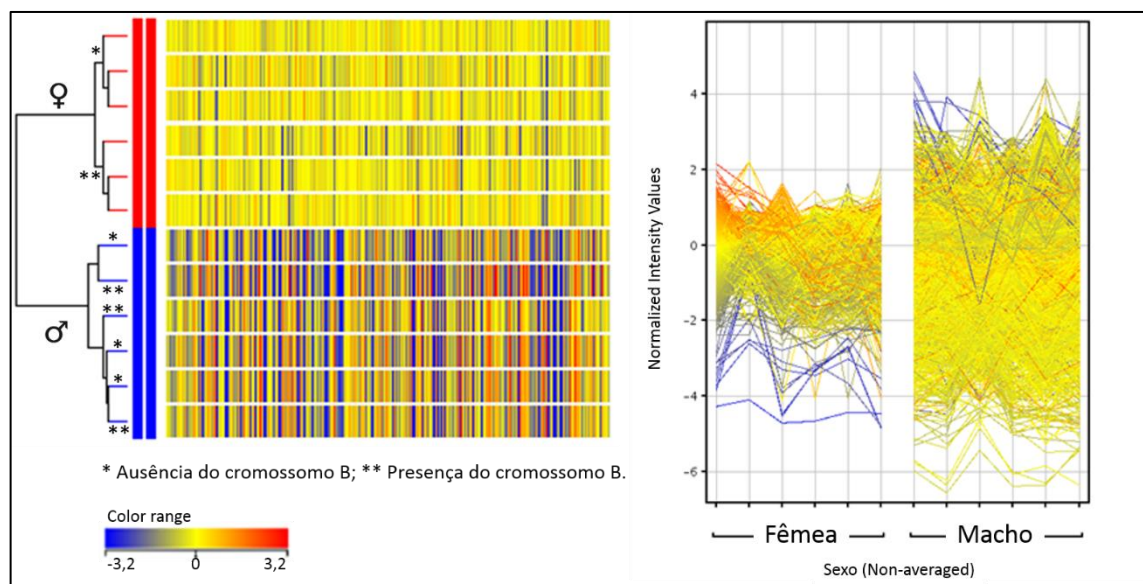
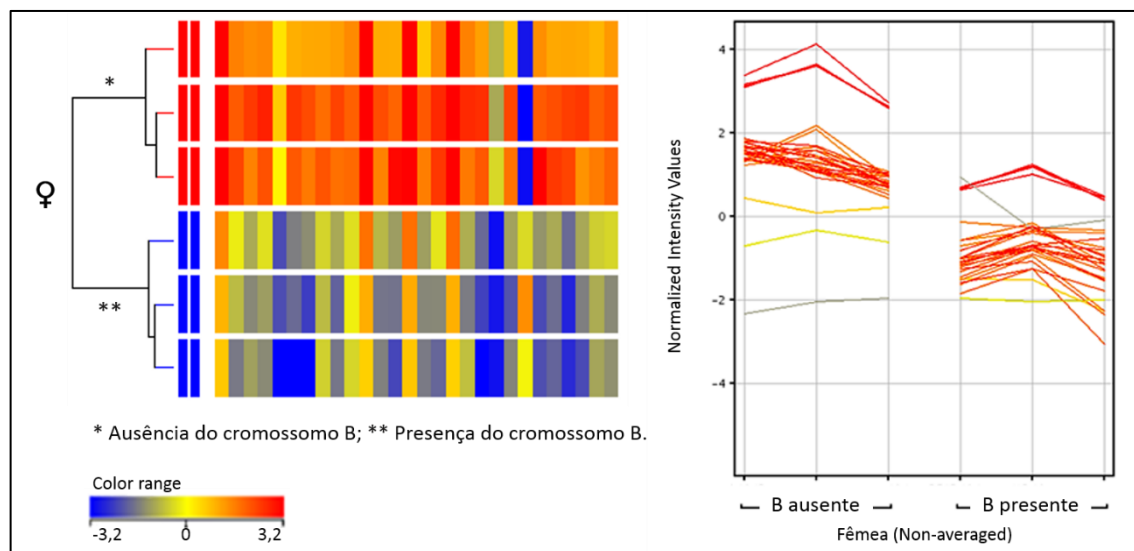


Figura 10: Gráfico Profile Plot e dendograma, gerados através do software Gene Spring, mostrando diferenciação da expressão em fêmeas de *A. aff. scabripinnis* com presença e ausência do cromossomo B. A diferenciação na expressão dos genes é mostrada em uma escala de cores, onde azul representa genes menos expressos, amarelo com expressão normalizada e vermelho mais expressos em relação ao controle.



Discussão:

Este é o primeiro relato de análise de expressão gênica, baseado em microarranjos em *Astyanax scabripinnis*, modelo para estudo de cromossomos B em peixes.

O número diploide de 50 cromossomos encontrado e a confirmação da presença de cromossomo B em *Astyanax aff. scabripinnis*, nesta população, corrobora com outros trabalhos já realizados neste mesmo local de coleta (FERRO et al., 2001; KAVALCO; MOREIRA-FILHO, 2003; BARBOSA et al., 2015). Assim como para a maioria dos peixes já cariotipados, *A. scabripinnis* não evidencia a presença de cromossomos sexuais morfologicamente diferenciados (MOREIRA-FILHO et al., 2004). A análise do RNA total de gônadas de machos e fêmeas desta espécie mostrou, no presente trabalho, um alto grau de integridade (RIN acima de 7,9), descartando a possibilidade de falsos positivos (JAHN et al., 2008).

Em plantas são encontrados vários estudos relatando evidências da participação de cromossomos B na transcrição genética. Podemos citar como exemplos a participação destes cromossomos como coadjuvantes na transcrição de genes, que foi estudada na espécie *Crepis capillaris* (LEACH et al., 2005), ou ainda a

aparição de transcritos em regiões repetitivas específicas do cromossomo B em arroz (CARCHILAN et al., 2007).

Nosso estudo teve foco principal na análise de genes diferencialmente expressos (DEGs) e para tanto foi eleita a análise por microarranjos com base na disponibilidade de chips para transcritos totais do peixe *Danio rerio* (zebrafish). A escolha do painel de genes de zebrafish para a hibridação foi baseada ainda na ausência de informações sobre o genoma de *Astyanax scabripinnis* e, fundamentalmente pela similaridade gênica destes gêneros entre si verificada previamente por hibridação de microarranjos utilizando cDNA de *Astyanax mexicanus* em lâminas de zebrafish (STRICKLER E JEFFERY, 2009). Os resultados obtidos com a análise *in silico* no GeneSpring encontrou diferenças tanto na expressão de genes entre machos e fêmeas, como em fêmeas portadoras de cromossomo B.

Como podemos notar na Figura 2, há o agrupamento dos indivíduos portadores e não portadores do cromossomo B apenas nas fêmeas. Em machos não acontece tal agrupamento tão distinto. Esta ocorrência de DEGs em fêmeas de *A. aff. scabripinnis* sugere a existência de DNA funcional no cromossomo B desta espécie. Alguns estudos em peixes neotropicais têm proposto, com base na frequência de cromossomos B exclusivo em fêmeas de ciclídeos africanos do Lago Vitória, participação destes cromossomos no processo de diferenciação sexual nestes peixes (YOSHIDA et al., 2011). Também para ciclídeos, Valente et al. (2014) verificaram por análise de sequenciamento massivo e genômica integrada a citogenômica, a ocorrência de genes em cromossomos B de *Astatotilapia latifasciata*, provavelmente relacionados a transmissão celular do próprio cromossomo B.

