

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

PATRÍCIA BARBOSA

ELEMENTOS GENÔMICOS REPETITIVOS NO COMPLEXO *Astyanax scabripinnis*
(TELEOSTEI, CHARACIDAE)

PONTA GROSSA
2013

PATRÍCIA BARBOSA

ELEMENTOS GENÔMICOS REPETITIVOS NO COMPLEXO *Astyanax scabripinnis*
(TELEOSTEI, CHARACIDAE)

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-orientador: Prof. Dr. Orlando Moreira-Filho.

PONTA GROSSA
2013

Ficha catalográfica: Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG.

- B238 Barbosa, Patricia
 Elementos genômicos repetitivos no complexo *Astyanax scabripinnis*
 (teleostei, characidae) / Patricia Barbosa. Ponta Grossa, 2013.
 63f.
- Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – área de concentração
 Biologia Evolutiva), Universidade Estadual de Ponta Grossa e Universidade
 Estadual do Centro - Oeste.
- Orientador: Prof. Dr. Roberto Ferreira Antoni.
 Co-orientador: Prof. Dr. Orlando Moreira-Filho.
1. DNA. 2. Retrotransposon. 3. DNA satélite. 4. FISH. 5. Cromossomo B.
 I. Antoni, Roberto Ferreira. II Moreira-Filho, Orlando. III.T.
- CDD: 575



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. 01/2013

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 **PATRÍCIA BARBOSA**.

Aos oito dias do mês de fevereiro de dois mil e treze, 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) **PATRÍCIA BARBOSA**, 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), Prof^ª Dr^ª Mara Cristina de Almeida Matiello (UEPG) Dr^ª Thaís Saad Sczepanski (UENP). 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: "**Elementos Genômicos Repetitivos no Complexo *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae)**". 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, 08 de fevereiro de dois mil e treze.

Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni

Prof^ª Dr^ª Mara Cristina de Almeida Matiello

Prof^ª Dr^ª Thaís Saad Sczepanski

Dedico este trabalho aos meus pais, Assis e Vera, e a minha irmã, Renata, pela paciência e total apoio.

AGRADECIMENTOS

Quero expressar os mais sinceros agradecimentos àqueles que me incentivaram e me apoiaram durante a realização deste trabalho.

À minha família, pelo amor e compreensão neste período, que apesar das limitações sempre torceram por mim.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni, quero agradecer principalmente pela confiança, por me receber e investir na minha formação. Acima de tudo, sempre me incentivou, é uma pessoa que tenho grande admiração. Muitíssimo obrigada.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Orlando Moreira-Filho, pelo auxílio e parceria durante este período.

Ao Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari, por sua intensa participação durante a realização deste trabalho. Muito obrigada pelos ensinamentos, confiança, “apoio” e pela amizade.

À Profa. Dra. Mara Cristina Almeida Matiello, a quem estimo muito e sempre me auxiliou nas dificuldades. Professora, sempre tão prestativa, muito obrigada pela paciência e ensinamentos.

À Profa. Dra. Viviane Nogaroto Vicari, por todo auxílio e pela contribuição com seus conhecimentos.

À minha grande amiga, Marcela Baer Pucci. Mar, mais que uma amiga, uma irmã, faltam palavras pra agradecer tudo o que você fez nestes dois anos. Muitíssimo obrigada pelo companheirismo, pela amizade, pelo apoio nos momentos difíceis, pelo auxílio no laboratório, pelas risadas, enfim, grandes e ótimos momentos nós passamos e estarão pra sempre guardados no coração.

Aos meus grandes amigos, Luiz Oliveira e Tajiana Costa da Silva. Meus queridinhos, obrigada pelos ótimos momentos juntos, pelas risadas, conselhos, apoio, enfim, pela grande amizade que conquistamos. Para sempre guardados no coração. “Loui”, uma pessoa maravilhosa e com uma risada que contagia a todos, em tão pouco tempo nos demos tão bem, aprendi muito com você. Taji, uma amiga muito especial, além disso, grande companheira que posso contar sempre. Muitíssimo obrigada.

À Maelin da Silva, minha professora e orientadora na graduação, acima de tudo, grande amiga, obrigada por acreditar em mim e por me lançar no meio científico, parte desta conquista devo a você.

Ao Miguel Airton Carvalho, técnico do laboratório de citogenética e amigo, pelo auxílio e pelos momentos de descontração. “Bonito”, muito obrigada!

Aos meus colegas de laboratório que contribuíram com minha formação pessoal e profissional, com os quais convivi neste período: Léo, Jordana, Diana, Kaline, Karine, Karina, Thais, Alain, Lucas, Rafael, Felipe, Micheli’s, Jonathan, Paulo e Bárbara.

Aos amigos que conquistei aqui em Ponta Grossa, Jonas, Charles, Hugo, Naiara e Diego Baiano, que acompanharam de longe esta jornada. Muito obrigada pelos ótimos momentos que passamos juntos e especialmente pela amizade.

À Zoli, secretária da Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, sempre tão prestativa.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa, pelo suporte.

À Universidade Federal de São Carlos, pela parceria e auxílio na coleta de exemplares.

À Capes, pelo apoio financeiro concedido para a realização deste trabalho.

É mergulhando de cabeça, se atirando sem medo, acreditando e não desanimando que se chega a seus objetivos. Nada cai do céu. Sem riscos, sem empenho e esforço a vida não tem graça.

(Hudson Pessini)

O caminho para a felicidade não é reto. Existem curvas chamadas *equivocos*. Existem semáforos chamados *amigos*, luzes de cautela chamadas *família*, e tudo se consegue se tens: um estepe chamado *decisão*, um motor poderoso chamado *amor*, um bom seguro chamado *fé*, combustível abundante chamado *paciência*, mas acima de tudo um motorista habilidoso chamado Deus.

(Mahatma Gandhi)

RESUMO

A maior parte do genoma dos eucariotos é constituída por DNA repetitivo ou DNA de múltiplas cópias, o qual já foi considerado “lixo”, podendo estar associado à heterocromatina. Neste estudo foram analisadas três populações de *Astyanax scabripinnis* provenientes de rios e córregos de Pindamonhangaba e Guaratinguetá (SP, Brasil) e uma população da cidade de Maringá (PR, Brasil) quanto a localização das regiões organizadoras de nucléolo (RONs), DNA satélite As51, DNA ribossomal (DNAr) 18S e DNAr 5S. Ainda, foram isoladas e mapeadas sequências repetitivas por meio da técnica de *C_ot-1*, que mostrou homologia com UnaL2, retrotransposon do tipo LINE. A hibridação *in situ* fluorescente (FISH), com sonda construída para o retrotransposon isolado, evidenciou marcações dispersas e mais concentradas em regiões centroméricas e teloméricas dos cromossomos, co-localizadas e interespaçadas com DNAr 18S e As51, comprovada pela técnica de *fiber*-FISH. O cromossomo B das populações mostrou marcações bastante conspícuas com a sonda LINE, também co-localizada com sequências As51. As RONs apresentaram-se ativas em sítios únicos de um par homólogo nas três populações, não havendo indícios de que elementos transponíveis e DNA repetitivo tenham influência na sua regulação ao nível das análises realizadas.

Palavras-chave: DNAr, retrotransposon, DNA satélite, FISH, cromossomo B.

ABSTRACT

The most part of the eukaryote genomes is constituted for repetitive DNA or multiple copies DNA, which has already been considered as “junk”, may be associated to the heterochromatin. In this study three *Astyanax scabripinnis* populations from Pindamonhangaba and Guaratinguetá (SP, Brazil) rivers and stream and one population from Maringá (PR, Brazil) were analyzed about the nucleolar organizing region (NORs), As51 satellite DNA, 18S and 5S rDNA location. Moreover, repetitive sequences were isolated and mapped through *Cot-1* technique, which showed homology with UnaL2, a LINE type retrotransposon. The fluorescent *in situ* hybridization (FISH), with the isolated built retrotransposon probe, evidenced disperse labeled and stronger in centromeric and telomeric chromosomes regions, co-located and interspersed with the 18S DNA and As51, proven by the *fiber*-FISH technique. The B chromosome of those populations showed very conspicuous labeled with the LINE probe, also co-located with the As51 sequences. The NORs were active in a single site of a homologue pair in all three populations, with no evidence that the transposable elements and repetitive DNA have influence in its regulation at the performed analyzes level.

Key-words: rDNA, retrotransposon, satellite DNA, FISH, chromosome B.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Região Neotropical onde estão distribuídos os representantes da família Characidae.....	13
Figura 2 – Exemplares de <i>Astyanax scabripinnis</i> das respectivas populações: a) Córrego da Fazenda Lavrinha; b) Ribeirão Grande e c) Córrego Tatupeba. Barra: 1 cm.....	23
Figura 3 – Mapa com a localização dos pontos de coleta: a) Córrego da Fazenda Lavrinha; b) Ribeirão Grande e c) Córrego Tatupeba.....	24
 Capítulo I – Elementos repetitivos genômicos no complexo <i>Astyanax scabripinnis</i> (Teleostei, Characidae)	
Figura 1 – Cariótipos de <i>Astyanax scabripinnis</i> com metáfases submetidas à FISH com sondas de DNAr 18S (vermelho) e de DNA satélite As51 (verde) com as respectivas RONS das populações; a) Córrego da Fazenda Lavrinha; b) Ribeirão Grande e c) Córrego Tatupeba. Barra: 10 μ m	41
Figura 2 – Alinhamento das sequências dos clones do produto do C ₀ t-1 com a sequência UnaL2 da <i>Anguilla japonica</i> ; a) clone 13 e b) clone 16. As bases em vermelho são idênticas.....	42
Figura 3 – Gel de agarose 1%. Resultado da PCR utilizando os <i>primers</i> de LINE construídos a partir do alinhamento das sequências	42
Figura 4 – Hibridação <i>in situ</i> fluorescente com a sonda do LINE (vermelho) em metáfases de <i>A. scabripinnis</i> das respectivas populações; a) Córrego da Fazenda Lavrinha; b) Ribeirão Grande e c) Maringá. Barra: 10 μ m.....	43
Figura 5 – <i>Double FISH</i> realizada com sondas de DNA repetitivo em fêmeas portadoras de cromossomos B; a) LINE (vermelho) + DNA satélite As51 (verde); b) LINE (vermelho) + DNAr 5s (verde) e c) LINE (vermelho) + DNAr 18S (verde). Barra: 10 μ m.....	44
Figura 6 – <i>Double fiber FISH</i> em fibras cromatínicas estendidas de <i>A. scabripinnis</i> utilizando sondas de LINE (vermelho) e DNA satélite As51 (verde); a) LINE; b) As51; c) LINE + As51 e d) LINE + As51 + DAPI. Barra: 10 μ m.....	45

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
1.1 ASPECTOS GERAIS DA ORDEM CHARACIFORMES.....	12
1.1.1 Características e distribuição da Família Characidae.....	12
1.1.2 O gênero <i>Astyanax</i> e a espécie <i>Astyanax scabripinnis</i>	14
1.2 ESTUDOS CITOGENÉTICOS EM <i>Astyanax scabripinnis</i>	15
1.2.1 Cromossomos B.....	16
1.2.2 Origem dos cromossomos B e a ocorrência em <i>Astyanax scabripinnis</i>	17
1.3 SEQUÊNCIAS DE DNA REPETITIVO.....	18
1.4 BACIA HIDROGRÁFICA.....	20
2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	21
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1 OBJETOS DE ESTUDO E LOCAIS DE COLETA.....	21
3.2 METODOLOGIAS.....	24
3.2.1 Citogenética convencional.....	24
3.2.2 Citogenética molecular.....	24
4 RESULTADOS.....	27
Capítulo I - Elementos repetitivos e ribossômicos no complexo <i>Astyanax scabripinnis</i> (Teleostei, Characidae).....	28
CONCLUSÕES.....	46
REFERÊNCIAS.....	47
5 ANEXOS.....	55
5.1 – Protocolos – Citogenética convencional.....	56
5.2 – Protocolos – Citogenética molecular.....	57

1 INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS DA ORDEM CHARACIFORMES

Os Characiformes compreendem o maior grupo de peixes de água doce conhecido. A ordem é representada por 18 famílias, sendo elas: Distichodontidae, Citharinidae, Parodontidae, Curimatidae, Prochilodontidae, Anostomidae, Chilodontidae, Crenuchidae, Hemiodontidae, Alestiidae, Gasteropelecidae, Characidae, Acestrorhynchidae, Cynodontidae, Erythrinidae, Lebiasinidae, Ctenoluciidae e Hepsetidae; com 1.674 espécies descritas e agrupadas em 270 gêneros (NELSON, 2006). Os representantes desta ordem estão distribuídos em continentes americanos - sul da América do Norte, Américas Central e do Sul – e também em continentes africanos, atingindo a maior diversidade na região Neotropical (BERRA, 2001), a qual é a mais diversificada e rica em peixes de água doce, onde Characiformes e Siluriformes têm maior representação (ARTONI; VICARI; BERTOLLO, 2000). Vari e Malabarba (1998) estimaram que 25% das espécies de peixes se concentram nessa região, com mais de 8.000 espécies.

Os membros da ordem apresentam diversidade de tamanho notável, com espécies que não passam de 26 milímetros até espécies com 1 metro de comprimento (MOREIRA, 2007), com mandíbula superior não protraída e dentes faríngeos frequentemente pequenos (NELSON, 2006). Diferentes hábitos alimentares também são observados, tais como: piscívoras, iliófagas (se alimentam de detritos); herbívoras e lepidófagas (se alimentam de escamas de outros peixes) e espécies que se alimentam das nadadeiras de outros peixes (MOREIRA, 2007).

1.1.1 Características e distribuição da Família Characidae

A família Characidae é a mais numerosa e complexa entre os Characiformes (RODRIGUES; QUEROL; BRACCINI, 2005). Compreende a maioria dos peixes de escamas caracterizados por serem bons nadadores, pela presença de nadadeira caudal adiposa (BRITSKI, 1972), dentes bem desenvolvidos, nadadeira pélvica, nadadeira anal curta a moderadamente longa e linha lateral usualmente curvilínea, às vezes incompleta (NELSON, 2006). A família é composta por cerca de 30 subfamílias, 250 gêneros (BRITSKI; SATO; ROSA, 1988) e 1.200 espécies

(MIRANDE, 2010; REIS et al., 2003), com ampla distribuição geográfica e predominância na América do Sul (Figura 1). Seus representantes apresentam variação na morfologia, reprodução e acasalamento (GÉRY, 1977). Na família Characidae estão incluídos peixes com hábitos alimentares diversificados, entre eles herbívoros, onívoros, carnívoros e com grande variedade entre habitats (BRITSKI; SATO; ROSA, 1988). Os peixes são conhecidos popularmente como lambaris, piracanjubas, piranhas, pacus, peixes-cachorro e dourados (BRITSKI, 1972).

Figura 1 – Região Neotropical onde estão distribuídos os representantes da família Characidae



Fonte: adaptado de BERRA, T. M. **Freshwater Fish Distribution**. London: Academic Press, 2001. 608 p.

A alta diversidade e o grande número de espécies dificultam proposições de relações de parentesco nesta família. Neste sentido, Weitzman e Malabarba (1998) sugerem que a família Characidae poderia ser hipoteticamente considerada um grupo monofilético quando analisadas em um contexto filogenético mais amplo, incluindo relações de parentesco com outros grupos e subgrupos aparentados. As espécies desta família são agrupadas em subfamílias devido a grande diversidade (BRITSKI; SATO; ROSA, 1988; REIS et al., 2003). A subfamília Tetragonopterinae é um grupo bastante diversificado possuindo o maior número de gêneros dentro da

família Characidae (GARUTII; BRITSKI, 2000), sendo que o gênero *Astyanax* agrupa aproximadamente mais de uma centena de espécies (LIMA et al., 2003; NELSON, 2006) encontradas ao longo da América do Sul e América Central, onde são conhecidos como lambaris ou piabas, respectivamente.