Podemos notar na Figura 3 a ocorrência de um gene sendo visivelmente mais expresso nas fêmeas portadoras do cromossomo extranumerário. Este gene é o membro 22 da família FINTRIM. TRIM (Tripartite Motife) é uma família de proteínas com domínios *RING*, *B-box* e *coiled-coils*, por isso também chamado RBCC (MENORI, 2012), que vem mostrando importantes mecanismos antivirais (MALFAVON-BORJA et al., 2013; FLETCHER; TOWERS, 2013), também observados para o TRIM22 (HATTLMANN; KELLY; BARR, 2012).

Em teleósteos foi descoberto um subconjunto desses genes, caracterizados como FINTRIM (*fish novel TRIM*), que tem demonstrado codificar proteínas que evoluem sob seleção positiva (van der AA et al., 2009). O aumento da expressão de um gene da família FINTRIM em fêmeas portadoras do cromossomo B, pode sugerir

um favorecimento para os que portam este cromossomo, aumentando assim seu valor adaptativo.

O fato de não estar havendo diferenciação de indivíduos portadores e não portadores do cromossomo extranumerário, não considerando-se o sexo, pode se dar pelo fato de que a lâmina utilizada em nossos estudos foi baseada em transcritos de *Danio rerio*, onde não há a ocorrência de cromossomos extranumerários. Por isso, há a possibilidade de genes estarem sendo expressos nos indivíduos portadores e não sendo visualizados, pois não são representados na lâmina utilizada. Mas vale ressaltar que isto não interfere na diferenciação de expressão encontrada, uma vez que em todos os indivíduos foi utilizada a mesma confecção da lâmina de *Danio rerio*.

Em conclusão, podemos afirmar que o presente trabalho traz a luz importantes informações acerca da expressão gênica diferencial, pela primeira vez explorado no complexo de espécies *Astyanax* aff. *scabripinnis*, modelo amplamente estudado para a presença de cromossomo B. Podemos inferir a ocorrência de DEGs existentes sobre os cromossomos B desta espécie.

Capítulo II

RNAseq revela transcritos em gônadas de *Astyanax* aff. *scabripinnis* frente a presença e ausência de cromossomo B.

RESUMO:

Astyanax scabripinnis é um complexo de espécie da ordem dos Characiformes e da família Characidae modelo de estudos de cromossomos extranumerários em peixes. Com o objetivo de gerar esclarecimentos acerca de possíveis funções biológicas associadas a presença do cromossomo B adicional ao genoma da espécie, foi realizado o sequenciamento do transcriptoma (RNAseq) de gônadas de fêmeas portadoras e não portadoras do cromossomo B (duas com 50 cromossomos e duas com 50 mais um cromossomo B) em maturação. As análises foram realizadas em plataforma Illumina Hiseq 2000, que resultou em dados de larga escala, com um total de 34426 genes alinhados contra os de *Danio rerio* (zebrafish) em banco de dados proteicos. Destes, 21629 estão sendo diferencialmente expressos (DEGs) em transcrito dos indivíduos com presença e ausência do cromossomo B. O painel destes DEGs estão envolvidos em processos biológicos em 125 vias metabólicas. Este é um trabalho pioneiro com emprego de sequenciamento NGS para elucidação de transcriptoma em peixes neotropicais brasileiros. Os resultados gerados possibilitaram a montagem do primeiro transcriptoma de *A. aff. scabripinnis*, além de revelar a presença de diferenças na expressão dos transcritos entre portadores e ausência de cromossomo B, sugerindo função biológica para este cromossomo. Palavras-chave: transcriptoma, expressão diferencial, morfogênese

ABSTRACT:

A. scabripinnis is a specie complex of the Characiforme order and Characidae family, model of supernumerary chromosomes studies in fish. In order to generate explanations about possible biological functions associated with the presence of the B chromosome additional to the genome of the species, we performed the sequencing of the transcriptome (RNAseq) gonads of female carriers and non-carriers of B chromosome (two with 50 chromosomes and two 50 another chromosome B) in maturation. Analyses were performed in Illumina Hiseq 2000 platform, which resulted in large-scale data, a total of 34426 genes aligned against *Danio rerio* (zebrafish) in protein database. Of these, 21629 and are differentially expressed (DEGS) transcript in individuals with and without the chromosome B. The panel DEGS these are involved in biological processes in 125 pathways. This is a pioneering work with NGS sequencing of employment for elucidating transcriptome in brazilian neotropical fish. The results generated allowed the assembly of the first transcriptome *A. aff. scabripinnis*, and reveal the presence of differences in the expression of transcripts between patients and absence of B chromosome, suggesting biological function for this chromosome.

Keywords: transcriptome, differential expression, morphogenesis

Introdução:

Astyanax scabripinnis foi proposto por Moreira-Filho e Bertollo (1991) como um complexo de espécies, especialmente interessante pela presença de cromossomos B em condição polimórfica em várias populações. Embora a ocorrência destes cromossomos independa do sexo, são mais frequentemente encontrados em fêmeas (Moreira-Filho *et al.*, 2004).

Estes cromossomos extras têm sua origem ainda muito discutida, e a hipótese mais aceita é a de que se originaram de um cromossomo subtelocêntrico ou acrocêntrico do complemento A, com posterior heterocromatinização (Vicente *et al.*, 1996) e acúmulo de DNAs repetitivos (Mestriner *et al.*, 2000). Suas funções no genoma ainda são incertas, a exemplo do que ocorre em outros organismos que possuem cromossomos extranumerários (Houben *et al.*, 2013). Até o momento, a hipótese mais aceita é que os cromossomos B se comportem como parasitas (Camacho *et al.*, 2000) com segregação aleatória, uma vez que pareiam consigo mesmos na formação de paquíteno durante a prófase meiótica (Vicari *et al.*, 2011).

A elucidação de transcriptomas, com auxílio de sequenciamento em larga escala de próxima geração (NGS) (Metzker, 2010), tem levado a interpretação de eventos biológicos relacionados a diferenças de expressão gênica entre indivíduos de

uma mesma espécie submetidos a tratamentos ou estilos de vida diferenciados (Gross *et al.*, 2013; Contreras-Porcia *et al.*, 2013; Yuan *et al.*, 2014). Recentemente, Valente *et al.* (2014) realizaram uma abordagem integradora sobre o genoma de *Astatotilapia latifasciata*, empregando sequenciamento NGS, e puderam evidenciar a presença de pseudogenes e genes funcionais sobre o genoma do cromossomo B desta espécie.

Assim, o presente trabalho teve como principal objetivo obter o transcriptoma de gônadas de fêmeas de *Astyanax aff. scabripinnis*, utilizando sequenciamento RNAseq de próxima geração visando prospectar transcritos sobre o cromossomo B desta espécie e suas possíveis funções biológicas.