1.1.2 O gênero *Astyanax* e a espécie *Astyanax scabripinnis*

Astyanax é considerado, atualmente, um gênero *incertae sedis* da família Characidae (subfamília Tetragopterinae) devido à falta de dados que comprovem seu monofiletismo (LIMA et al., 2003). Este gênero possui distribuição desde o sul dos Estados Unidos até a região central da Argentina (LIMA et al., 2003). Segundo trabalhos de Fink e Fink (1981) e Lima et al. (2003), a espécie tem a seguinte posição taxonômica:

Classe – Osteichthyes

Subclasse – Actinopterygii

Infraclasse – Neopterygii

Divisão – Teleostei

Subdivisão – Euteleostei

Superordem – Ostaryophysii

Série – Otophysi

Subsérie – Characiphysi

Ordem – Characiformes

Família – Characidae

Gênero - *Incertae sedis*

Em 1927, Eigenmann propôs que 74 espécies e subespécies de *Astyanax* vivem em águas brasileiras. Em 1948, foram descritas 6 subespécies de *Astyanax scabripinnis* por Fowler, sendo elas: *A. scabripinnis scabripinnis*, *A. scabripinnis rivularis*, *A. scabripinnis laticeps*, *A. scabripinnis longirostris*, *A. scabripinnis intermedius* e *A. scabripinnis paranae*. Bertaco e Lucena (2006) propuseram que o "complexo scabripinnis" é composto por aproximadamente 15 espécies, entre elas *A. paranae*, até então considerada uma subespécie de *A. scabripinnis*. Estes trabalhos

demonstram que o número de espécies pode ser maior do que as estimativas iniciais para o gênero *Astyanax*.

Muitos estudos reforçam a hipótese de que *A. scabripinnis* forma um complexo de espécies, como proposto por Moreira-Filho e Bertollo (1991), com base em dados morfológicos e cariotípicos. O conceito de "complexo de espécies" vai além da condição de espécies crípticas e simpátricas, no caso de *Astyanax scabripinnis*. Populações alopátricas dessa espécie também evidenciam variações morfológicas e cariotípicas que dificultam a identificação ao nível de espécie (MOREIRA-FILHO; BERTOLLO, 1991).

Características biológicas podem explicar a diversidade nesse grupo, uma vez que são espécies que ocorrem em cabeceiras de riachos, formam pequenas populações isoladas com evolução independente, favorecendo assim a fixação de rearranjos cromossômicos nas populações (MOREIRA-FILHO; GALETTI JR.; BERTOLLO, 2004). Barreiras físicas, químicas ou bióticas impedem o fluxo entre populações, no caso de populações de *A. scabripinnis* que vivem em cabeceiras isoladas, esses obstáculos podem contribuir para a variedade genética, como consequência da ausência do fluxo gênico entre elas.

1.2 ESTUDOS CITOGENÉTICOS EM *Astyanax scabripinnis*

Dados de estudos citogenéticos e evolutivos em *Astyanax scabripinnis* podem contribuir para entender o complexo de espécies. Moreira-Filho e Bertollo (1991) caracterizaram o grupo como um complexo analisando aspectos da morfologia e o cariótipo de sete populações. Os dados diferenciaram quanto ao número diploide ($2n = 46, 48$ e 50), tipos de cromossomos e distribuição de heterocromatina apresentando variações entre indivíduos da mesma bacia. Vicari et al. (2008) analisaram espécimes de *A. scabripinnis* provenientes de três bacias hidrográficas distintas (estado do Paraná) e confirmaram alta variabilidade cariotípica para a espécie. O número cromossômico $2n = 50$ é o mais comum entre as populações (BERTOLLO, 1991; FERRO; MAISTRO; OLIVEIRA; FORESTI, 2000; MANTOVANI et al., 2000; MOREIRA-FILHO; NÉO; BERTOLLO, 2000; MOREIRA-FILHO, 2000; FERRO et al., 2001; MAISTRO; OLIVEIRA; FORESTI, 2001; MOREIRA-FILHO et al., 2001; MOREIRA-FILHO; BERTOLLO, 2003; VICARI et al., 2008a). Entretanto, na bacia do Rio Ivaí alguns espécimes apresentaram $2n = 48$

(MOREIRA-FILHO; BERTOLLO, 1991; SOUZA; MOREIRA-FILHO; GALETTI JR., 1996; MIZOGUCHI; MARTINS-SANTOS, 1997; MAISTRO; OLIVEIRA; FORESTI, 2000; MANTOVANI et al., 2000; ALVES; MARTINS-SANTOS, 2002), 46 ou 50 cromossomos (FERNANDES; MARTINS-SANTOS, 2005).

1.2.1 Cromossomos B

Genomas eucariotos além de serem compostos por genes em cromossomos do complemento A, também são formados de elementos genéticos que não obedecem à lei de herança Mendeliana. Cromossomos B, também chamados de supranumerários ou acessórios, são cromossomos adicionais com pouca ou nenhuma homologia com o complemento A sendo instáveis durante a mitose e/ou meiose. A maioria dos cromossomos B apresenta uma taxa de transmissão maior que 0,5 (transmissão Mendeliana), propiciando fixação e acúmulo no genoma, por isso são conhecidos como “parasitas” (revisado por CAMACHO, 2005). Além disso, cromossomos do complemento A possuem mecanismos de silenciamento, os quais atuam na defesa contra a “invasão” de cromossomos B (CAMACHO et al., 1997).

A presença de cromossomo B tem sido verificada em vários grupos de plantas e animais (CAMACHO; SHARBEL; BEUKEBOOM, 2000). Provavelmente tenham sido originados de cromossomos do complemento padrão (CAMACHO; PARKER, 1993, CAMACHO; SHARBEL; BEUKEBOOM, 2000), embora tenham seguido seu próprio caminho na evolução (MESTRINER et al., 1999).

Até 2008 foi contabilizada a ocorrência de cromossomos supranumerários em 61 espécies de peixes neotropicais, pertencentes a 16 famílias e 7 ordens diferentes (CARVALHO; MARTINS-SANTOS; DIAS, 2008). Particularmente, cromossomos B são frequentes no gênero *Astyanax*. Estudos já evidenciaram a presença de um macrocromossomo B, totalmente heterocromático, em três espécies de *Astyanax*: *A. fasciatus*, *A. schubarti* e em *A. scabripinnis*, pertencentes a três bacias hidrográficas distintas (MOREIRA-FILHO et al., 2001). Espécimes de *A. scabripinnis* da bacia do Rio Ivaí apresentaram cromossomo B parcialmente heterocromático no bandamento C, enquanto que em uma população da bacia do Rio Paraná foi encontrado microcromossomos B totalmente heterocromáticos, sendo que nas duas populações presente exclusivamente em fêmeas (MIZOGUCHI;

MARTINS-SANTOS, 1997). Esses dados suscitam hipóteses sobre a origem desses cromossomos no gênero *Astyanax* e mesmo no complexo *A. scabripinnis*.

1.2.2 Origem dos cromossomos B e a ocorrência em *Astyanax scabripinnis*

Em *A. scabripinnis*, a primeira descrição de cromossomos B ocorre na década de 1990 e mais atualmente pesquisas envolvem o isolamento, clonagem e sequenciamento de DNAs repetitivos associados a eles (MOREIRA-FILHO; GALETTI Jr.; BERTOLLO, 2004). A primeira evidência a auxiliar no entendimento da origem e caracterização do cromossomo B em *A. scabripinnis* se deu a técnica de bandamento C. No trabalho realizado por Salvador e Moreira-Filho (1992) foram descritos dois tipos de cromossomos B; um deles totalmente heterocromático e o outro, apresentando um segmento de eucromatina em cada lado do centrômero e heterocromatina distal. Esses autores sugeriram, com base na semelhança com os cromossomos do primeiro par de homólogos metacêntricos, que o cromossomo B seria derivado por não-disjunção do par 1 do complemento A, posteriormente tendo sofrido um processo de heterocromatinização. A análise quanto à ocorrência de macrocromossomos B em espécimes de *A. scabripinnis* tem demonstrado, na maioria dos casos, a ocorrência de um cromossomo metacêntrico grande, similar em tamanho aos cromossomos do primeiro par do complemento A, com os cromossomos B totalmente heterocromáticos (MAISTRO et al., 1992).

O isolamento do DNA repetitivo As51 ajudou na construção da hipótese de que o cromossomo B metacêntrico de *Astyanax scabripinnis* tenha sido originado pela formação de um isocromossomo, dado a partir de um cromossomo acrocêntrico do complemento A (MESTRINER et al., 1999). Essa hipótese ganhou maior sustentação com o emprego da hibridação *in situ* com a sonda As51 em células paquitênicas que demonstrou o autopareamento do cromossomo B nessa espécie (VICARI et al., 2011).

De acordo com a revisão de Moreira-Filho, Galetti Jr. e Bertollo (2004), o cromossomo B metacêntrico é o mais comum entre as espécies analisadas, podendo ser essa a forma ancestral, embora cromossomos B com outras morfologias tenham sido encontrados. A ausência de fluxo gênico nas populações isoladas geograficamente poderia explicar as prováveis variações do cromossomo B encontradas em algumas populações (cromossomos B metacêntricos,

submetacêntricos e microcromossomos B). Essas seriam, portanto, atribuídas a eventos de rearranjos cromossômicos posteriores a origem dos mesmos.

1.3 SEQUÊNCIAS DE DNA REPETITIVO

Sequências repetitivas encontradas no genoma podem ser classificadas dependendo da sua disposição: em *tandem*, quando se encontram em repetições uma ao lado da outra; ou dispersas, quando estão espalhadas no genoma, como são os casos dos elementos transponíveis: transposons e retrotransposons (JURKA et al., 2005; TIMBERLAKE, 1978). Outros exemplos de DNA repetitivo são classificados de acordo com o grau de repetição, chamados de DNAs satélites, os quais são os principais componentes da heterocromatina e podem ser detectados pelo bandamento C, DNAs microsatélites e DNAs minissatélites (ABEL; MANTOVANI; MOREIRA-FILHO, 2006; MARTINS, 2007). Os DNAs satélites podem estar associados às RONS, como visto em *Astyanax janeiroensis*, causando silenciamento gênico do DNAr maior (VICARI et al., 2008b).

Sequências de DNA repetitivo podem ser usadas como ferramentas importantes para estudos evolutivos, como por exemplo, as unidades repetitivas ribossomais 45S e 5S, as quais sintetizam RNAs ribossomais (RNAr) e são conservados nos eucariotos (LONG; DAWID, 1980).

No genoma celular, esses *cístrons* ribossomais estão organizados em tandem, onde o DNAr 45S codifica os RNAr 28S, 5,8S e 18S. Essa região pode ser identificada pela coloração por prata quando esses genes estão ativos e correspondem as regiões organizadoras de nucléolo (RONS); enquanto que, o DNAr 5S que codifica o RNAr 5S pode ser localizado somente pela hibridação *in situ* com sondas específicas (FERRO et al., 2001; MANTOVANI; ABEL; MOREIRA-FILHO, 2005).

DNAs satélites podem ser derivados de elementos transponíveis e são componentes responsáveis pela evolução do genoma (MARTINS, 2007). No gênero *Astyanax* é encontrado uma família de DNA satélite, descrito por Mestriner et al. (2000), com 59% de regiões ricas em AT e formado por 51 pares de base (pb), chamado de As51. Esse DNA repetitivo se encontra distribuídos em blocos distais heterocromáticos quando hibridado sobre o cromossomo B de *A. scabripinnis*

(MESTRINER, 1999; VICARI et al., 2011), e em outros autossomos, inclusive em diferentes outras espécies do gênero *Astyanax* (KANTEK et al., 2009).

Elementos transponíveis têm como principal característica a habilidade de se espalhar dentro do genoma através de sua própria amplificação, também são chamados de parasitas genômicos, mas que beneficiaram a evolução (KIDWELL; LISCH, 2001). A classe I são os retrotransposons devido a sua dependência de utilizar o RNA intermediário para sua replicação. Essa classe está dividida em retrotransposons LTR (*long terminal repeats*), onde os retrotranscritos para DNA são inseridos no genoma após a retrotranscrição, e retrotransposons não-LTR, onde a retrotranscrição ocorre simultaneamente enquanto são inseridos. Esta estratégia leva a formação de novos locais genômicos e sítios de integração (OZOUF-COSTAZ et al., 2004; FERNANDEZ-MEDINA et al., 2012). O mecanismo “copia e cola” dos retrotransposons faz com que sejam geradas novas cópias de uma mesma sequência (KIDWELL, 2002).

A classe II ou transposons são aqueles que possuem um gene codificante para a enzima transposase, essa enzima é codificada pelas repetições terminais invertidas e possibilitam o movimento direto das sequências dentro do genoma pelo mecanismo “corta e cola”, onde as sequências são retiradas da fita de origem para uma nova posição no genoma (FERNANDEZ-MEDINA et al., 2012). Essa classe inclui em sua subclasse I, a superfamília dos elementos *hAT* (*hobo*, *Activator*, *Tam-3*), a superfamília dos elementos *mariner*-like, os elementos *P* e os elementos *MuDR* (revisado por KIDWELL, 2002) e na subclasse II estão o *Helitron* e *Maverick* (WICKER et al., 2007).

LINE são os chamados “*long interspersed elements*” e SINE, “*short interspersed elements*”, pertencentes ao grupo dos retrotransposons não-LTR, utilizam o RNA intermediário para sua replicação. Sendo que os SINEs não possuem sequências codificantes para endonuclease e transcriptase reversa, por isso, são chamados de retrotransposons não-autônomos que necessitam recrutar uma maquinaria enzimática para sua retrotransposição (BABA et al., 2004).

A caracterização dos elementos móveis ainda é bastante reduzida nos peixes. Através do mapeamento físico já foram descritos 15 elementos transponíveis em 32 espécies de peixes de ordens distintas. A primeira descrição são elementos do grupo *Rex* no genoma de *Xiphophorus* (VOLFF et al., 1999). Essa classe já foi

mapeada em 28 espécies de peixes, alguns exclusivos de regiões heterocromáticas e outros, dispersos pelo genoma (FERREIRA et al., 2011).

Com relação à distribuição e organização funcional de retroelementos em peixes e através do mapeamento cromossômico, Oliveira et al. (2003) evidenciou sequências de SINE em *Oreochromis niloticus* dispersos por todos os cromossomos em pequenos *clusters* com relativa concentração em posições terminais. Ainda, já foram encontrados múltiplos sítios que rDNAs que parecem estar associados a elementos repetitivos dispersos podendo ser não funcionais (pseudogenes), como o transposon Tc1-like localizado no espaçador intergênico (ITS) do rDNA 5S de *Gymnotus* (SILVA et al., 2011).

1.4 BACIA HIDROGRÁFICA

A região do Vale do Paraíba, no Estado de São Paulo, é delimitada pela Serra da Mantiqueira que se apresenta como divisor de águas entre rios costeiros e continentais, com variações de altitude que vão de 600 a 2.050 metros (m) (MODENESI, 1988). A elevada altitude faz com que os sistemas hídricos possuam baixa temperatura e grande quantidade de cachoeiras que impedem o fluxo entre populações de *A. scabripinnis* (MOREIRA-FILHO; GALETTI JR.; BERTOLLO, 2004). Os riachos normalmente são corredeiras, com leitos pedregosos e rasos, com águas-frias, límpidas e oxigenadas, caracterizando um ambiente montanhoso (SCHROEDER-ARAUJO et al., 1986; SEIBERT, 1975). Os municípios de Guaratinguetá e Pindamonhangaba pertencem ao Vale do Paraíba, região próxima a Serra da Mantiqueira e Serra do Mar.

A bacia do Rio Paraíba do Sul é alongada e distribui-se na direção leste-oeste entre as Serras do Mar e da Mantiqueira, também com colinas e montanhas, sendo um ambiente acidentado com pontos mais elevados chegando a 2.000 m de altitude e temperatura média anual variando de 18 °C a 24 °C (MARENGO; ALVES, 2005). A bacia hidrográfica abrange 184 municípios, 39 do estado de São Paulo, 57 do Rio de Janeiro e 88 de Minas Gerais, totalizando uma área de 56.500 km² (AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS, 2013).

O Rio Ivaí no interior do Paraná é o segundo maior afluente do rio Paraná e pertence à bacia do Rio Ivaí. Em sua margem direita possui afluentes de primeira ordem como o Córrego Tatupeba nas proximidades do município de Maringá.

Pertencente ao terceiro planalto, a bacia caracteriza-se por pequenos espigões, altitudes variam de 600 m – com vales mais profundos e divisores de água – a 1.200 m com temperatura média anual de 20 °C a 30 °C (BALDO, 2006). Neste riacho, as populações de *A. scabripinnis* vivem em simpatria e ainda não foram descritas espécies híbridas, sendo evidenciados citótipos com $2n = 46, 48$ e 50 cromossomos (FERNANDES; MARTINS-SANTOS, 2005).

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Estudos citogenéticos realizados com populações de *Astyanax scabripinnis* mostram uma grande variabilidade cariotípica, inclusive em seu número diploide ($2n = 46, 48$ e 50), ainda ocorre a existência de cromossomos supranumerários em diferentes populações com diferente morfologia e tamanho, o que é muito descrito em estudos feitos na região de Campos do Jordão e Maringá. Apesar de estas populações serem muito estudadas, ainda faltam dados a fim de contribuir nas interpretações de dados evolutivos das populações e ainda, de como a estrutura cromossômica a nível molecular está relacionada com a diversidade e função.

Sendo assim, este trabalho tem como objetivo investigar a diferenciação do genoma de *A. scabripinnis* através da localização cromossômica e o papel dos elementos repetitivos e do DNA ribossomal (DNAr) maior. Assim, foram estabelecidos as seguintes metas:

- 1) Caracterizar citogeneticamente as diversas populações de *A. scabripinnis*;
- 2) Comparar os indivíduos das populações em estudo quanto a localização do DNAr 18S e 5S;
- 3) Descrever as diferentes famílias de DNA repetitivo encontradas por C_0t-1 ;
- 4) Realizar uma análise comparativa dos dados encontrados nas populações.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBJETOS DE ESTUDO E LOCAIS DE COLETA

Nesse estudo foram amostrados espécimes de *Astyanax scabripinnis*, totalizando 134 indivíduos (Figura 2). Sendo que 39 exemplares pertencentes a região de Guaratinguetá, estado de São Paulo, 63 exemplares de

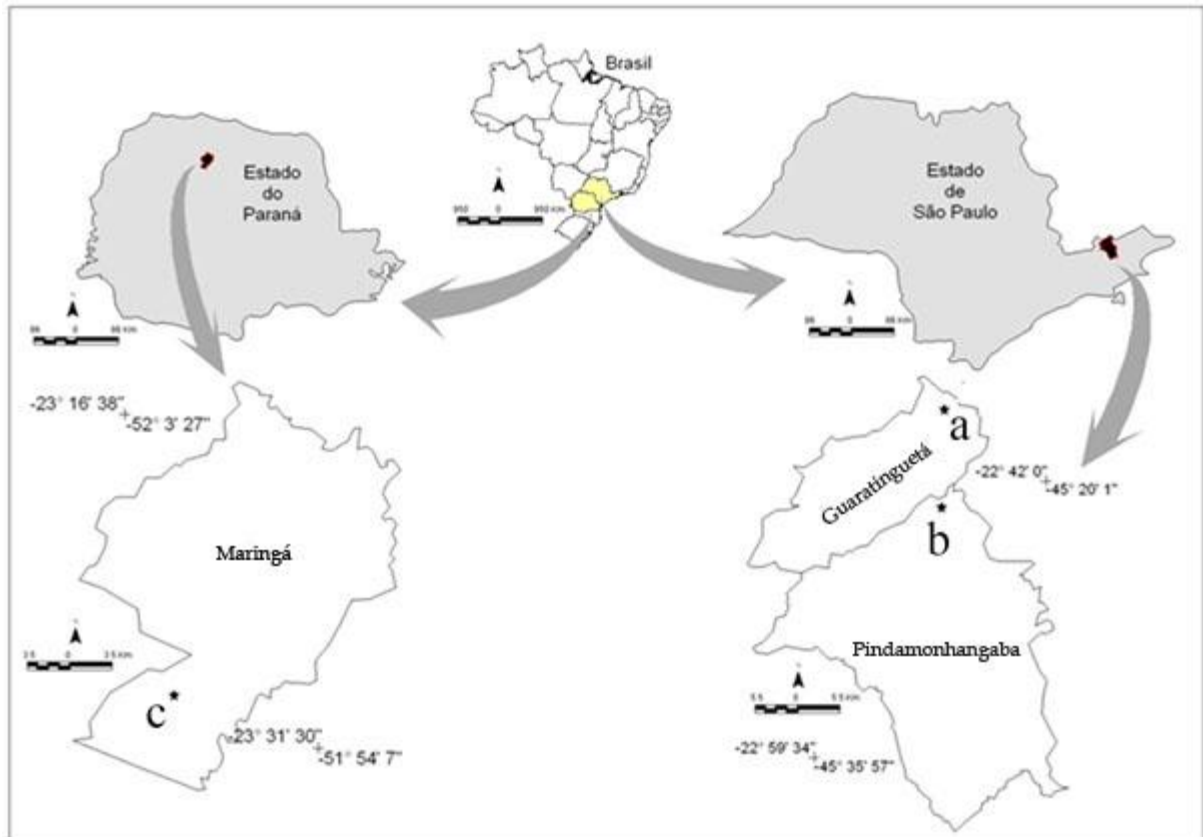
Pindamonhangaba - SP e 32 exemplares de Maringá, estado do Paraná, provenientes de três localidades: bacia do Rio Paraíba do Sul 1) Córrego da Fazenda Lavrinha (1.900 m de altitude), Guaratinguetá (coordenadas S 22°40'49,5" e WO 45°23'), 2) Ribeirão Grande (1.850 m de altitude), Pindamonhangaba (coordenadas S 22°43'378" e WO 45°27"128") – SP e bacia do Rio Ivaí 3) Córrego Tatupeba (400 m de altitude), Maringá (coordenadas S 23°29'592" e WO 52°01'041") –PR (Figura 3). Os exemplares foram identificados pelo Dr. Oscar A. Shibatta e receberam número de depósito no Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina (MZUEL nº 5654, 5657).

Figura 2 - Exemplares de *Astyanax scabripinnis* das respectivas populações: a) Córrego da Fazenda Lavrinha; b) Ribeirão Grande e c) Córrego Tatupeba. Barra: 1 cm.



Fonte: A autora

Figura 3 – Mapa com a localização dos pontos de coleta: a) Córrego da Fazenda Lavrinha; b) Ribeirão Grande e c) Córrego Tatupeba.



Fonte: A autora

3.2 METODOLOGIAS

3.2.1 Citogenética convencional

Preparações cromossômicas e Ag-RONs

A técnica utilizada para obtenção de cromossomos mitóticos foi a descrita por Bertollo, Takahashi e Moreira-Filho (1978) (anexo 5.1.1). As regiões organizadoras de nucléolo (RONs) foram localizadas segundo o método de Howell e Black (1980) (anexo 5.1.3).

3.2.2 Citogenética molecular

Obtenção de DNA, DNA repetitivo e clonagem

A extração de DNA genômico foi realizada através do método CTAB (MURRAY; THOMPSON, 1980) com modificações (anexo 5.2.1). O DNA genômico

total das espécies de *A. scabripinnis* foi utilizado no procedimento do DNA C_{ot}-1 (ZWICK et al., 1997) adaptado para obtenção de DNA repetitivo em peixes (FERREIRA; MARTINS, 2008; VICARI et al., 2010) (anexo 5.2.2). O produto DNA C_{ot}-1 foi ligado ao plasmídeo pMOS (Promega®) para posterior transformação de células competentes de *Escherichia coli* DH5α (Gibco.Brl Life Technologies®), segundo as instruções do fabricante (anexo 5.2.3). Os clones de interesse foram identificados através de reações de amplificação utilizando *primers* específicos para o plasmídeo. A reação final com volume total de 50 µl (50 pmol de cada primer – T7 Fw 5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG – 3' e U19 Rv 5'- AGG GTT TTC CCA GTC ACG A – 3', tampão de reação 1x (KCl 50 mM; MgCl₂ 1,5mM; Tris-HCl 10 mM), 2 mM de cada dNTP e 0,5 U de *Taq* DNA polimerase (Amersham Biosciences®)).

Amplificação parcial do retrotransposon LINE

Regiões parciais dos retrotransposons foram amplificadas por PCR (*Polimerase Chain Reaction*) usando *primers* para o LINE construídos a partir dos alinhamentos dos clones, *primer* LINEAng Fw 5' - CAGTGTGCATCTGATTGTGT - 3' e *primer* LINEAng Rv 5' - CGCAGACGCTTTTATCCA - 3'.

As reações de PCR foram feitas utilizando 80 ng de DNA molde em volume final de 50 µl. Cada reação foi composta de tampão 1x (100 mM Tris-HCl pH 8.6, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 300 µM de dNTP, 1 µM de cada *primer* (100 pMol) e 1 U de FidelityTaq DNA polimerase (USB®). As sequências de LINE foram submetidas à PCR em 30 ciclos de amplificação no termociclador BJI® (2 min a 95 °C, 30 s a 94 °C, 45 s a 52 °C, 12 min a 68 °C e 5min a 68 °C).

A purificação dos fragmentos de DNA de interesse do gel de agarose foi realizada utilizando o kit *High Pure PCR Cleanup Micro Kit* (GE Healthcare Amersham Biosciences®), seguindo as especificações do fabricante (anexo 5.2.4).

Sequenciamento

O sequenciamento nucleotídico dos clones de interesse e dos fragmentos de DNA foi realizado utilizando o kit DYEnamic™ ET Terminator Cycle Sequencing (Amersham Biosciences®), segundo as instruções do fabricante (anexo 5.2.5).

Análise das sequências nucleotídicas

Para identificação de possíveis homologias de genes, as sequências nucleotídicas foram submetidas a buscas *online* através do *Genetic Information Research Institute* “Repbase”, “website” (<http://www.girinst.org/>). As sequências foram editadas e alinhadas *online* através do *Multiple sequence alignment* (CORPET, 1988), “website” (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>).

Marcação de sondas cromossômicas

As sondas As51, DNAr 18S e DNAr 5S foram marcadas pela técnica de *nick translation*, utilizando biotina 14 - dATP (Bionick Labeling System - Invitrogen) ou por PCR utilizando concentrações adequadas de dNTPs e um dNTP acoplado a uma molécula repórter (biotina 14 dATP, Invitrogen®). Os produtos de PCR do LINE e do DNAr 18S foram marcados utilizando a digoxigenina 16 – dUTP (Dignick mix - Roche®) em banho tipo bloco seco Loccus Biotecnologia® (1h e 30 min a 65°C e 15 min a 15°C).

Para a obtenção da sonda de DNAr 18S foram utilizados os *primers* 18S Fw 5’ – CCG CTT TGG TGA CTC TTG AT -3’ e 18S Rv 5’- CCG AGG ACC TCA CTA AAC CA -3’ isolados de *Ictalurus punctatus* segundo Gross et al. (2010) utilizando o DNA nuclear das espécies em estudo. Para sondas de DNAr 5S foram utilizados os *primers* isolados da truta arco-íris (Fw 5’ – TACGCCCGATCTCGTCCGATC – 3’ e Rv 5’ – CAGGCTGGTATGGCCGTAAGC – 3’) de acordo com Martins e Galetti Jr., 1999).

A sonda do DNA satélite As51, descrito por Mestriner et al. (1999), foi obtida do DNA nuclear de *Astyanax scabripinnis* utilizando os *primers* As51 Fw 5’ - GGTCAAAAAGTCGAAAAA – 3’ e As51 Rv 5’ - GTACCAATGGTAGACCAA - 3’ durante 35 ciclos de amplificação no termociclador BJI® (1 min a 95 °C, 45 s a 56 °C, 1 min a 72 °C e 5 min a 72 °C).

Hibridação Fluorescente in situ (FISH e fiber-FISH)

A FISH foi realizada pela utilização do protocolo descrito por Pinkel et al. (1986) com modificações, enquanto que a *fiber-FISH* foi realizada de acordo com o protocolo adaptado para peixes por Barros et al. (2011) em condições de alta stringência (2.5 ng/ml sonda, 50% formamida deionizada, 10% sulfato dextrano, 2xSSC a 37 °C *overnight*). Depois da hibridação, as lâminas foram lavadas em 15%

formamida/0.2xSSC a 42 °C por 20 min e 4xSSC/0.05% Tween a temperatura ambiente por 10 min. A detecção do sinal foi realizado através do uso de streptavidina-alexa fluor 488 (Molecular Probes®) para As51, 18S e 5S, enquanto que a anti-digoxigenina-rhodamina (Roche®) foi usada para detecção das sondas do LINE. Os cromossomos foram então contra-corados com DAPI (0,2 µg/ml) diluído em uma solução “antifade” (Fluka®). Os cromossomos foram analisados sobre um microscópio de epifluorescência (Olympus® BX41) acoplados a um sistema de captura de imagem (Olympus® DP71).

4 RESULTADOS

Os resultados estão organizados na forma de capítulo correspondente ao artigo científico.

Capítulo I

Elementos genômicos repetitivos no complexo *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae)

Capítulo I

Elementos genômicos repetitivos no complexo *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae)

RESUMO

A maior parte do genoma dos eucariotos é constituída por DNA repetitivo ou DNA de múltiplas cópias, o qual já foi considerado “lixo”, podendo estar associado à heterocromatina. Neste estudo foram analisadas três populações de *Astyanax scabripinnis* provenientes de rios e córregos de Guaratinguetá e Pindamonhangaba (SP, Brasil) e uma população da cidade de Maringá (PR, Brasil) quanto a localização das regiões organizadoras de nucléolo (RONs), DNA satélite As51, DNA ribossomal (DNAr) 18S e DNAr 5S. Ainda, foram isoladas e mapeadas sequências repetitivas por meio da técnica de *C_{ot}-1*, que mostrou homologia com UnaL2, retrotransposon do tipo LINE. A hibridação *in situ* fluorescente (FISH), com sonda construída para o retrotransposon isolado, evidenciou marcações dispersas e mais concentradas em regiões centroméricas e teloméricas dos cromossomos, co-localizadas e interespaçadas com DNAr 18S e As51, comprovada pela técnica de *fiber*-FISH. O cromossomo B das populações mostrou marcações bastante conspícuas com a sonda LINE, também co-localizada com sequências As51. As RONs apresentaram-se ativas em sítios únicos de um par homólogo nas três populações, não havendo indícios de que elementos transponíveis e DNA repetitivo tenham influência na sua regulação ao nível das análises realizadas.

Palavras-chave: DNAr, retrotransposon, DNA satélite, FISH, cromossomo B.