Material e Métodos:

Ética:

O Estudo está de acordo com as recomendações do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Ponta Grossa (parecer nº 02/2008) e autorização para coleta de material zoológico do Ministério do Meio Ambiente, Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (MMA/IBAMA/ICMBio nº 15115-1). Os indivíduos foram mantidos em aquários aerados e foram alimentados uma vez ao dia até a experimentação. Todos os animais foram anestesiados em benzocaína 0,01% antes de serem eutanaziados.

Coleta e Preparações citogenéticas:

Espécimes adultos de *A. aff. scabripinnis* (4 fêmeas) foram coletados em agosto de 2013, no rio Ribeirão Grande, bacia do rio Paraíba do Sul, Município de Pindamonhangaba, Estado de São Paulo, Brasil, a 1.850m de altitude e coordenadas de 22°43'59.22"S e 45°27'32.81"W. Foram transportados vivos para o Laboratório de Genética Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta Grossa onde foram aclimatados em temperatura de 25°C e fornecimento de ração para peixes *ad libitum* uma vez até o momento dos ensaios. Os exemplares foram identificados pelo Dr. Oscar Akio Shibatta e depositados no Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina (MZUEL), sob número 5657.

A obtenção de cromossomos mitóticos seguiu o protocolo de Bertollo *et al.* (1978). A presença de cromossomos B foi verificada pelo método de bandamento C

segundo Sumner (1972), protocolo. A análise citogenética foi realizada em microscópio de campo claro e metáfases representativas foram fotografadas com o auxílio do Microscópio Zeiss AxioPhot e o software ZEN pro 2011 (Carl Zeiss®) em Câmara Zeiss AxioCam MRm de Captura Monocromática com sensor CCD e resolução de 1.4 mega pixels.

Extração de RNA total, Construção da biblioteca de cDNA e Sequenciamento:

Para a realização da extração de RNA foram utilizadas gônadas previamente guardadas em RNAlater (Life Technologies) a -80°C de quatro fêmeas da população de Ribeirão Grande, sendo dois indivíduos fêmeas com cariótipo $2n = 50 + 1$ e duas fêmeas $2n = 50$ (tabela 1). Estes indivíduos tinham suas gônadas em estágio similar de maturação (em maturação), para evitar diferenças de transcritos entre as amostras. Foi utilizado o *Kit Illustra RNAspin Mini RNA Isolation* da GE Healthcare, com protocolo indicado pelo fabricante. As amostras seguiram análise quantitativa em espectrofotômetro NanoVue. A integridade das amostras foi verificada em eletroforese microfluídica no Bioanalyzer 2100 e expressa em RIN (*RNA integrity number*), um índice gerado de acordo com parâmetros relacionados à qualidade do RNA obtido.

A construção das bibliotecas e sequenciamento RNAseq foram realizados no Center of Functional Genomics (USP, Campus Luiz de Queiroz, SP, Brazil). A construção da biblioteca de cDNA se deu com a utilização do kit *TruSeq RNA Sample Preparation Illumina*, seguindo protocolo indicado pelo fabricante. A quantificação do cDNA foi determinada por PCR quantitativo, com o kit *KAPA Library Quantification* (KAPA Biosystems) e a qualidade da biblioteca foi validada por eletroforese microfluídica no Bioanalyser (Agilent) antes de ser submetido ao sequenciamento. A clusterização foi realizada no equipamento cBot-HS (Illumina – San Diego, EUA) utilizando o *TruSeq PE Cluster Kit v3* (Illumina – San Diego, EUA). O protocolo seguido originou o sequenciamento de 100 pb no formato “paired end”, realizado no equipamento HiSeq 2000 – Illumina.

Montagem e Anotação do Genoma

Antes da montagem e anotação do genoma, a qualidade dos “reads” resultantes do sequenciamento foi checada através do programa FastQC (encontrado em, <http://www.bioinformatics.bbsrc.ac.uk/projects/fastqc/>). Para a realização da primeira etapa da montagem do transcriptoma com vários “k-mers”, foi empregado o

programa Abyss (Simpson *et al.*, 2009), utilizando todos os “reads” do sequenciamento em formato fastq. Os k-mers incluem todos os números ímpares de 19 a 95.

Um primeiro conjunto de um transcriptoma foi gerado por k-mer, e uma segunda etapa de montagem foi realizada, a fim de, agrupar todos os quatro transcriptomas em um único. As sequências foram filtradas no arquivo resultante para remover as redundâncias e estender o restante das sequências não redundantes. Este segundo passo foi baseado no programa Trans-Abyss (Robertson *et al.*, 2010) e permitiu montar a sequência do transcriptoma de referência e obter transcritos com o maior comprimento possível. Um passo de montagem final adicional foi realizado de modo a aumentar ainda mais os transcritos montados, desta vez usando o software CAP3 (Huang e Madan, 1999).

As sequências resultantes, geradas em arquivo fasta, foram então alinhadas contra uma base de dados local, construído com todas as proteínas de “zebrafish” a partir do banco de dados do NCBI. Para isso, as pesquisas locais BLASTX foram realizadas e os hits foram considerados positivos em um limite de e-value de 10^{-6} . O software Blast2GO (Conesa *et al.*, 2005) foi então usado para anotação funcional das sequências alinhadas.

Para a comparação dos níveis de expressão, as sequências alinhadas foram tomadas como o transcriptoma de referência nas anotações em formato Fasta. Os “reads” brutos do sequenciamento (arquivos Fastq) das bibliotecas das fêmeas com presença e das fêmeas com ausência do cromossomo B foram então alinhadas separadamente com as sequências de referência, utilizando o programa BWA (Li e Durbin, 2009). O número de “reads” alinhados a cada sequência de referência foi contado utilizando o script htseq-count do programa HTSeq (Anders *et al.*, 2014). Para efeito de comparação baseada no número de “reads” alinhados a cada sequência entre as bibliotecas de indivíduos com B e as bibliotecas de indivíduos sem B, realizou-se a normalização das contagens dos “reads” em “reads” por kilobase da sequência de referência por milhões de “reads” na biblioteca (Reads Per Kilobase per Million - RPKM). A avaliação da significância estatística das diferenças foi baseada em estratégia de contingência do teste Qui-quadrado e correção da taxa de falsas descobertas (Benjamini e Hochberg, 1995).

Resultados

As amostras consistiram de tecido gonadal de fêmeas de *A. aff. scabripinnis* em estado de maturação. Duas fêmeas apresentaram número diploide igual a 50 cromossomos, enquanto as outras duas evidenciaram um cromossomo B submetacêntrico, confirmado pela análise citogenética, tendo então número diploide igual a 50 + 1 cromossomos (Tabela 1; Figura 1). Todas as amostras de RNA total mostraram alta integridade com RIN acima de 8,5, obtidos através de eletroforese microfluídica no Bioanalyzer 2100.

Os “reads” obtidos do sequenciamento (RNAseq) na plataforma ILLUMINA Hiseq 2000 possibilitou escores acima de 30, que indicam alta qualidade das sequências. A montagem do genoma, realizada em duas etapas, sendo a primeira pelo programa Abyss gerou 39 conjuntos posteriormente tratados pelo programa Trans-Abyss, gerando um único conjunto possuindo milhões de sequências. Um transcriptoma total das amostras foi montado, representando o transcriptoma gonadal total de fêmeas de *A. aff. scabripinnis*, que será depositado em banco de dados específico. Também foi realizada anotação do transcriptoma total, gerando um gráfico de distribuição dos processos biológicos (Figura 2), mostrando de uma forma geral como os genes relacionados a processos biológicos estão sendo expressos em células de gônadas de *A. scabripinnis*.