ABSTRACT

The most part of the eukaryote genomes is constituted for repetitive DNA or multiple copies DNA, which has already been considered as “junk”, may be associated to the heterochromatin. In this study three *Astyanax scabripinnis* populations from Guaratinguetá (SP, Brazil) rivers and stream and one population from Maringá (PR, Brazil) were analyzed about the nucleolar organizing region (NORs), As51 satellite DNA, 18S and 5S rDNA location. Moreover, repetitive sequences were isolated and mapped through *Cot-1* technique, which showed homology with UnaL2, a LINE type retrotransposon. The fluorescent *in situ* hybridization (FISH), with the isolated built retrotransposon probe, evidenced disperse labeled and stronger in centromeric and telomeric chromosomes regions, co-located and interspersed with the 18S DNA and As51, proven by the *fiber*-FISH technique. The B chromosome of those populations showed very conspicuous labeled with the LINE probe, also co-located with the As51 sequences. The NORs were active in a single site of a homologue pair in all three populations, with no evidence that the transposable elements and repetitive DNA have influence in its regulation at the performed analyzes level.

Key-words: rDNA, retrotransposon, satellite DNA, FISH, chromosome B.

Introdução

Astyanax é uma grande unidade taxonômica entre os peixes, com mais de 100 espécies descritas (MIRANDE, 2010). Encontra-se amplamente distribuída pela região Neotropical e atualmente é reconhecida como gênero *incertae sedis*, devido à falta de dados que comprovem seu monofiletismo (LIMA et al., 2003).

Além da variabilidade na fórmula cariotípica e na morfologia externa, algumas populações de *A. scabripinnis* apresentam cromossomos B (revisado em MOREIRA-FILHO; GALETTI JR.; BERTOLLO, 2004), os quais são descritos como elementos supranumerários ou acessórios (CAMACHO; SHARBEL; BEUKEBOOM, 2000). Esses cromossomos são considerados dispensáveis, pois para que haja um ciclo de vida normal do genoma não precisam estar obrigatoriamente presentes, além disso, podem ter sido originados de cromossomos do complemento A devido às sequências homólogas, mas não se recombina com esses (CAMACHO; PARKER, 1994). O cromossomo B de *A. scabripinnis* é um isocromossomo, total ou parcialmente heterocromático, que acumula pelo menos uma família de DNA repetitivo identificado como As51 (MESTRINER et al., 1999; VICARI et al., 2011).

DNA repetitivo, também chamado de DNA de múltiplas cópias, e sequências multigênicas codificantes de RNA ribossomal (RNAr) são abundantes no genoma dos eucariotos. Os DNAs ribossomais (DNAr) estão organizadas em duas famílias: a 5S (DNAr menor) que transcreve para RNAr 5S e a 45S (DNAr maior) que codifica os RNAr 28S, 5,8S e 18S. Essa última pode ser identificada pela coloração com prata quando ativa e correspondem as regiões organizadoras de nucléolo (RONs), por outro lado, o DNAr 5S só pode ser localizado nos cromossomos pela hibridação *in situ* com sonda específica (MARTINS, 2007).

Sequências de DNA repetitivo podem ser distribuídas em dois grupos: em *tandem* ou dispersas (SUMNER, 2003; CIOFFI; BERTOLLO, 2012). Quando em *tandem*, a unidade de repetição está disposta uma ao lado da outra, como é o caso dos DNAs satélites, microssatélites e minissatélites, dependendo do grau de repetição. Já as repetições dispersas são os elementos móveis: retrotransposons ou transposons (JURKA et al., 2005).

O comportamento de replicação dos elementos transponíveis assim como outras sequências de DNA repetitivas já foram considerados como DNA egoísta (*selfish* DNA) ou parasitas genômicos devido a sua capacidade de acumulação no

genoma. A classe I (retrotransposons) é dividida em retroelementos LTR (*Long terminal repeats*) que inclui, por exemplo, os grupos *Ty1-copia*, *BEL*, *DIRS* e *Ty-3 gypsy*; e os retroelementos não-LTR, onde estão incluídos os LINEs (*long interspersed nuclear elements*) e os SINEs (*short interspersed nuclear elements*) (KIDWELL, 2002). Os elementos transponíveis possuem o chamado “ciclo de vida”, o qual se inicia com uma pequena fase de invasão, onde ocorre a amplificação do número de cópias; acompanhado por mutação, tornando alguns elementos inativos e por último a eliminação e perda de algumas cópias (KIDWELL; LISH, 2001).

A espécie *Astyanax scabripinnis* é consolidado como um interessante modelo para estudos genéticos e evolutivos. Esse pequeno peixe é típico de cabeceiras de rios onde formam populações isoladas (AGOSTINHO; JÚLIO JR., 1999), o que oportuniza uma alta diversidade genética (MOREIRA-FILHO; GALETTI JR.; BERTOLLO, 2004).

Sabendo da existência da grande quantidade de DNA repetitivo no genoma e da extrema importância desses elementos para a evolução cariotípica, estrutura de cromossomos, regulação gênica, entre outras funções, o presente trabalho teve como objetivo a identificação e caracterização do DNA satélite As51, DNAr maior e do retrotransposon não-LTR LINE no genoma de *Astyanax scabripinnis* portadores de cromossomos B.

Material e métodos

Amostras

Os exemplares de *Astyanax scabripinnis* empregados no estudo pertencem: a) ao Córrego da Fazenda Lavrinha, bacia do rio Paraíba do Sul (S 22° 40' 49,5" e WO 45° 23', 1900 m de altitude), na cidade de Guaratinguetá, São Paulo, Brasil; b) ao Ribeirão Grande, bacia do rio Paraíba do Sul (S 22° 43' 378" e WO 45° 27' 128", 1850 m de altitude), na cidade de Pindamonhangaba, São Paulo, Brasil; c) ao Córrego Tatupeba, bacia do rio Ivaí (S 23° 29' 592" e WO 52° 01' 041", 400 m de altitude), na cidade de Maringá, Paraná, Brasil. Os exemplares foram identificados pelo Dr. Oscar A. Shibatta e receberam número de depósito no Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina (MZUEL nº 5654, 5657).

Preparações cromossômicas, Ag-RONs e obtenção de DNA

A técnica utilizada para obtenção de cromossomos mitóticos foi a descrita por Bertollo, Takahashi e Moreira-Filho (1978). As regiões organizadoras de nucléolo (RONs) foram localizadas segundo o método de Howell e Black (1980). A extração de DNA genômico foi realizada através do método CTAB (MURRAY; THOMPSON, 1980) com modificações.

Obtenção do DNA repetitivo e clonagem

O DNA genômico total das espécies de *A. scabripinnis* foi utilizado no procedimento do DNA C_{ot}-1 (ZWICK et al., 1997) adaptado para obtenção de DNA repetitivo em peixes (FERREIRA; MARTINS, 2008; VICARI et al., 2010). O produto DNA C_{ot}-1 foi ligado ao plasmídeo pMOS (Promega®) para posterior transformação de células competentes de *Escherichia coli* DH5α (Gibco.Brl Life Technologies®), segundo as instruções do fabricante. Os clones de interesse foram identificados através de reações de amplificação utilizando *primers* específicos para o plasmídeo. A reação final com volume total de 50 µl (50 pmol de cada primer – T7 Fw 5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG – 3' e U19 Rv 5'- AGG GTT TTC CCA GTC ACG A – 3', tampão de reação 1x (KCl 50 mM; MgCl₂ 1,5mM; Tris-HCl 10 mM), 2 mM de cada dNTP e 0,5 U de *Taq* DNA polimerase (Amersham Biosciences®)).

Amplificação parcial do retrotransposon LINE

Regiões parciais dos retrotransposons foram amplificadas por PCR (*Polimerase Chain Reaction*) usando *primers* para o LINE construídos a partir dos alinhamentos dos clones, *primer* LINEAng Fw 5' - CAGTGTGCATCTGATTGTGT - 3' e *primer* LINEAng Rv 5' - CGCAGACGCTTTTATCCA - 3'.

As reações de PCR foram feitas utilizando 80 ng de DNA molde em volume final de 50 µl. Cada reação foi composta de tampão 1x (100 mM Tris-HCl pH 8.6, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 300 µM de dNTP, 1 µM de cada *primer* (100 pMol) e 1 U de *FideliTaq* DNA polimerase (USB®). As sequências de LINE foram submetidas à PCR em 30 ciclos de amplificação no termociclador BJI® (2 min a 95 °C, 30 s a 94 °C, 45 s a 52 °C, 12 min a 68 °C e 5min a 68 °C).

A purificação dos fragmentos de DNA de interesse do gel de agarose foi realizada utilizando o kit *High Pure PCR Cleanup Micro Kit* (GE Healthcare Amersham Biosciences®), seguindo as especificações do fabricante.

Sequenciamento

O sequenciamento nucleotídico dos clones de interesse e dos fragmentos de DNA foi realizado utilizando o kit DYEnamic™ ET Terminator Cycle Sequencing (Amersham Biosciences®), segundo as instruções do fabricante.

Análise das sequências nucleotídicas

Para identificação de possíveis homologias de genes, as sequências nucleotídicas foram submetidas a buscas *online* através do *Genetic Information Research Institute* “Repbase”, “website” (<http://www.girinst.org/>). As sequências foram editadas e alinhadas *online* através do *Multiple sequence alignment* (CORPET, 1988), “website” (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>).

Marcação de sondas cromossômicas

As sondas As51, DNAr 18S e DNAr 5S foram marcadas pela técnica de *nick translation*, utilizando biotina 14 - dATP (Bionick Labeling System - Invitrogen) ou por PCR utilizando concentrações adequadas de dNTPs e um dNTP acoplado a uma molécula repórter (biotina 14 dATP, Invitrogen®). Os produtos da PCR do LINE e do DNAr 18S foram marcados utilizando a digoxigenina 16 – dUTP (Dignick mix - Roche®) em banho tipo bloco seco Loccus Biotecnologia® (1h e 30 min a 65°C e 15 min a 15°C).

Para a obtenção da sonda de DNAr 18S foram utilizados os *primers* 18S Fw 5′ – CCG CTT TGG TGA CTC TTG AT -3′ e 18S Rv 5′- CCG AGG ACC TCA CTA AAC CA -3′ isolados de *Ictalurus punctatus* segundo Gross et al. (2010) utilizando o DNA nuclear das espécies em estudo. Para sondas de DNAr 5S foram utilizados os *primers* isolados da truta arco-íris (Fw 5′ – TACGCCCGATCTCGTCCGATC – 3′ e Rv 5′ – CAGGCTGGTATGGCCGTAAGC – 3′) de acordo com Martins e Galetti Jr., 1999).

A sonda do DNA satélite As51, descrito por Mestriner et al. (1999), foi obtida do DNA nuclear de *Astyanax scabripinnis* utilizando os *primers* As51 Fw 5′ - GGTCAAAAAGTCGAAAAA – 3′ e As51 Rv 5′ - GTACCAATGGTAGACCAA - 3′ durante 35 ciclos de amplificação no termociclador BJI® (1 min a 95 °C, 45 s a 56 °C, 1 min a 72 °C e 5 min a 72 °C).

Hibridação Fluorescente in situ (FISH e fiber-FISH)

A FISH foi realizada pela utilização do protocolo descrito por Pinkel et al. (1986) com modificações, enquanto que a *fiber-FISH* foi realizada de acordo com o protocolo adaptado para peixes por Barros et al. (2011) em condições de alta estringência (2.5 ng/ml sonda, 50% formamida deionizada, 10% sulfato dextrano, 2xSSC a 37 °C *overnight*). Depois da hibridação, as lâminas foram lavadas em 15% formamida/0.2xSSC a 42 °C por 20 min e 4xSSC/0.05% Tween a temperatura ambiente por 10 min. A detecção do sinal foi realizado através do uso de streptavidina-alexa fluor 488 (Molecular Probes®) para As51, 18S e 5S, enquanto que a anti-digoxigenina-rhodamina (Roche®) foi usada para detecção das sondas do LINE. Os cromossomos foram então contra-corados com DAPI (0,2 µg/ml) diluído em uma solução “antifade” (Fluka®). Os cromossomos foram analisados sobre um microscópio de epifluorescência (Olympus® BX41) acoplados a um sistema de captura de imagem (Olympus® DP71).

Resultados

Três populações alopátricas de *Astyanax scabripinnis* foram analisadas e os resultados obtidos separados de acordo com as localidades em que os espécimes foram capturados.

Córrego da Fazenda Lavrinha

O número diploide apresentou 50 cromossomos com a fórmula cariotípica: 6 metacêntricos (m) + 22 submetacêntricos (sm) + 10 subtelocêntricos (st) + 12 acrocêntricos (a), confirmando dados obtidos para a espécie nesta população (NÉO; BERTOLLO; MOREIRA-FILHO, 2000). Entre os indivíduos analisados (n = 39), 8 fêmeas e 2 machos apresentaram número diploide igual a 51 cromossomos, apresentando um macrocromossomo B metacêntrico. O DNA satélite As51 foi evidenciado em cromossomos submetacêntricos e acrocêntricos, variando de 10-12 sítios em braços longos ou curtos, nos pares cromossômicos submetacêntricos 4, 6 e 10 e acrocêntrico 22, co-localizados com o DNAr 18S. Marcações individuais de As51 foram detectadas na região centromérica dos pares acrocêntricos 23 e 25 (Figura 1a). O cromossomo B possui marcação mais evidente de DNA satélite As51

em regiões pericentromérica equilocais entre os braços curto e longo, enquanto nas regiões teloméricas foram observadas marcações mais fracas (Figura 5a).

A impregnação pelo íon prata mostrou sítios simples de Ag-RONs localizado no braço curto do submetacêntrico 10 (Figura 1a') coincidindo com os sítios de DNAr 18S e As51 evidenciados pela FISH, além de sítios adicionais de marcações 18S localizadas no braço curto do cromossomo 6 e em regiões teloméricas no braço longo dos cromossomos 4 e 22 (Figura 1a). O DNAr 5S foi localizado nos cromossomos submetacêntricos 5 e 6, em região terminal e proximal, respectivamente (Figura 5b).

As sequências parciais do retrotransposon LINE em *A. scabripinnis* foram obtidas a partir de exemplares dessa população. As sequências nucleotídicas de tais clones obtidos pelo C₀t-1 foram submetidas a buscas *online* através do *Genetic Information Research Institute "Rebase"* apresentando homologia com o retrotransposon UnaL2 pertencente a superfamília LINE da espécie *Anguilla japonica*, posteriormente foram alinhadas com a sequência completa do retrotransposon por meio do *Multiple sequence alignment*. Dois dos clones foram analisados, enquanto o clone 16 teve homologia com o começo da sequência completa do retrotransposon UnaL2 (Figura 2b), o clone 13 teve homologia com o final da sequência completa (Figura 2a).

A reação de PCR realizada utilizando-se os *primers* construídos a partir do alinhamento dos clones gerou um produto que apresentou um padrão de múltiplas bandas, quando analisado em gel de eletroforese (Figura 3). Esse produto gerou bandas de 300 pares de base (pb), 400 pb, 500 pb e 700 pb, o qual foi utilizado como sonda para localização *in situ* e apresentou marcações dispersas nos cromossomos do complemento A e também no cromossomo B, com relativa predominância nas regiões terminais e centroméricas (Figura 4a). A *double FISH* utilizando sondas de DNA repetitivo mostrou a ocorrência de sobreposição do LINE/As51 (Figura 5a), LINE/DNAr 5S (Figura 5b) e LINE/18S (Figura 5c). O cromossomo B também apresentou sobreposição em relação às sondas LINE/As51.

As fibras cromatínicas estendidas submetidas à técnica da *fiber-FISH* utilizando sondas do LINE e do DNA satélite As51 mostrou padrão de marcações independentes e com localização interespaçada (Figura 6).

Ribeirão Grande

Os cariótipos de *A. scabripinnis* analisados da população de Ribeirão Grande apresentou $2n = 50$ cromossomos, com a mesma fórmula cariotípica descrita na população anterior, organizados em $6m + 22sm + 10st + 12a$, confirmando os dados obtidos para a espécie nessa localidade (FERRO et al., 2001). A população teve 63 exemplares analisados, onde 14 indivíduos apresentaram número diploide igual a 51, sendo 12 fêmeas e 2 machos portando um cromossomo B metacêntrico. O DNA satélite As51 mostrou marcações terminais, nos braços longos e curtos, do par subtelocêntrico 16, e dos pares acrocêntricos 20 e 21 (Figura 1b).

A impregnação pelo íon prata mostrou sítios simples de Ag-RONs localizado no braço curto do par subtelocêntrico 16 (Figura 1b') coincidindo com os sítios de DNAr 18S e As51 evidenciados pela FISH.

A localização *in situ* com sonda do retrotransposon LINE apresentou marcações dispersas nos cromossomos do complemento A e também no cromossomo B, com relativa predominância nas regiões terminais e centroméricas (Figura 4b).

Córrego Tatupeba

A população de *A. scabripinnis* proveniente de Maringá apresentou número diploide de 50 cromossomos com fórmula cariotípica $6m + 22sm + 6st + 16a$, corroborando dados obtidos por Fernandes e Martins-Santos (2005) para a espécie nessa localidade. Do total dos indivíduos analisados ($n = 32$), 4 machos e 3 fêmeas apresentaram um cromossomo B metacêntrico. O DNA satélite As51 foi localizado em regiões terminais, no braço curto do par 15 subtelocêntrico e, no braço longo do par 18 acrocêntrico (Figura 1c).

A impregnação pelo íon prata mostrou sítios simples de Ag-RONs localizado no braço curto do par subtelocêntrico 15 (Figura 1c'), confirmado pela FISH com sonda 18S e co-localizado com o As51.

A localização *in situ* com sonda do retrotransposon LINE apresentou marcações dispersas nos cromossomos do complemento A com predominância em regiões terminais e centroméricas (Figura 4c).

Nenhuma das populações estudadas de *Astyanax scabripinnis* apresentou heteromorfismo sexual cromossômico detectável ao nível das análises empregadas.

Discussão

O presente trabalho evidenciou $2n = 50$ cromossomos nas três populações de *Astyanax scabripinnis* estudadas, com a presença de um macrocromossomo supranumerário polimórfico nessas populações. Os achados corroboram com a maioria dos dados da literatura para este complexo de espécies (MOREIRA-FILHO; BERTOLLO, 1991; BERTOLLO; MOREIRA-FILHO, 2000; MAISTRO; OLIVEIRA; FORESTI, 2000; MANTOVANI et al., 2000; FERRO et al., 2001; MOREIRA-FILHO et al., 2001; MOREIRA-FILHO; BERTOLLO, 2003; VICARI et al., 2008a; NÉO; SANTOS et al., 2012). Ainda foi possível constatar diferenças entre as fórmulas cariotípicas das diferentes populações sugerindo que a condição de alopatria dos isolados populacionais facilita a fixação de rearranjos cromossômicos no complexo *A. scabripinnis* (MOREIRA-FILHO et al., 2004) seguindo trajetórias independentes na diferenciação cromossômica (MOREIRA-FILHO; BERTOLLO, 1991).

Em *A. scabripinnis* é comum a ocorrência de múltiplos sítios de RONS, como descrito por Ferro et al. (2001), onde populações pertencentes a região de Campos do Jordão (SP) apresentaram o par submetacêntrico número 10 como o principal organizador nucleolar carregando a RON no braço curto. A situação verificada no presente estudo é bastante diversa. Enquanto a coloração com prata evidencia um único par cromossômico com RONS ativas em todas as populações, a FISH permitiu localizar sítios múltiplos de DNAr 18S, incluindo aquele das RONS ativas, em duas das populações (Córrego Lavrinha e Córrego Tatupeba). Esta situação, que é polimórfica nessas populações, sugere que alguns sítios de DNAr 18S não estejam ativos, ao menos nas condições de análise do presente estudo. Somente a população do Ribeirão Grande possui um único par cromossômico com genes ribossomais 18S, devendo ser esta uma condição plesiomórfica a ser considerada sobre origem e dispersão do DNAr 18S em *A. scabripinnis*. Variações e polimorfismos relacionados às RONS são comuns em peixes. Gross et al. (2010) estudando três espécies de peixes ciclídeos do gênero *Symphysodon* demonstrou variação intraespecífica e interespecífica quanto a localização dos sítios de rDNA 18S, onde a impregnação por prata revelou sistemas múltiplos de RONS. Essa variação é explicada e pode estar associada à atividade de *cístrons* ribossomais, segundo os autores.

O retrotransposon LINE com sequências de DNA classificadas como altamente ou moderadamente repetitivos foram descobertas com base na cinética

de reassociação DNA C_{ot} -1. Grandes quantidades de DNA repetitivo no genoma dos eucariotos são devido ao acúmulo de elementos transponíveis, que podem participar da regulação epigenética, tendo impacto na estabilidade e evolução genômica (JURKA et al., 2007). É documentado que elementos transponíveis são responsáveis por variações genéticas e por provocar rearranjos cromossômicos (duplicações gênicas, deleções, inversões e translocações). A manutenção da cópia não alterada do gene reduz os efeitos deletérios das mudanças causadas pelos elementos transponíveis, permitindo a evolução e fixação destes elementos no genoma dos organismos (MILLER, MCDONALD; PINSKER, 1997). É bem provável que essa seja uma condição vantajosa às espécies do complexo *A. scabripinnis*, que são tipicamente isoladas em demes populacionais e deveria sofrer com a erosão genética e perda de variabilidade, o que não foi observado até o momento.

O DNA repetitivo LINE, aqui descrito pela primeira vez em *A. scabripinnis*, possui distribuição dispersa pelos cromossomos do complemento A e bastante conspícua no cromossomo B, enquanto a sequência As51 possui um padrão de localização variável entre as populações, embora sensivelmente mais concentrada em alguns cromossomos do que o LINE. Contudo, esses DNAs repetitivos estão intimamente associados no cromossomo B, e essa deve ser uma característica anterior a sua origem pela formação de um isocromossomo a partir de um elemento do complemento padrão (MESTRINER et al., 1999; VICARI et al., 2011). Uma correspondência bastante interessante também ocorre em relação à co-localização de alguns *cístrons* de DNAr interespaçados com sequências As51, como anteriormente descrito para *Astyanax janeiroensis* (VICARI et al., 2008b; BARROS et al., 2011), e também interespaçados ao LINE agora também descrito em *A. scabripinnis* do Córrego da Fazenda Lavrinha.

A co-localização do DNA satélite As51 com os sítios de DNAr maior, evidenciado por Vicari et al. (2008b) em *A. janeiroensis* foi proposta como uma invasão do As51 em alguns *clusters* do DNAr 18S, sendo responsável pelo silenciamento gênico destes *cístrons* invadidos. No presente caso, não houve evidências diretas de silenciamento do DNAr maior quando co-localizado com o As51, visto que ao menos um par cromossômico de cada população analisada se manteve com RONS ativas marcadas pela prata, mesmo sendo estas sintênicas e co-localizadas ao As51.

De acordo com Zhang, Eickbush, M. e Eickbush, T. (2008) regiões de DNAr são considerados nichos ideais para sobrevivência e manutenção de elementos transponíveis, com envolvimento na regulação desses genes. A maioria dos elementos transponíveis atingem regiões de heterocromatina (DIMITRI; JUKANOVIC; ARCA, 2003). Regiões como essa, assim como centrômeros e telômeros são lugares que possuem baixo número de genes e recombinação baixa e/ou suprimida (REBUZZINI et al., 2009) sofrendo poucas mudanças, assim existem poucas chances de que os elementos repetitivos que se instalem nessas regiões sejam eliminados pela recombinação (SZAUTER, 1984). Pieczarka e Mattevi (1998) afirmam que LINEs e SINEs estão distribuídos pela eucromatina. No presente trabalho as marcações do LINE foi observada inclusive em regiões eucromáticas, além de sua predominância em regiões de heterocromatina e teloméricas. Condição evidenciada também em outros trabalhos onde ocorre a presença de elementos móveis em regiões de eucromatina. Isso sugere que a eucromatina tolera a presença desses elementos, como no gafanhoto *Eyprepocnemis plorans*, tal condição é considerada ancestral para a espécie (MONTIEL et al., 2012).

Nos trabalhos de Abel, Mantovani e Moreira-Filho (2006) e Kantek et al. (2009), diferentes espécies de *Astyanax* evidenciaram o DNA satélite As51 em regiões heterocromáticas localizadas intersticialmente e em blocos terminais de cromossomos subtelocêntricos e acrocêntricos, também apresentando marcações em cromossomos B. No presente estudo, a sequência do DNA satélite As51 foi localizada em regiões terminais de cromossomos submetacêntricos e acrocêntricos, além de marcações em cromossomos submetacêntricos de *A. scabripinnis* do Córrego da Fazenda Lavrinha. Com isso, amplia-se o quadro de dispersão cariotípica dessa sequência em espécies do complexo *A. scabripinnis* também para cromossomos de dois braços, reforçando a hipótese de que este DNA repetitivo, que tem homologia com o retrotransposon RT2 de *Anopheles gambiae* (MESTRINER et al., 1999) tenha, provavelmente, envolvimento na diversificação cariotípica em *Astyanax*.

Em síntese, a condição mais intrigante encontrada no presente estudo foi a íntima co-localização de diferentes classes de DNAs repetitivos, expressos (unidades repetitivas ribossomais) e não codificantes. E que embora sugiram diferentes situações relacionadas à evolução do genoma e do cariótipo, ainda deixam em aberto muitas questões sobre aspectos funcionais.

Figura 1 – Cariótipos de *Astyanax scabripinnis* com metáfases submetidas à FISH com sondas de DNAr 18S (vermelho) e de DNA satélite As51 (verde) com as respectivas RONS das populações; a) Córrego da Fazenda Lavrinha; b) Ribeirão Grande e c) Córrego Tatupeba. Barra: 10 μ m.

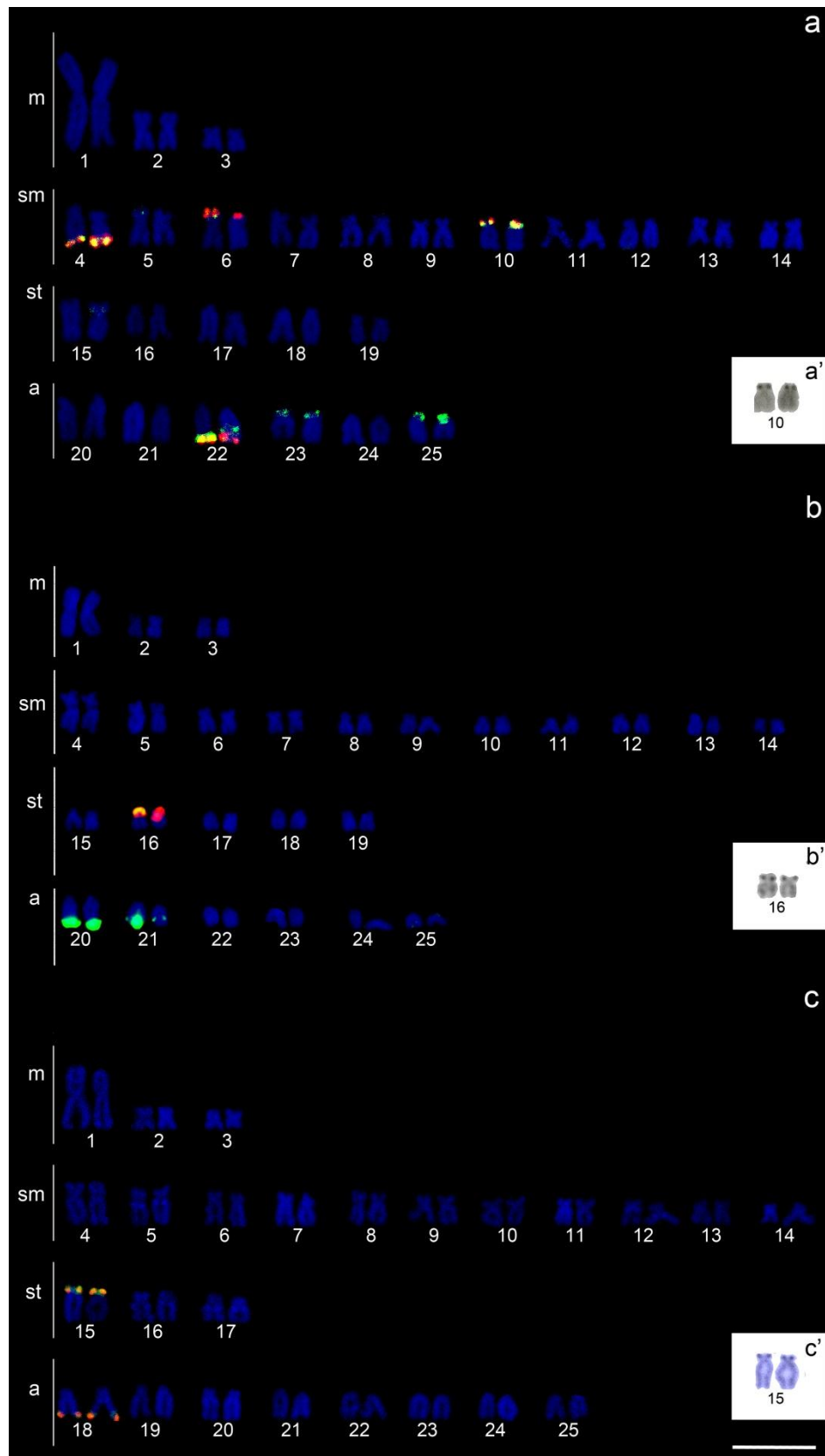


Figura 2 – Alinhamento das sequências dos clones do produto do C₀t-1 com a sequência UnaL2 da *Anguilla japonica*; a) clone 13 e b) clone 16. As bases em vermelho são idênticas.

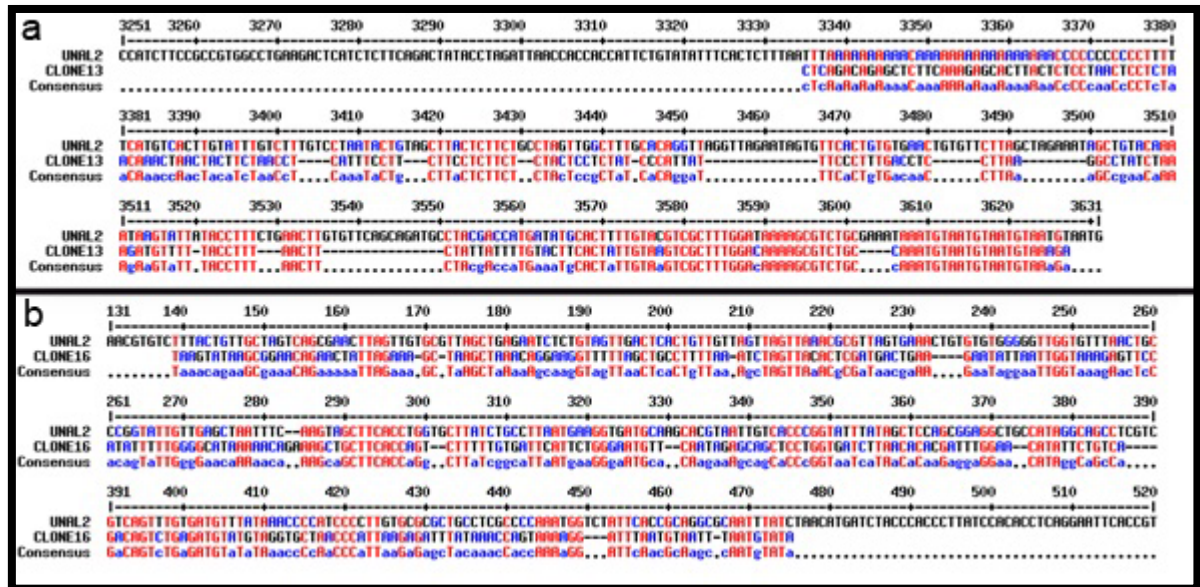


Figura 3 – Gel de agarose 1%. Resultado da PCR utilizando os *primers* de LINE construídos a partir do alinhamento das sequências.