As sequências de indivíduos com e sem a presença do cromossomo B foram alinhadas contra as de *Danio rerio* (zebrafish) em banco de dados proteicos, sendo obtidos 34538 transcritos, anteriormente tratados para eliminar redundâncias. Os transcriptomas de indivíduos portadores e não portadores do cromossomo B, montados separadamente e alinhados contra o banco de dados de zebrafish, mostraram diferenças de expressão entre os indivíduos, sendo que 16.042 genes se mostram mais expressos em fêmeas com cromossomo B, e em contrapartida 5.587 genes estavam mais expressos em indivíduos sem a presença do cromossomo B (Figura 3). Ainda, as fêmeas com cromossomo B mostram a distribuição de processos biológicos diferenciada das que não possuem (Figuras 4 e 5).

Figura 11: Metáfase de indivíduo $2n = 50 + 1$ da população de Ribeirão Grande, evidenciando cromossomo B marcado com sonda. Barra de $10\mu\text{m}$.

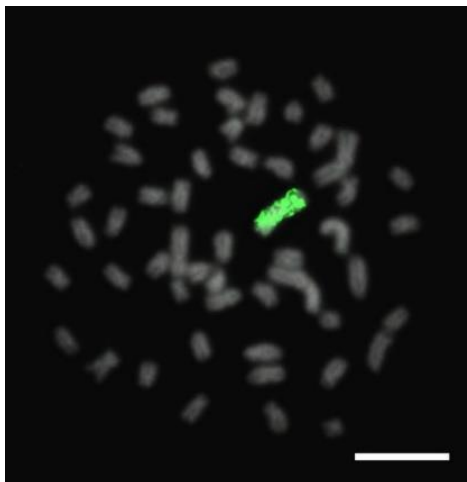


Tabela 3: Dados de numeração dos indivíduos, sexo e ausência ou presença de cromossomo B.

Indivíduo	Sexo	2n	Cromossomo B
3640	fêmea	50	ausente
3643	fêmea	50	ausente
3645	fêmea	51	presente
3646	fêmea	51	presente

Figura 12: Mapa de processos biológicos gerado a partir do transcriptoma total de gônadas de fêmeas de *Astyanax aff. scabripinnis*.

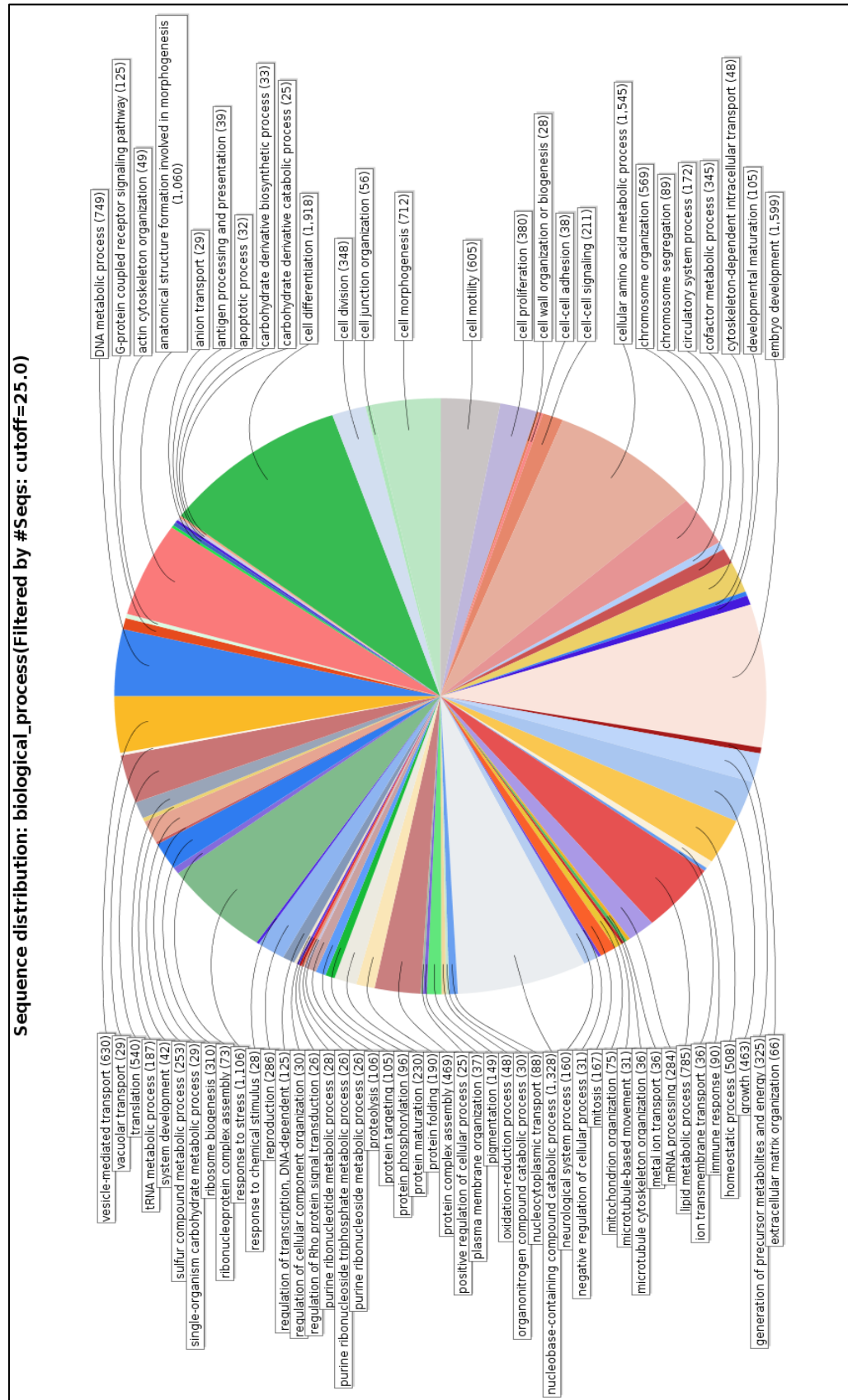


Figura 13: Diagrama de Venn e gráfico mostrando a diferença numérica de expressão dos genes em indivíduos de *A. aff. scabripinnis* com presença e ausência de cromossomo B.