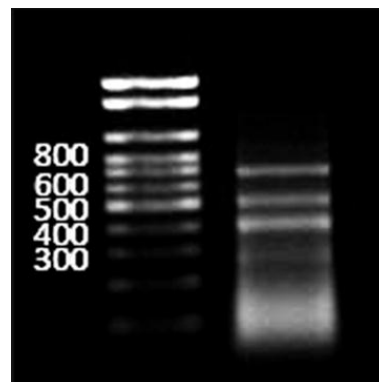


Figura 4 – Hibridação *in situ* fluorescente com a sonda do LINE (vermelho) em metáfases de *A. scabripinnis* das respectivas populações; a) Córrego da Fazenda Lavrinha; b) Ribeirão Grande e c) Maringá. Barra: 10 μ m.

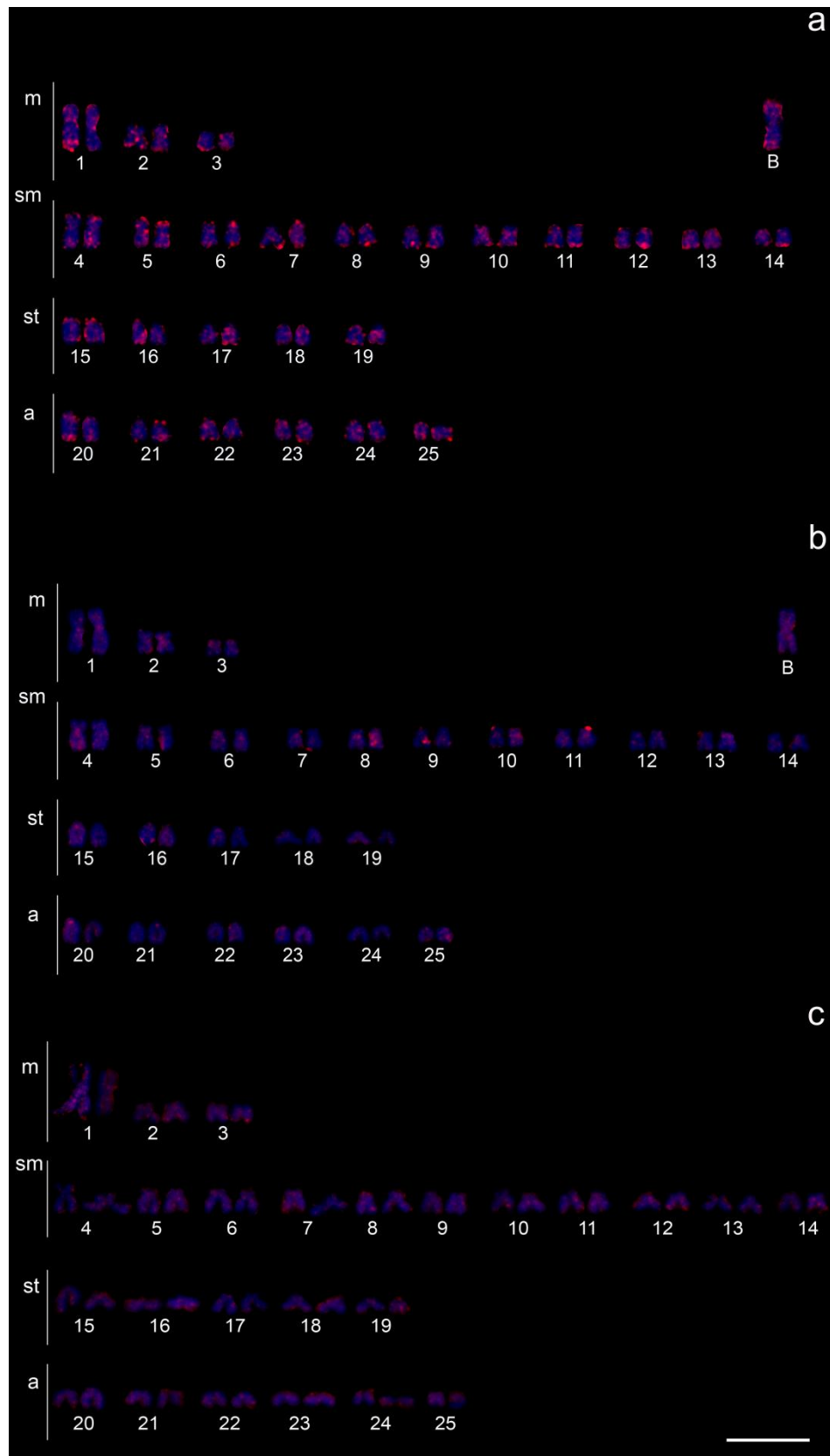


Figura 5 – *Double FISH* realizada com sondas de DNA repetitivo em fêmeas portadoras de cromossomos B; a) LINE (vermelho) + DNA satélite As51 (verde); b) LINE (vermelho) + DNAr 5S (verde) e c) LINE (vermelho) + DNAr 18S (verde). Barra: 10 μ m.

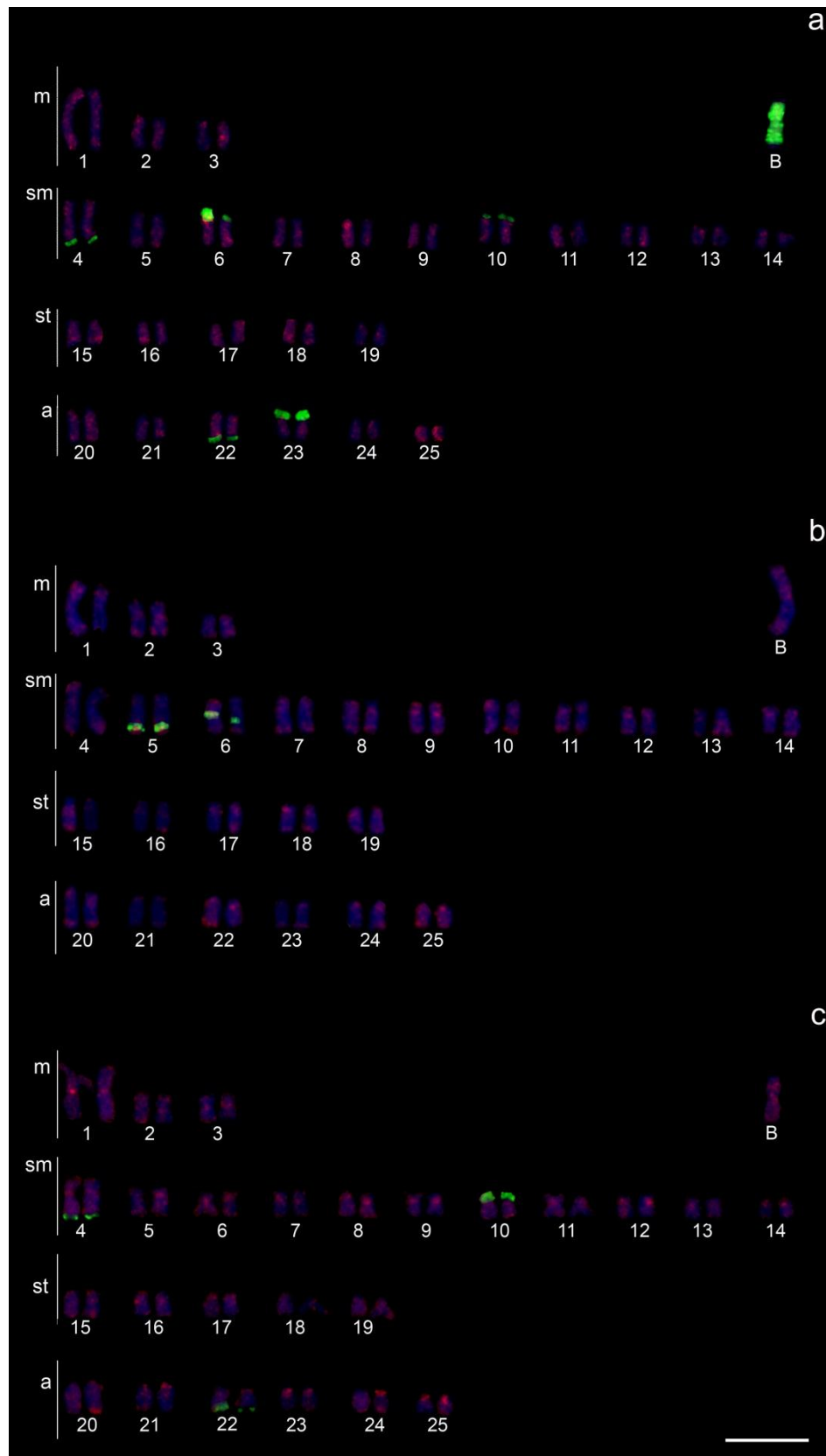
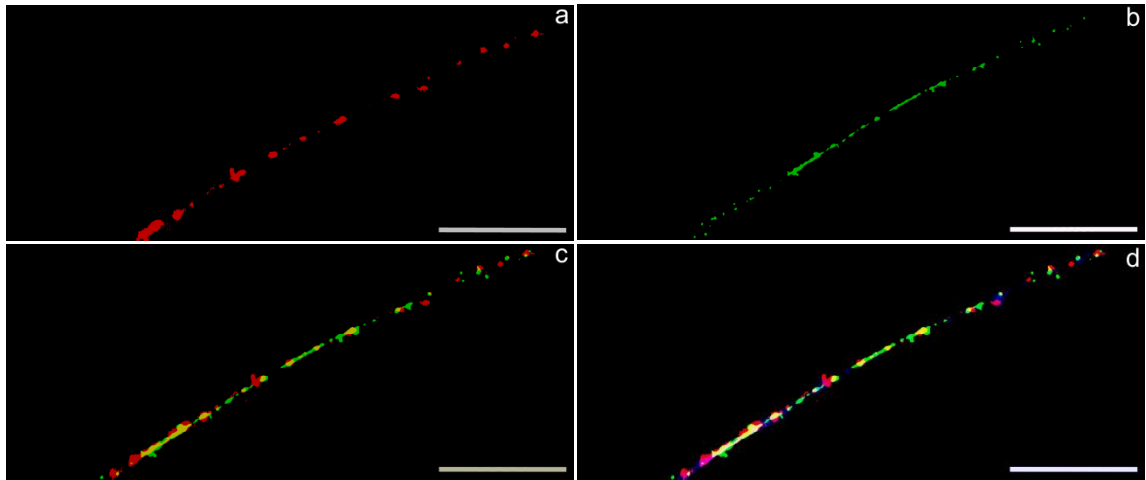


Figura 6 – *Double fiber*- FISH em fibras cromatínicas estendidas de *A. scabripinnis* utilizando sondas de LINE (vermelho) e DNA satélite As51 (verde); a) LINE; b) As51; c) LINE + As51 e d) LINE + As51 + DAPI. Barra: 10 μ m.



Conclusões

- No presente trabalho as três populações analisadas de *Astyanax scabripinnis* - provenientes da bacia do rio Paraíba do Sul – SP (Ribeirão Grande e Córrego da Fazenda Lavrinha) e da bacia do rio Ivaí – PR (Córrego Tatupeba) – apresentaram número diploide de 50 cromossomos com alguns indivíduos carregando um cromossomo B metacêntrico;
- A coloração com prata evidenciou um único par cromossômico com RONS ativas em todas as populações, enquanto a FISH permitiu localizar sítios múltiplos de DNAr 18S, incluindo aquele das RONS ativas nas populações do Córrego Lavrinha e do Córrego Tatupeba. Somente a população do Ribeirão Grande possui um único par cromossômico com genes ribossomais 18S, devendo ser esta uma condição plesiomórfica a ser considerada a origem que permitiu a dispersão do DNAr 18S em *A. scabripinnis*;
- O mapeamento do DNA satélite As51 com a detecção das RONS não apresentou evidências diretas de efeito de silenciamento do DNAr maior, mesmo sendo estas sintênicas e co-localizadas ao As51;
- Na população do Córrego da Fazenda Lavrinha, o DNAr 5S foi localizado nos cromossomos submetacêntricos 5 e 6, em região terminal e proximal, respectivamente;
- O isolamento de sequências repetitivas através da técnica do C_0t -1 permitiu isolar e clonar sequências homólogas com o retrotransposon pertencente à superfamília LINE, UnaL2 da *Anguilla japonica*, apresentando marcação em regiões centroméricas e teloméricas dispersa pelos cromossomos A e também no cromossomo B, quando submetidas à FISH. O DNA satélite As51 apresentou um padrão variável de localização mais conspícua em alguns cromossomos, mas intimamente ligada com o cromossomo B. A técnica da *fiber*-FISH mostrou sinais interespaçados entre esses dois DNAs repetitivos.
- Os estudos de localização física e também funcional desses DNAs repetitivos em *A. scabripinnis* auxiliam no esclarecimento da importância desses na evolução do genoma e da diversificação cariotípica em peixes.

REFERÊNCIAS

- ABEL, L. D. S.; MANTOVANI, M.; MOREIRA-FILHO, O. Chromosomal distribution of the As51 satellite DNA in two species complexes of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.29, n.3, p. 448-452, 2006.
- AGOSTINHO, A. A.; JÚLIO JR., H. F. Peixes da bacia do Alto rio Paraná. In: LOWE-MCCONNEL, R. H. **Estudos Ecológicos de comunidades de peixes tropicais**. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, p.377-392, 1999.
- ALVES, A. L.; MARTINS-SANTOS I. C. Cytogenetics studies in two populations of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) with 2n = 48 chromosomes. **Cytologia**, Tokyo, v. 67, p. 117-122, 2002.
- ARTONI, R. F.; VICARI, M. R.; BERTOLLO, L. A. C. Citogenética de peixes neotropicais: métodos, resultados e perspectivas. **Publicatio UEPG**, Ponta Grossa, v.6, n.1, 2000.
- BABA, S.; KAJIKAWA, M.; OKADA, N.; KAWAI, G. Solution structure of an RNA stem-loop derived from the 3' conserved region of eel LINE Unal2. **RNA Society**, Bethesda (Maryland), v. 10, p. 1380-1387, 2010.
- BALDO, M. C. Variabilidade pluviométrica e a dinâmica atmosférica na bacia hidrográfica do rio Ivaí – PR. 2006, 172f. Tese (Doutorado em Geografia) – Universidade Estadual Paulista, Presidente Prudente, 2006.
- BERRA, T. M. **Freshwater Fish Distribution**. London: Academic Press, 2001. 608 p.
- BARROS, A. V.; SCZEPANSKI, T. S.; CABRERO, J.; CAMACHO, J. P. M.; VICARI, M. R.; ARTONI, R. F. Fiber FISH reveals different patterns of high-resolution physical mapping for repetitive DNA in fish. **Aquaculture**, London, v.322-323 ,p.47-50, 2011.
- BERTACO, V. A.; LUCENA, C.. A. S. Two new species of *Astyanax* (Ostariophysi, Characiformes, Characidae) from eastern Brazil, with a synopsis of the *Astyanax scabripinnis* species complex. **Neotropical Ichthyology**, Porto Alegre, v.4, p. 53-60, 2006.
- 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.
- BRITSKI, H. A. Peixes de água doce do Estado de São Paulo: Sistemática. In: BRANCO, S. M. (Org.). **Poluição e Piscicultura**. São Paulo, Brasil: Faculdade de Saúde Pública da USP e Instituto de Pesca. São Paulo, p. 79-108, 1972.
- BRITSKI, H. A.; SATO, Y.; ROSA, A. B. S. **Manual de identificação de peixes da Região de Três Marias: com chaves de identificação para os peixes da Bacia do São Francisco**. 3 ed. Brasília: Codevasf, 1988.

CAMACHO, J. P. M.; PARKER, J. **First B Chromosome Conference**. Miraflores de la Sierra, Madrid, 1994.

CAMACHO, J. P. M. B Chromosomes. IN: GREGORY, T. R. (Ed.) **The Evolution of the Genome**, p. 223–286. Elsevier: San Diego, 2005.

CAMACHO, J. P. M.; SHAW, M. W.; LÓPEZ-LEÓN, M. D.; PARDO, M. C.; CABRERO, J. Population dynamics of a selfish B chromosome neutralized by the standard genome in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. **The American Naturalist**, v.149, p1030–1050, 1997.

CAMACHO, J. P. M.; SHARBEL, T. F.; BEUKEBOOM, L. W. Evolution B-chromosome. **The Royal Society**, London, v.355, p. 163-178, 2000.

CARVALHO, R. A.; MARTINS-SANTOS, I. C.; DIAS, A. L. B chromosomes: an update about their occurrence in freshwater Neotropical fishes (Teleostei). **Journal of Fish Biology**, London, v.72, p.1907-1932, 2008.

CIOFFI, M. B.; BERTOLLO, L. A. C. Chromosomal Distribution and Evolution of Repetitive DNAs in Fish. In: GARRIDO-RAMOS, M. A. **Repetitive DNA. Genome Dyn. Basel**, Karger, v.7, p.197-221, 2012.

CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. **Nucleic Acids Research**, London, v.16 , n.22, p.10881-10890, 1988.

DIMITRI, P.; JUKANOVIC, N.; ARCÀ, B. (2003) Colonization of heterochromatic genes by transposable elements in *Drosophila*. **Molecular biology and evolution**, Chicago, v.20, p.503–512, 2003.

EIGENMANN, C. H. The American Characidae. **Memoirs of the Museum of Comparative Zoology**, Harvard College, 43, p. 227-310, 1927.

FERNANDES, C. A.; MARTINS-SANTOS, I. C. Sympatric occurrence of three cytotypes and four morphological types of B chromosomes of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characiformes) in the River Ivaí Basin, state of Paraná, Brazil. **Genetica**, The Hague, 124, p. 301-306, 2005.

FERNANDEZ-MEDINA, R. D.; RIBEIRO, J. M. C.; CARARETO, C. M. A.; VELASQUE, L.; STRUCHINER, C. J. Losing identity: structural diversity of transposable elements belonging to different classes in the genome of *Anopheles gambiae*. **BMC Genomics**, London, v. 13, p. 272, 2012.

FERREIRA, I. A.; MARTINS, C. Physical chromosome mapping of repetitive DNA sequences in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*: Evidences for a differential distribution of repetitive elements in the sex chromosomes. **Micron**, Oxford, v.39, p. 411-428, 2008.

FERREIRA, D. C.; PORTO-FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Transposable elements as a potential source for understanding fish genome. **Mobile Genetic Elements**, London, v.1, p. 112-117, 2011.

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.

FINK, S. V.; FINK, W. L. Interrelationships of the ostariophysan fishes (Teleostei). **Zoological Journal of the Linnean Society**, London, v.72, n.4, p. 297-353, 1981.

FOWLER, H. W. Os peixes de água doce do Brasil. **Arquivos de Zoologia**, São Paulo, v.6, p. 1-204, 1948.

GARUTII, V.; BRITSKI, H. A. Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei, Characidae) da Bacia do Alto do Rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na Bacia. **Comunicado do museu de ciências tecnológicas PUCRS**, Porto Alegre, Série Zoologia, v.40, p. 217-229, 2000.

GÉRY, J. **Characoids of the World**. New Jersey: TFH Publications, 1977.

GROSS, M. C.; SCHNEIDER, C. H.; VALENTE, G. T.; MARTINS, C.; FELDBERG, E. Variability of 18S rDNA locus among *Symphysodon* fishes: chromosomal rearrangements. **Journal of Fish Biology**, London, n.76, p. 1117-1127, 2010.

HATANAKA, T.; GALETTI JR., P. M. Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). **Genetica**, The Hague, v.122, p.239-244, 2004.

HOWELL, W. M., BLACK, D. A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia**, Basel, v.36, p.1014-1015, 1980.

JURKA, J.; KAPITONOV, V.V.; PAVLICEK, A.; KLONOWSKI, P.; KOHANY, O.; WALICHIEWICZ, J. Repbase update, a database of eukaryotic repetitive elements. **Cytogenetic and Genome Research**, New York, v.110, p.462-467, 2005.

JURKA, J.; KAPITONOV, V. V.; KOHANY, O.; JURKA, M. V. Repetitive sequences in complex genomes: structure and evolution. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, California, v.8, p.241-259, 2007.

KANTEK, D. L. Z.; VICARI, M. R.; PERES, W. A. M.; CESTARI, M. M.; ARTONI, R. F.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. Chromosomal location and distribution of As51 satellite DNA in five species of the genus *Astyanax* (Teleostei, Characidae, *Incertae sedis*). **Journal of Fish Biology**, London, v.75, p.408-421, 2009.

KIDWELL, M. G. Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. **Genetica**, The Hague, v.115, p.49-62, 2002.

KIDWELL, M. G.; LISH, D.R. Perspective: transposable elements, parasitic DNA, and genome evolution. **International Journal of Organic Evolution**, Lancaster, v.55, p. 1- 24, 2001.

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

LIMA, F. C. T.; MALABARBA, L. R.; BUCKUP, P. A.; SILVA, J. F. P.; VARI, R. P.; HAROLD, A.; BENINE, R.; OYAKAWA, O. T.; PAVANELLI, C. S.; MENEZES, N. A.; LUCENA, C. A. S.; MALABARBA, M. C. S. L. LUCENA, Z. M. S.; REIS, R. E.; LANGEANI, F.; CASSATI, L.; BERTACO, V. A.; MOREIRA, C.; LUCINDA, P. H. F. (Eds.) *Genera Incertae Sedis in Characidae*. In: REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS, C. J. Jr. **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Porto Alegre: Edipucrs, p. 106-169, 2003.

LONG, E.O.; DAWID, I.D. Repeated genes in eukaryotes. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v.49, p.727-764, 1980.

MAISTRO, E. L.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Occurrence of macro B chromosomes in *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characiformes, Characidae). **Genetica**, The Hague, v.87, p.101-106, 1992.

MAISTRO, E. L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F.. Sympatric occurrence of two cytotypes of *Astyanax scabripinnis* (Characiformes, Characidae). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.23, n.2, p.365-369, 2000.

MAISTRO, E. L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Cytogenetic characterization of a supernumerary chromosome segment and of B-chromosomes in *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae). **Genetica**, The Hague, v.110, p.177-183, 2001.

MANTOVANI, M.; ABEL, L. D. S.; MESTRINER, C. A.; MOREIRA-FILHO, O. Accentuated polymorphism of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): Tools for understanding karyotypic evolution. **Genetica**, The Hague, v. 109, p.161-168, 2000.

MANTOVANI, M.; ABEL, L. D. S.; MOREIRA-FILHO, O. Conserved 5S and variable 45S rDNA chromosomal localisation revealed by FISH in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Genetica**, The Hague, v. 123, p. 211-216, 2005.

MARENGO, J. A.; ALVES, L. M. Tendências hidrológicas do Rio Paraíba do Sul. **Revista Brasileira de Meteorologia**, São José dos Campos (São Paulo), v.20, n.2, p. 215-226, 2005.

MARTINS, C. Chromosomes and repetitive DNA: a contribution to the knowledge of the fish genome. In: PISANO, E.; OZOUF-COSTAZ, C., FORESTI, F.; KAPPOR, B. G. **Fish Cytogenetics**, New Delhi & New York: Science Publisher, p. 421–453, 2007.

MESTRINER, C. A.; GALETTI JR., P. M.; VALENTINI, S. R.; RUIZ, I. R. G.; ABEL, L. D. S.; MOREIRA-FILHO, O.; CAMACHO, J. P. M. Structural and functional evidence

that a B chromosome in the characid fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome. **Heredity**, Edimburgo, v.85, p. 1-9, 1999.

MILLER, W. J.; MCDONALD, J. F.; PINSKER, W. Molecular domestication of mobile elements. **Genetica**, The Hague, v.100, p.261-270, 1997.

MIRANDE, J. M. Phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes): from characters to taxonomy. **Neotropical Ichthyology**, Porto Alegre, v.8. n.2, p.385-568, 2010.

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.

MODENESI, M. C. **Significado dos depósitos correlativos quaternários em Campos do Jordão – São Paulo: implicações paleoclimáticas e paleoecológicas**. Governo do Estado de São Paulo. Secretaria do meio ambiente. Instituto Geológico, boletim n.7, p. 155, 1988.

MONTIEL, E. E.; CABRERO, J.; CAMACHO, J. P. M.; LÓPEZ-LEÓN, M. D. *Gypsy, RTE and Mariner* transposable elements populate *Eyprepocnemis plorans* genome. **Genetica**, The Hague, v. 140, p.365-374, 2012.

MOREIRA, C. R. **Relações Filogenéticas na ordem Characiformes (Teleostei: Ostariophysi)**. 2007, 485f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

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.; GALETTI JR., P. M.; BERTOLLO, L. A. C. B chromosomes in the fish *Astyanax scabripinnis* (Characidae, Tetragonopterinae): an overview in natural populations. **Cytogenetic and Genome Research**, New York, v. 106, p. 230-234, 2004.

MURRAY, M. G.; THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, London, v.8, p. 4321-4326, 1980.

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.

NÉO, D. M.; MOREIRA-FILHO, O.; CAMACHO, J. P. M. Altitudinal variation for B chromosome frequency in the characid fish *Astyanax scabripinnis*. **Heredity**, Edimburgo, v.85, p.136-141, 2000.

OLIVEIRA, C.; WANG, Y.; BRYDEN, L. J.; WRIGTH, J. M.; Short interspersed repetitive elements (SINEs) from the cichlid fish, *Oreochromis niloticus*, and their chromosomal localization by fluorescent in situ hybridization. **Caryologia**, Firenze, v.56, p.177-185, 2003.

OZOUF-COSTAZ, C.; BRANDT, J.; KÖRTING, C.; PISANO, E.; BONILLO, C.; JEAN-PIERRE COUTANCEAU, J.; VOLFF, J. Genome dynamics and chromosomal localization of the non-ltr Retrotransposons Rex1 and Rex3 in Antarctic fish. **Antarctic Science**, Cambridge, v.16, p.51-54, 2004.

REIS, R. E.; KULLANDER S. O.; FERRARIS, C. J. Jr. **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Porto Alegre: Edipucrs, 2003, 729 p.

REBUZZINI, P.; CASTIGLIA, R.; NERGADZE, S. G.; MITSAINAS, G.; MUNCLINGER, P.; ZUCCOTTI, M.; CAPANNA, E.; REDI, C. A.; GARAGNA, S. Quantitative variation of LINE-1 sequences in five species and three subspecies of the subgenus *Mus* and in five Robertsonian races of *Mus musculus domesticus*. **Chromosome Research**, Oxford, v.17, p.65-76, 2009.

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, Uruguiana, RS. **Biodiversidade Pampeana**, 3, p. 11-18, PUCRS, 2005.

SANTOS, N. M.; FERREIRA-NETO, M.; ARTONI, R. F.; VICARI, M. R.; BAKKALI, M.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. A comparative structural cytogenetic study in three allopatric populations of *Astyanax scabripinnis* (Teleostei: Characidae). **Zoologia**, Curitiba, v.29, n.2, p.159-266, 2012.

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

SILVA, M.; MATOSO, D. A.; VICARI, M. R.; ALMEIDA, M. C.; MARGARIDO, V. P.; ARTONI, R. F. Physical Mapping of 5S rDNA in Two Species of Knifefishes: *Gymnotus pantanal* and *Gymnotus paraguensis* (Gymnotiformes). **Cytogenetic and Genome Research**, New York, v.134, p.303-307, 2011.

SEIBERT, P. **Plano de manejo do Parque Estadual de Campos do Jordão**. Boletim Técnico do Instituto Florestal de São Paulo, v.19, p. 1-153, 1975.

SCHROEDER-ARAUJO, L. T.; STEMPNIEWSKI, H. L.; CIPÓLLI, M. N.; SANTOS, L. E.; SANTO-PAULO, M.; CORRÊA-CREMONESI, W. Estudo Limnológico e Climatológico da Região do Parque Estadual de Campos do Jordão, SP, com vistas ao povoamento com truta Arco-Íris, *Salmo irideus* Gibbons. **Boletim do Instituto da Pesca**, São Paulo, v.13, n.2, p. 63-76, 1986.

SOUZA, I. L.; MOREIRA-FILHO, O.; GALETTI JR, P. M. Heterochromatin differentiation in the characid fish *Astyanax scabripinnis*. **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v.19, n.3, p. 405-410, 1996.

SUMNER, A.T. **Chromosomes: organization and function**. Blackwell Publishing, New York, USA. 304 p., 2003.

SZAUTER, P. An analysis of regional constraints on exchange in *Drosophila melanogaster* using recombination-defective meiotic mutants. **Genetics**, New York, v.106, p.45-71, 1984.

TIMBERLAKE, W. E. Low repetitive DNA content in *Aspergillus nidulans*. **Science**, v. 202, p.973-975, 1978.

VARI, R. P.; MALABARBA, L. R. Neotropical Ichthyology: an overview.. In: MALABARBA, Luiz R.; REIS, Roberto E.; VARI, Richard P.; LUCENA, Zilda Margarete S.; LUCENA, Carlos Alberto S. **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. Porto Alegre: Edipucrs, p. 1-11, 1998.

VOLFF, J. N.; KORTING, K.; SWEENEY, K.; SCHARTL, M. The non-LTR retrotransposon *Rex3* from the fish *Xiphophorus* is widespread among teleosts. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v.16, p. 1427-1438, 1999.

VICARI, M. R.; NOLETO, R. B.; ARTONI, R. F.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. Comparative cytogenetics among species of the *Astyanax scabripinnis* complex. Evolutionary and biogeographical inferences. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.31, n.1, p.173-179, 2008a.

VICARI, M. R.; ARTONI, R. F.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. Colocalization of repetitive DNAs and silencing of major rRNA genes. A case report of the fish *Astyanax janaeirens*. **Cytogenetic and Genome Research**, New York, v.122, p. 67- 72, 2008b.

VICARI, M. R.; NOGAROTO, V. NOLETO, R. B.; CESTARI, M. M.; CIOFFI, M. B.; ALMEIDA, M. C.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C.; ARTONI, R. F. Satellite DNA and chromosomes in Neotropical fishes: methods, applications and perspectives. **Journal of Fish Biology**, London, v.76, p.1094-1116, 2010.

VICARI, M. R.; PISTUNE, H. F. M.; CASTRO, J. P.; ALMEIDA, M. C.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O.; CAMACHO, J. P. M.; ARTONI, R. F. 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.

WEITZMAN, S. H.; MALABARBA, L. R. Perspectives about the phylogeny and classification of the Characidae (Teleostei: Characiformes). In: MALABARBA, Luiz R.; REIS, Roberto E.; VARI, Richard P.; LUCENA, Zilda Margarete S.; LUCENA, Carlos Alberto S. **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. Porto Alegre: Edipucrs, p. 161-169, 1998.