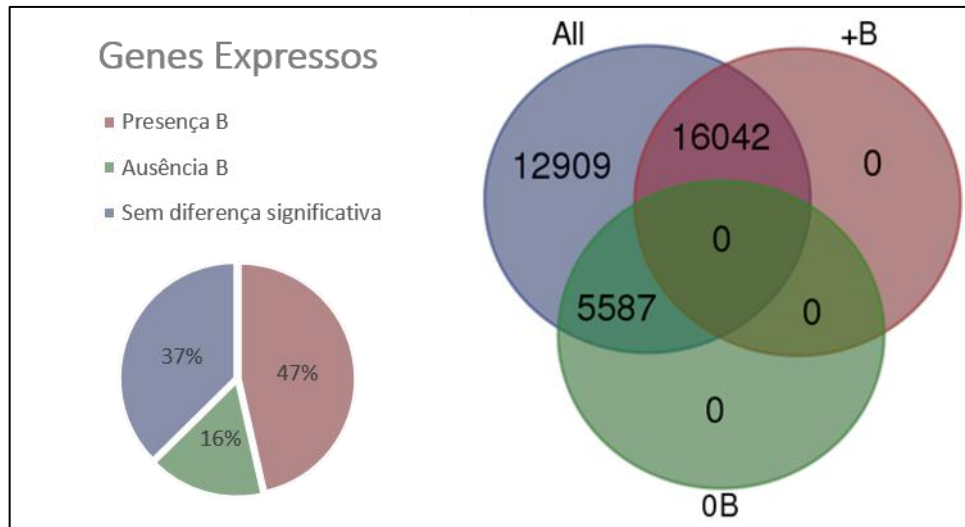


Figura 14: Mapa de processos biológicos gerado a partir do transcriptoma total de gônadas de fêmeas de *Astyanax aff. scabripinnis*, sem a presença do cromossomo B.

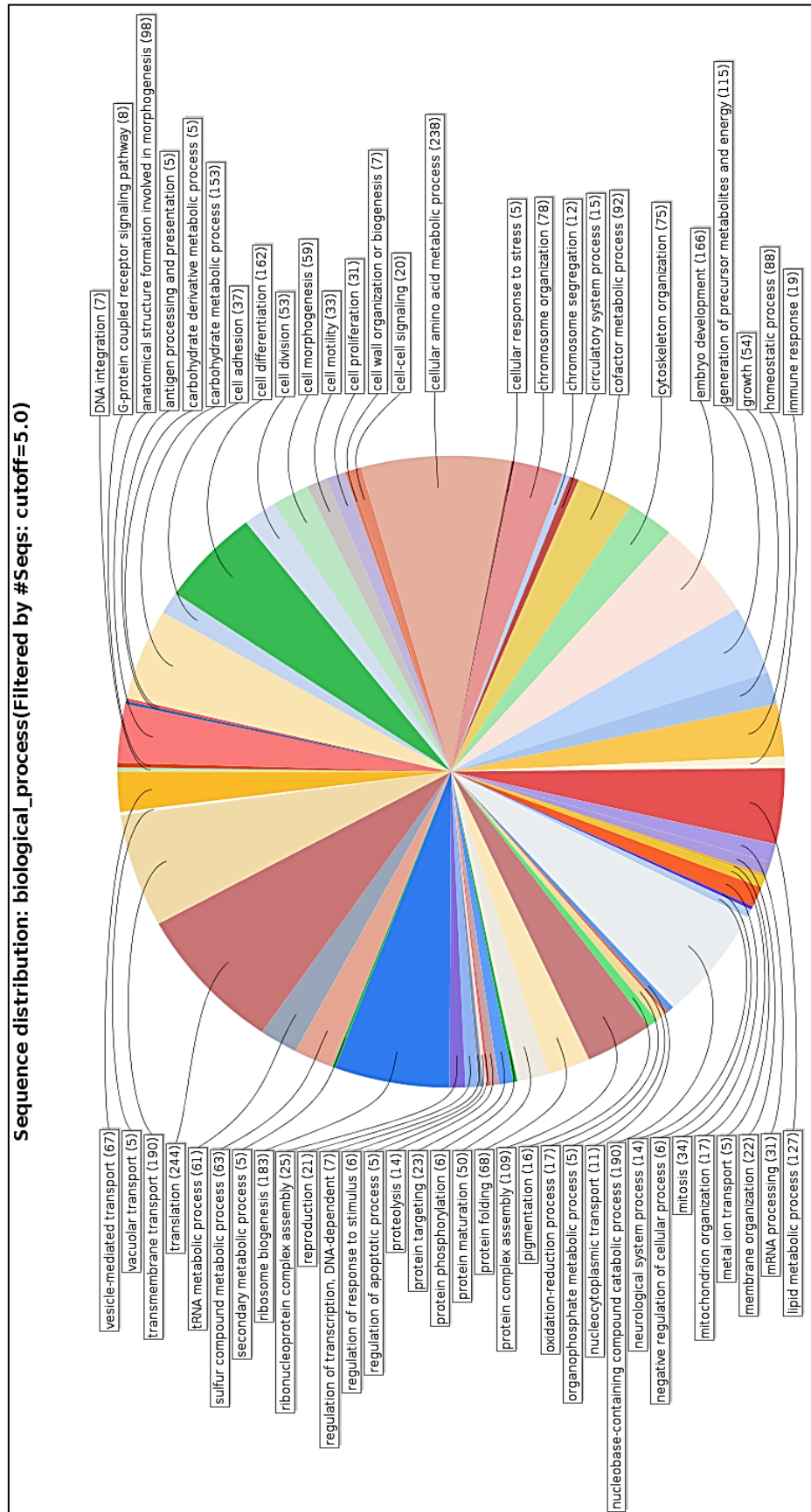
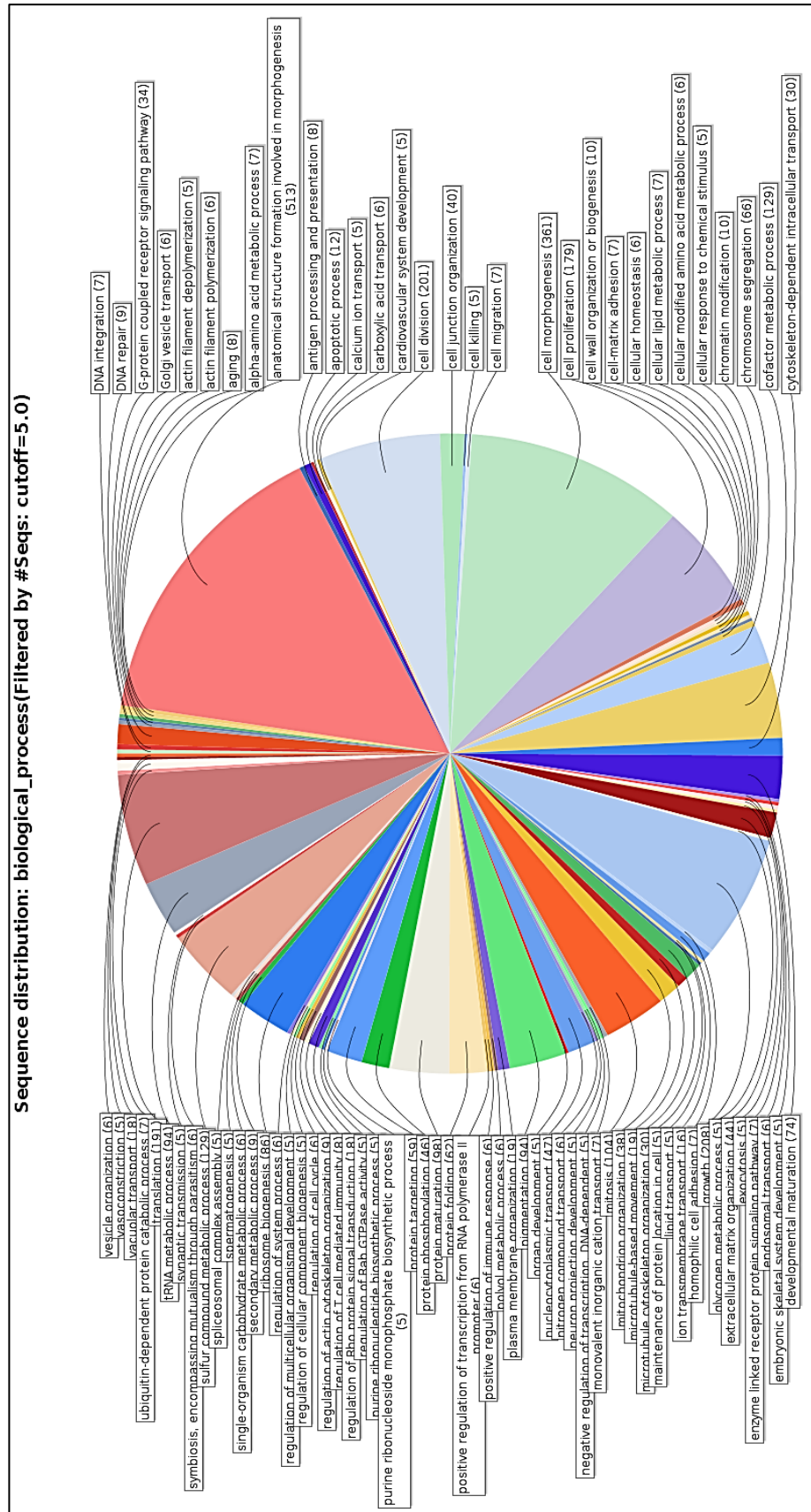


Figura 15: Mapa de processos biológicos gerado a partir do transcriptoma total de gônadas de fêmeas de *Astyanax aff. scabripinnis*, com a presença do cromossomo B.



Discussão:

Este é um trabalho pioneiro com emprego de sequenciamento NGS para elucidação de transcriptoma em peixes neotropicais brasileiros, principalmente por se tratar de investigação em um modelo amplamente estudado em relação a presença de cromossomos B (Moreira-Filho *et al.*, 2004).

A ocorrência de cromossomos B foi confirmada no presente estudo para a população de *Astyanax aff. scabripinnis*, corroborando dados da literatura (Castro *et al.*, 2014). Nossas amostras mostraram RIN acima de 8,5, o que as qualificou para a construção de bibliotecas e sequenciamento de próxima geração, resultando em dados confiáveis avaliados por controle de qualidade (QC) para as sequências RNAseq geradas com escore maior que 30 (Patel e Jain, 2012), obtido com o emprego do programa FastQC (Andrews, 2010).

Este estudo visou a obtenção de um painel de genes diferencialmente expressos (DEGs) entre amostras de gônadas de fêmeas de *A. aff. scabripinnis* com e sem a presença de cromossomos B. O transcriptoma anotado será depositado em banco de dados específico. Atualmente o organismo mais próximo com transcriptoma montado e publicado em banco de dados é *Astyanax mexicanus*, sob números de acesso SRA062012 (Gross *et al.*, 2013) e FO203528 até FO393391 (Hinaux *et al.*, 2013), ambos disponíveis no GenBank. O estudo realizado neste artigo utilizou as informações, já publicadas em banco de dados, do peixe *Danio rerio* (Zebrafish), por se tratar da espécie mais próxima com informações disponíveis para proteínas. Os trabalhos citados acima, realizados com espécimes de *Astyanax mexicanus* também se utilizaram das informações de *Danio rerio* para embasar o desenho experimental. Embora haja milhões de anos de divergência, o estudo de Gross *et al.* (2013), revela a presença de muitas regiões em sintenia entre os gêneros *Astyanax* e *Danio*.

Assim como os trabalhos com *Astyanax mexicanus*, alguns artigos já haviam mostrado diferenciação na expressão de genes de indivíduos com o auxílio de dados de transcriptoma, como no peixe *Tripterygion delaisi*, onde se observa diferenciação de transcritos no cérebro entre machos territorialistas, furtivos e fêmeas (Schunter *et al.*, 2014). Quanto a diferenciação de transcritos entre fêmeas com presença e outras onde o cromossomo B está ausente, podemos notar através dos mapas de processos biológicos, uma diferença na distribuição dos processos, principalmente se tratando da morfogênese (morfogênese celular e formação da estrutura anatômica envolvida

na morfogênese), que possui maior número de componentes em portadoras do cromossomo B do que em não portadoras (Figura 5). É possível questionar sobre a possibilidade deste cromossomo adicional ao genoma da espécie, estar expressando ou sendo coadjuvante no processo de expressão gênica, como já evidenciado por algumas trabalhos em outros organismos (Leach *et al.*, 2005; Carchilan *et al.*, 2007; Houben *et al.*, 2013; Valente *et al.*, 2014).

O que podemos notar no presente trabalho é que, a maior parte dos genes (16042), representando 47% do total de genes expressos, estão tendo sua expressão aumentada na presença do cromossomo extranumerário, e este é um forte indício para se especular se o cromossomo B está participando positivamente na regulação de expressão de genes em exemplares desta espécie, na população de Ribeirão Grande.

5 CONCLUSÕES

Com o presente trabalho, realizado em duas populações do peixe *Astyanax aff. scabripinnis*, podemos concluir que:

- Há variação na expressão dos genes de indivíduos fêmeas portadoras e não portadoras do cromossomo extranumerário;
- Há variação na expressão gênica de indivíduos machos e fêmeas de *Astyanax aff. scabripinnis* na população do Córrego da Fazenda Lavrinhas;
- Existe um forte indício de que o cromossomo extranumerário tem um importante papel na regulação da expressão gênica, nas duas populações estudadas;
- O cromossomo B pode estar aumentando a expressão de miRNA em fêmeas da população do Córrego da Fazenda Lavrinhas;

As amostras de ambos os trabalhos serão validadas através da técnica de qRT-PCR.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, J. Transcriptome: connecting the genome to gene function. **Nature Education**. p. 195, 2008.
- ANDREWS, S. FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data. **Reference Source**, 2010.
- ANDERS, S.; PYL, P. T.; HUBER, W. *HTSeq — A Python framework to work with high-throughput sequencing data*. **Bioinformatics**, v. 31, p. 166-169, 2014.
- BARBOSA, P., *et al.* Identification and chromosome mapping of repetitive elements in the *Astyanax scabripinnis* (Teleostei: Characidae) species complex. **Springer**. 2015.
- BENJAMINI, Y & HOCHBERG, Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. **Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)**. v. 57, p. 289-300, 1995.
- BERTOLLO, L. A. C.; TAKAHASHI, C. S.; MOREIRA-FILHO; O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v.1, p.103-120, 1978.
- BOZDECH, Z., *et al.* The Transcriptome of the Intraerythrocytic Developmental Cycle of *Plasmodium falciparum*. **Plos Biology**, 2003.
- CAMACHO J.P., SHARBEL T.F., BEUKEBOOM L.W.. 2000. B-chromosome evolution. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series Biological Sciences**. v. 355, p. 163-178, 2000.
- CARCHILAN, M., *et al.* Transcriptionally active heterochromatin in rye B chromosomes. **Plant Cell**, v.19, p. 1738–1749, 2007.
- CARON, H., *et al.* The Human Transcriptome Map: Clustering of Highly Expressed Genes in Chromosomal Domains. **Science**. v. 291 n. 5507 p. 1289-1292, 2001.
- CASTRO, J. P., *et al.* Evidence of incipient speciation in *Astyanax scabripinnis* species complex (Teleostei: Characidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 12, p. 429-438, 2014.
- CONESA, A., *et al.* Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. **Bioinformatics**, v. 21, p. 3674-3676, 2005.