WICKER, T.; SABOT, F.; HUA-VAN, A.; BENNETZEN, J. L.; CAPY, P.; CHAULHOUB, B.; FLAVELL, A.; LEROY, P.; MORGANTE, M.; PANAUD, O.; PAUX, E.; SANMIGUEL, P.; SCHULMAN, A. A unified classification system for eukaryotic transposable elements. **Nature**, New York, v.8, p.973-982, 2007.

ZENATTI, P. P. **Análise Filogeográfica de *Astyanax scabripinnis* (Characiformes, Characidae) da região de Campos do Jordão (SP)**. 2006, 108f. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2006.

ZHANG, X.; EICKBUSH, M. T.; EICKBUSH, T. H. Role of Recombination in the Long-Term Retention of Transposable Elements in rRNA Gene Loci. **Genetics**, New York, v.180, p.1617-1626, 2008.

ZWICK, M. S.; HANSON, R. E.; MCKNIGHT, T. D.; ISLAM-FARIDI, H. M.; STELLY, D. M.; WING, R. A.; PRICE, J. H. A rapid procedure for the isolation of C₀t-1 DNA from plants. **Genome**, Ottawa, v.40, p. 138-142, 1997.

ANEXOS

5 – Anexos

5.1 – Protocolos – Citogenética Convencional

5.1.1 – Obtenção de metáfases mitóticas – método direto (BERTOLLO; TAKAHASHI; MOREIRA-FILHO, 1978)

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. Divulsionar 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 1.000 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.

5.1.2 – Método de coloração com Giemsa

As análises e preparações das lâminas preparadas com suspensão celular foram coradas com solução do corante Giemsa, diluído em tampão fosfato pH 6,8

($\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4$) 5% a 7 minutos e em seguidas lavadas com água corrente e secadas ao ar.

5.1.3 – Coloração das regiões organizadoras de nucléolo - Ag-RONs (HOWELL; BLACK, 1980)

1. Em lâminas preparadas para a obtenção de cromossomos mitóticos pingar uma gota da solução coloidal reveladora (1 g de gelatina dissolvida em 50 ml de água destilada com 0,5 ml de ácido fórmico) e duas gotas da solução de nitrato de prata (1 g de AgNO_3 dissolvida em 2 ml de água destilada) sobre a lâmina;
2. Colocar a lamínula em cima da solução;
3. Levar a lâmina à estufa a 60 °C até que atinja uma coloração marrom-dourada;
4. Lavar a lâmina com água corrente e secar ao ar;
5. Se necessário, corar com Giemsa diluída a 1% em tampão fosfato pH 6,8 durante 30 s aproximadamente.

5.1.4 – Identificação cromossômica

A identificação cromossômica para montagem dos cariótipos foi proposta por Levan et al. (1964) e é baseada nos critérios da relação de braços (RB). Foram então classificados em metacêntricos (m) (RB = 1,00 a 1,70); submetacêntricos (sm) (RB = 1,71 a 3,00); subtelocêntricos (st) (RB = 3,01 a 7,00) e acrocêntricos (a) (RB > 7,00). As metáfases foram capturadas pelo sistema de captura de Imagens CCD Olympus DP 71[®] e software DP-Controller versão 3.2.1.276.

5.2 – Protocolos – Citogenética molecular

5.2.1 – Extração de DNA genômico método CTAB (MURRAY; THOMPSON, 1980) com modificações

1. Preparar o tampão CTAB para um volume final de 15 ml seguindo a formulação:
6 ml de CTAB 5% (concentração final 2%);
3 ml de NaCl 5M (concentração final 1M);
3 ml de EDTA 0,5M (concentração final 0,1M);

3 ml de TRIS-HCL 1M pH 8,0 (concentração final 0,1M).

Guardar em temperatura ambiente.

2. Processo de extração: Colocar o tecido muscular picotado em um tubo, adicionar 360 µl de tampão sem CTAB; 13 µl de proteinase K (10 mg/ml) e 5 µl de β-mercaptoetanol. Por último, adicionar 240 µl do tampão CTAB preparado;

3. Deixar o tecido *overnight* a 55 °C (banho) até que esteja totalmente digerido.

4. Adicionar 600 µl de clorofórmio;

5. Agitar durante 5 min (vórtex suave). Centrifugar a 8.000 rpm por 5 min;

6. Retirar sobrenadante e transferir para novo tubo;

7. Adicionar 600 µl de etanol absoluto (100%) e deixar a -20 °C por 2 horas;

8. Centrifugar a 14.000 rpm por 15 min a 11 °C. Descarta-se sobrenadante;

9. Lavar o pellet com 500 µl de etanol 70%. Centrifugar por 2 min (14.000 rpm 11 °C) e retirar sobrenadante;

10. Secar na estufa a 37 °C;

11. Adicionar 15 µl de H₂O + 5 µl RNase (10 mg/ml): deixar durante 1 hora a 37 °C; depois durante 15 min a 65 °C.

5.2.2 – Isolamento de sequências repetitivas obtidas pela cinética de reassociação do DNA (*C₀t-1*) (ZWICK et al., 1997)

1. Diluir o DNA genômico a 100-500 ng/µl em 0,3M NaCl;

2. Colocar 500 µl em tubos de 1,5 ml;

3. Autoclavar por 3 a 5 min a 1.0 atm/120 °C;

4. Aplicar 3 µl do DNA autoclavado em gel de agarose 1% para checar se o tamanho dos fragmentos obtiveram entre 100 e 1.000 pb;

5. Desnaturar 3 alíquotas – tubos 0, 1 e 5 – com 50 µl do DNA autoclavado em banho a 95 °C por 10 min;

6. Passar os tubos para o gelo por 10 s, o tubo 0 é tratado imediatamente com S1 nuclease e colocar os tubos 1 e 5 para renaturação;

7. Após 1 min, retirar o tubo 1 e tratar com S1 nuclease e após 5 min, retirar o tubo 5 e tratar com S1 nuclease;

8. Para o tratamento com S1 nuclease, usar 1U da enzima para 1 µg de DNA e usar 5,5 µl de tampão 10x para o volume final de 50 µl;

9. Incubar a 37 °C durante 8 min;

10. Congelar imediatamente em nitrogênio líquido;
11. Adicionar igual volume de fenol/clorofórmio (1:1);
12. Centrifugar por 5 min a 13.000 rpm. Coletar a fase aquosa e passar para um novo tubo;
13. Precipitar o DNA com 2,5 volumes de etanol absoluto gelado;
14. Deixar no freezer a -80 °C por 30 min;
15. Centrifugar por 15 min a 18,75x10¹¹g a 4 °C. Secar e ressuspender em 50µl de água miliQ autoclavada;
16. Checar o DNA em gel de agarose 1%.

5.2.3 – Clonagem

1. O produto do C₀t-1 foi ligado ao plasmídeo pMOS (Amersham Biociences) para posterior transformação de células competentes de *Escherichia coli* DH5α (Gibco.Brl Life Technologies), segundo as instruções do fabricante;
2. Em um tubo de 0,5 ml, adicionar 3 µl do inserto de interesse (fragmento de DNA), 1 µl de T4 DNA ligase, 5 µl de tampão de reação 2x, 1 µl do plasmídeo pMOS (54 ng/µl);
3. Misturar cuidadosamente com uma micropipeta e incubar a reação a 4°C durante 12-16 horas;
4. Descongelar as células competentes em gelo;
5. Aliquotar 50 µl das células competentes e transferir para um tubo de microcentrífuga de 1,5 ml e manter em gelo;
6. Recolocar o restante das células competentes em freezer -70°C;
7. Adicionar 4 µl do produto de ligação (inserto-plasmídeo) ao tubo contendo os 50 µl de células competentes, misturando cuidadosamente com uma micropipeta;
8. Manter o tubo em gelo por 30 minutos;
9. Aplicar um choque térmico de 20 segundos em banho-maria a 37°C;
10. Colocar o tubo imediatamente em gelo e manter por 2 minutos;
11. Adicionar ao tubo 950 µl de meio líquido LB (peptona 1%, NaCl 0,17M, extrato de levedura 0,5%) à temperatura ambiente e agitar a 225 rpm por uma hora a 37°C;
12. Centrifugar por 10 segundos a 14000 rpm e descartar parte do sobrenadante;
13. Espalhar 150 µl do produto de transformação em placas de Petri estéreis

contendo meio sólido LB (peptona 1%, NaCl 0,17M, extrato de levedura 0,5%, ágar 1,5%, pH 7,5), contendo 2 µl de ampicilina (50 mg/ml) por mililitro de meio LB e 50 µl de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactoside) (50 mg/ml);

14. Incubar as placas com o meio voltado para baixo *overnight* a 37 °C.

15. As colônias brancas serão transferidas para tubos de 15 ml contendo 4 ml de meio LB líquido acrescido de ampicilina com ajuda de palitos ou ponteiros de micropipeta autoclavados;

16. Os tubos com as bactérias serão mantidos *overnight* sob agitação (300 rpm) a 37 °C;

17. Transferir 0,8 ml do meio com as bactérias para tubos de microcentrífuga de 1,5 ml contendo aproximadamente 200 µl de glicerol estéril;

18. O material deve ser homogeneizado e armazenado a –70 °C.

5.2.4 - Purificação de fragmentos DNA de gel de agarose

A purificação dos fragmentos de DNA de interesse de gel de agarose foi realizada utilizando o kit *High Pure PCR Cleanup Micro Kit* (GE Healthcare Amersham Biosciences), seguindo as especificações do fabricante, conforme descrito a seguir:

1. Isolar a banda de interesse com bisturi ou lâmina estéril;

2. Pré-pesar o eppendorf vazio (1,5 ml);

3. Pesar o tubo com o gel recortado e determinar o peso do gel;

4. Adicionar 300 µl de *binding buffer* para cada 100 mg de gel;

5. Dissolver o gel:

Vortexar 15-30 s para ressuspender o gel no *binding buffer*;

Incubar a suspensão por 10 min a 56°C (estufa das vidrarias);

Vortexar o tudo a cada 2-3 min durante a incubação;

6. Depois de o gel estar completamente dissolvido:

Adicionar 100 µl de *binding enhancer* para cada 100 mg de agarose;

Vortexar;

Centrifugar;

7. Inserir um *High Pure Filter Tube* em um tubo coletor;

Com uma pipeta transferir a amostra para o reservatório;

Centrifugar 30-60 s a 8.000 rpm;

8. Tirar o *filter tube* e descartar o *flow- through*. Retornar o *filter tube* no mesmo tubo coletor;
 9. Adicionar 400 µl de *Wash Buffer* e centrifugar por 30-60 s 8.000 rpm;
 10. Descartar o *flow- through*. Retornar o *filter tube* no mesmo tubo coletor;
 11. Adicionar 300 µL de *Wash Buffer* e centrifugar por 30-60 s 8.000 rpm;
 12. Descartar o *flow- through*. Retornar o *filter tube* no mesmo tubo coletor;
 13. Centrifugar 1 min na velocidade máxima;
 14. Descartar o *flow- through* e o tubo coletor;
 15. Conectar o *filter tube* em um novo tubo coletor;
 16. Adicionar 20 µl de *Elution Buffer* no centro do *filter tube* e centrifugar 1 min 8.000 rpm;
- Foi estimada a concentração do produto final através da utilização do NanoVue (GE).

5.2.5 - Sequenciamento de DNA

Devido a não disponibilidade de equipamento, as sequências nucleotídicas foram realizadas mediante serviço de contratação de terceiros, pessoa jurídica.

O sequenciamento nucleotídico dos clones de interesse e dos fragmentos de DNA foi realizado utilizando o kit DYEnamic™ ET Terminator Cycle Sequencing (Amersham Biosciences®), segundo as instruções do fabricante. As amostras a serem sequenciadas foram preparadas com 30 a 60 ng de produto purificado, 100 pmol de *primer* e água estéril (volume necessário para 6,0 µl de reação final).

5.2.6 - Análise das sequências nucleotídicas

Para identificação de possíveis homologias de genes, as sequências nucleotídicas foram submetidas a buscas *online* através do Genetic Information Research Institute “Repbase”, “website” (<http://www.girinst.org/>). As sequências foram editadas e alinhadas *online* através do Multiple sequence alignment (CORPET, 1988), “website” (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>).

5.2.7 - Marcação das sondas

As sondas As51, DNAr 18S e DNAr 5S foram marcadas pela técnica de *nick translation*, utilizando os compostos biotina 14 - dATP (Bionick Labeling System - Invitrogen) ou por PCR utilizando concentrações adequadas de dNTPs e um dNTP acoplado a uma molécula repórter (biotina 14 dATP, Invitrogen®). O LINE e o DNAr 18S foram marcados utilizando a digoxigenina 16 – dUTP (Dignick mix - Roche®).

5.2.8 - Hibridação fluorescente *in situ* (FISH) (PINKEL et al., 1986) com modificações

Hibridações foram realizadas sobre condições de alta estringência (77%).

Preparação das lâminas

As lâminas, contendo as preparações cromossômicas, foram lavadas em PBS, por 5 minutos, em temperatura ambiente e desidratadas em uma série de etanol a 70%, 85% e 100%, 5 minutos em cada banho. A seguir, foram tratadas com solução de RNase (100 µg/ml) durante 1 hora, em câmara úmida a 37°C, lavadas duas vezes em solução de 2xSSC, por 10 minutos e em PBS, por 5 minutos. Em seguida a fixação com formaldeído 1% / PBS 1x / MgCl₂ 50mM, por 10 minutos, à temperatura ambiente, lavagem em PBS 1x por 5 minutos e desidratação em série de etanol a 70%, 85% e 100%, 5 minutos cada banho, à temperatura ambiente. As lâminas foram então tratadas com formamida 70% dissolvida em 2xSSC, a 70°C, por 5 minutos e novamente desidratadas em série de etanol a 70%, 85% e 100%, 5 minutos cada banho.

Hibridação e detecção dos sinais correspondentes

Foram aplicados, sobre as lâminas, cerca de 50 µl da solução de hibridação permanecendo *overnight* a 37°C, em câmara úmida contendo solução de 2xSSC pH 7,0. Decorrido este tempo, as lâminas foram lavadas com solução de formamida 15% em 0,2xSSC pH 7,0 por 20 minutos, a 42°C. Em seguida foram lavadas em Tween 20, por 5 minutos, incubadas em tampão NFDM a 5%, por 15 minutos. Após, as lâminas foram lavadas com Tween 20, cinco minutos cada. Para a detecção da sonda, foram colocados sobre as lâminas 90µl de avidina-FITC (Fluoresceína Isotil

Cianato-avidina conjugada) a 0,25µg/µl, permanecendo por 1 hora a 37°C, em câmara úmida. As lâminas foram lavadas 3 vezes em Tween 20, cinco minutos cada. Em seguida a desidratação em série de etanol a 70%, 85% e 100% à temperatura ambiente, 5 minutos em cada banho. Os cromossomos foram contra corados com DAPI (0,2 µg/ml) diluído em uma solução *antifade* (Fluka).

5.2.9 – Fiber- FISH (BARROS et al., 2011)

1. Gotejar sobre as lâminas de microscopia, as preparações cromossômicas;
2. Lavar em tampão PBS (*phosphate buffered saline*) por 2 minutos à temperatura ambiente (25°C);
3. Na parte superior da lâmina adicionar solução de hidróxido de sódio 0,15 M/etanol 30% para posterior arrasto utilizando uma lâmina de vidro com inclinação de 30 a 45°;
4. Aplicar 500 µl de etanol 100%, mantendo a lâmina inclinada até completa evaporação.

As lâminas tratadas foram posteriormente submetidas à FISH de acordo com o protocolo de Pinkel et al. (1986).

As preparações cromossômicas submetidas à FISH e *fiber* FISH foram analisadas em microscópio de epifluorescência, com os filtros apropriados Olympus Bx41. As imagens foram capturadas com utilização do software Image Pro Plus - CoolSNAP-pro (Media Cybernetic) em Câmara de Captura Olympus DP71 12 mp.