CONTRERAS-PORCIA, L., *et al.* Differential gene expression in *Pyropia columbina* (Bangiales, Rhodophyta) under natural hydration and desiccation conditions. **Latin American Journal of Aquatic Research**, p. 933-958, 2013.

EIGENMANN, C. H. The American Characidae. **Memoirs of the Museum of Comparative Zoology**, Harvard College, v. 43, p. 209-310, 1921.

FAUAZ, G.; VICENTE, V. E.; MOREIRA-FILHO, O. Natural Triploidy and B Chromosomes in the Neotropical Fish Genus *Astyanax* (CHARACIDAE). **Revista Brasileira de Genética**, v. 2, p. 157-163, 1994.

FERRO, D. A. M.; NÉO, D. M.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. Nucleolar organizing regions, 18S and 5S rDNA in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): populations distribution and functional diversity. **Genetica**, The Hague, v.110, p.55-62, 2001.

FERRO, D. A. M.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. B chromosome polymorphism in the fish *Astyanax scabripinnis*. **Genetica**, The Hague, v.119, p. 147-153, 2003.

FLETCHER, A. J.; TOWERS, G. J. Inhibition of Retroviral Replication by Members of the TRIM Protein Family. **Springer**. v. 7, p. 29-66, 2013.

GROSS, J. B.; FURTERER, A.; CARLSON, B. M.; STAHL, B. A. An Integrated Transcriptome-Wide Analysis of Cave and Surface Dwelling *Astyanax mexicanus*. **Plos One**, v. 8, p 1-14, 2013.

HATTLMANN, C. J.; KELLY, J. N.; BARR, S. D. TRIM22: A Diverse and Dynamic Antiviral Protein. **Molecular Biology International**, 2012

HINAUX, H. *et al.* De Novo Sequencing of *Astyanax mexicanus* Surface Fish and Pachón Cavefish Transcriptomes Reveals Enrichment of Mutations in Cavefish Putative Eye Genes. **Plos One**, v. 8, 2013.

HOHEISEL, J. D. Microarray technology: beyond transcript profiling and genotype analysis.. **Nature Reviews Genetics**. v. 7, p. 200 – 210, 2006.

HOUBEN, A.; BANAEI-MOGHADDAM, A. M.; KLEMME, S. Biology and Evolution of B Chromosomes. **Plant Genome Diversity**. Springer Vienna, v. 2, p.149-165, 2013.

HUANG, X. E MADAN, A. CAP3: A DNA Sequence Assembly Program, **Genome Research**, v. 9, p. 868-877, 1999.

IMBEAUD, S., *et al.* Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n.6, 2005.

JAHN, C. E.; CHARKOWSKI, A. O.; WILLIS, D. K. Evaluation of isolation methods and RNA integrity for bacterial RNA quantitation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 75, p. 318-324, 2008.

JENYNS, L. Fish. **The Zoology of the voyage of H.M.S. Beagle, under the command of captain Fitzroy, R. N. during the years 1832 to 1836.** London: Smith, Elder and Co., 1842.

JONES, R. N.; REES, H. B chromosomes. New York: Academic Press, 1982.

JONES, N.; HOUBEN, A. B chromosomes in plants: escapees from the A chromosome genome? **Trends in Plant Science**, v. 8, p. 417-423, 2003.

KAVALCO, K. F. & MOREIRA-FILHO, O. Cytogenetical analyses in four species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae) from Paraíba do Sul River Basin. **Caryologia**, v. 56, p. 453-461, 2003.

KAYO, T; ALLISON, D. B.; WEINDRUCH, R.; PROLLA, T. A. Influences of aging and caloric restriction on the transcriptional profile of skeletal muscle from rhesus monkeys. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, p.5093–5098, 2001.

LEACH, C.R., *et al.* Molecular evidence for transcription of genes on a B chromosome in *Crepis capillaris*. **Genetics**, v. 171 p.269–278, 2005.

LI, H. E DURBIN, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. **Bioinformatics**, v. 25: pp 1754-1760, 2009.

LIN, H. Z.; LIN, W. D.; LIN, C. Y.; PENG, S. F.; CHENG, Y. M. Characterization of maize B-chromosome-related transcripts isolated via cDNA-AFLP. , v. 6, p. 597-607, 2014.

LIMA, F. C. T., *et al.* **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America.** Porto Alegre: Edipucrs, p. 106-169, 2003.

MACHADO, S. N., *et al.* Natural triploidy and B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* (Characiformes, Characidae): a new occurrence, *Caryologia: International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics*, v. 65, n.1, p. 40-46, 2012.

MALFAVON-BORJA, R. *et al.* An Evolutionary Screen Highlights Canonical and Noncanonical Candidate Antiviral Genes within the PrimateTRIM Gene Family. *Genome Biol. Evol.* v. 5, n.11, p. 2141–2154, 2013.

METZKER, M. L. Sequencing technologies — the next generation. *Nature Reviews Genetics*, v. 11, p. 31-46, 2010.

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

MIZOGUCHI, S. M. H. N.; MARTINS-SANTOS, I. C. Macro- and microchromosomes B in females of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Hereditas*, Landskrona, v.127, p. 249-253, 1997.

MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): a species complex. *Revista Brasileira de Genética*, Ribeirão Preto, v.14, n.2, p.331-357, 1991.

MOREIRA-FILHO, O.; FENOCCHIO, A. S.; PASTORI, M. C.; BERTOLLO, L. A. C. Occurrence of a metacentric macrochromosome B in different species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae, Tetragonopterinae). *Cytologia*, Tokyo, v.66, p.59-64, 2001.

MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. AND GALETTI JR, P. M. B chromosome in the fish *Astyanax scabripinnis* (Characidae, Tetragonopterinae): An overview in natural populations. *Cytogenetic Genome Research*, v. 106, p. 230–234, 2004.

NELSON, J. S. **Fishes of the World**. 4.ed. New Jersey: John Wiley e Sons, 2006.

NÉO, D. M.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO O. Morphological differentiation and possible origin of B chromosomes in natural Brazilian populations of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Genetica*, The Hague, v.108, p. 211–215, 2000.

NIELSEN, L. J.; PAVEY, S. A. Perspectives: Gene expression in fisheries management. *Current Zoology*, v. 56, p. 157-174, 2010.

NOMURA, H. **Dicionário de peixes do Brasil**. Editerra, Brasília, 1984.

PASSOS, G. A. S.; JORDAN, C. N. B. PROJETO TRANSCRIPTOMA: Análise da Expressão Gênica em Larga Escala Usando DNA – Arrays. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v. 12 p. 34-37, 2000.

PATEL, R. K.; JAIN, M. NGS QC Toolkit: A Toolkit for Quality Control of Next Generation Sequencing Data. **Plos One**, v.7, n.3, 2012.

POP, M. AND SALZBERG, S. L. Bioinformatics challenges of new sequencing technology. **Trends Genet**, v. 24, n.3, p. 142–149, 2008.

PROSDOCIMI, F. **Introdução à Bioinformática**. Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento, 2007.

REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS, C. Check List of freshwater Fishes of South and Central America. Porto Alegre, Brasil: **Edipucrs**; 2003.

ROBERTSON, G., *et al.* De novo assembly and analysis of RNA-seq data. **Nature Methods**, v.7, p. 909–912, 2010.

RODRIGUES, L. P.; QUEROL, E.; BRACCINI, M. C. Descrição morfo-histológica do ovário de *Acestrorhynchus pantaneiro* (MENEZES, 1992) (Teleostei, Characidae), em seus diferentes estádios de desenvolvimento, na bacia do Rio Uruguai médio, Uruguaiana, RS. **Biodiversidade Pampeana**, v. 3, p. 11-18, PUCRS, 2005.

RUIZ-ESTÉVEZ, M.; LÓPEZ-LEÓN, M. D.; CABRERO, J.; CAMACHO, J. P. M. B-Chromosome Ribosomal DNA Is Functional in the Grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. **PlosOne**, v. 7, 2012.

RUSSELL, S.; MEADOWNS, L. A.; RUSSELL, R. R. Microarray technology in practice. **Elsevier**, 2009.

SALVADOR, L. B.; MOREIRA-FILHO, O. B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Heredity**, Edimburgo, v.69, p.50-56, 1992.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SCHROEDE, A., *et al.* The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. **BMC Molecular Biology**. v. 31, p.3-7, 2006.

SCHUNTER, C.; VOLLMER, S. V.; MACPHERSON, E.; PASCUAL, M. Transcriptome analyses and differential gene expression in a non-model fish species with alternative mating tactics. **BMC Genomics**, v. 15, p. 1-13, 2014.

SCHWAB, R., *et al.* Specific Effects of MicroRNAs on the Plant Transcriptome. **Developmental cell**, v. 8, n.4, p. 517–527, 2005.

SHENA, M.; SHALON, D.; DAVIS, R. W.; BROWN, P. O. Quantitative Monitoring of gene expression patterns with a complementary Dna microarray. **Genome Issue**. v. 270, p. 467 – 470, 1995.

SILVA, D.M.Z.D.A.; PANSONATO-ALVES, J.C.; UTSUNOMIA, R.; ARAYA-JAIME, C.; RUIZ-RUANO, F.J.; *et al.* Delimiting the Origin of a B Chromosome by FISH Mapping, Chromosome Painting and DNA Sequence Analysis in *Astyanax paranae* (Teleostei, Characiformes). **PlosOne**, v. 9, 2014.

SIMPSON, J. T., *et al.* ABySS: A parallel assembler for short read sequence data. **Genome research**, v. 19, p.1117-1123, 2009.

STRICKLER, A. G; JEFFERY, W. R. Differentially expressed genes identified by cross-species microarray in the blind cavefish *Astyanax*. **Integrative Zoology**, v.4, n.1, p. 99–109, 2009.

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

TRIFONOV, V. A., *et al.* Transcription of a protein-coding gene on B chromosomes of the Siberian roe deer (*Capreolus pygargus*). **BMC Biology**, v. 11, p.50, 2013.

VALENTE, G. T., *et al.* Origin and evolution of B chromosomes in the Cichlid Fish *Astatotilapia latifasciata* based on integrated genomic analyses. **Molecular Biology and Evolution**, v.31, n.8, p. 2061-72, 2014.

VAN DER AA *et al.*; A large new subset of TRIM genes highly diversified by duplication and positive selection in teleost fish. **BMC Biology** , v. 7, p.7, 2009

VELCULESCU, V. E., *et al.* Characterization of the Yeast Transcriptome. **Cell**, v. 88, p. 243–251, 1997.

VERLI, H. **Bioinformática: da Biologia à flexibilidade Molecular**. 282 p. Porto Alegre, 2014.

VICARI, M. R., *et al.* New insights on the origin of B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* obtained by chromosome painting and FISH. **Genetica**, The Hague, v.139, p. 1073-1081, 2011.

VICENTE, V. E.; MOREIRA-FILHO, O.; CAMACHO, J. P. M. Sex-ratio distortion associated with the presence of a B chromosome in *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae). **Cytogenet Cell Genet**, v.74, p.70-75, 1996.

YOSHIDA, K., *et al.* B chromosomes have a functional effect on female sex determination in Lake Victoria cichlid fishes. **PLoS Genetics**, v.7, 2011.

YUAN, J., Transcriptome analysis of epithelioma papulosum cyprini cells after SVCV infection. **BMC Genomics**, v.15, p. 935, 2014.

ZHANG, W.; SZUSTAKOWSKI, J; SCHINKE, M. Bioinformatics Analysis of Microarray Data. **Cardiovascular Genomics**, v.573, p. 259-284, 2009.

ANEXO A - PREPARAÇÕES CITOGENÉTICAS

1. Injetar intraperitonealmente colchicina 0,0025% na proporção de 0,1 ml para cada 100 g de massa corpórea do animal;
2. Deixar o peixe em aquário bem aerado por 40 minutos. Em seguida sacrificá-lo e retirar a porção anterior do rim transferindo-a para uma solução hipotônica de KCl 0,075 M (6-8 ml);
3. Divolucionar bem o material com o auxílio de uma seringa de vidro até o material ficar homogêneo. Retirar o sobrenadante (suspensão celular) com o auxílio de uma pipeta Pasteur e colocar em tubo de centrifuga;
4. Incubar a suspensão celular obtida em estufa a 37 °C por 20 minutos;
5. Pré-fixar com 6 gotas de Fixador Carnoy recém-preparado - metanol: ácido acético (3:1) e ressuspender o material pipetando bem devagar;
6. Deixar descansar por 5 minutos;
7. Centrifugar por 10 minutos a 900 rpm. Desprezar o sobrenadante e completar para 6 ml com fixador pipetando e homogeneizando novamente;
8. Centrifugar durante 10 minutos a 1000 rpm, desprezar o sobrenadante e completar novamente para 6 ml de fixador, repetindo essa lavagem por mais duas vezes;
9. Após a última lavagem, diluir o material acrescentando fixador, de forma que este apresente um aspecto um pouco turvo;
10. Preparar as lâminas que deverão estar previamente aquecidas em banho-maria a 60°C.
11. O material deverá ser guardado em tubos e mantidos em freezer à - 20°C.

ANEXO B - HETEROCROMATINA CONSTITUTIVA (BANDA C)

1. Tratar as lâminas contendo as preparações cromossômicas com HCl 0,2N a 46 °C por 12 minutos,
2. Lavar as lâminas em água destilada à temperatura ambiente e secas em estufa a 37°C.
3. Colocar as lâminas em solução recém preparada de NaOH a 5%, em temperatura ambiente, por 2 minutos e 30 segundos.
4. Interromper a ação do NaOH colocando as lâminas em solução de HCl 0,2N em temperatura ambiente por cerca de 30 segundos.
5. Lavar as lâminas em água destilada e secar.
6. Incubar as lâminas em solução 2xSSC (Cloreto de Sódio 0,3M e Citrato Trissódico 0,03M, pH 6,8) em banho-maria a 60 °C, por 40 minutos
7. Lavar e secar as lâminas em estufa.
8. Corar com iodeto de propídio.