

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MICHELLE ORANE SCHEMBERGER

**ESTUDOS EVOLUTIVOS ENVOLVENDO DNAs REPETITIVOS E
CROMOSSOMOS SEXUAIS EM ESPÉCIES DA FAMÍLIA PARODONTIDAE
(ACTINOPTERYGII; CHARACIFORMES)**

CURITIBA

2014

MICHELLE ORANE SCHEMBERGER

**ESTUDOS EVOLUTIVOS ENVOLVENDO DNAs REPETITIVOS E
CROMOSSOMOS SEXUAIS EM ESPÉCIES DA FAMÍLIA PARODONTIDAE
(ACTINOPTERYGII; CHARACIFORMES)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal do Paraná (UFPR) como parte dos requisitos para obtenção de título de Doutora em Ciências Biológicas, área de concentração Genética.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari

CURITIBA

2014



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Tese de Doutorado, a qual se submeteu **MICHELLE ORANE SCHEMBERGER**, para obtenção do título de Doutora em Genética pela Universidade Federal do Paraná, no Programa de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se confira à candidata o conceito "A".

Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 16 de dezembro de 2013

Doutor Roberto Ferreira Artoni

Universidade Estadual de Ponta Grossa – Membro Titular

Doutor Rafael Bueno Noletto

Universidade Estadual Do Paraná – Membro Titular

Doutora Marta Margarete Cestari

Universidade Federal do Paraná – Membro Titular

Doutora Iris Hass

Universidade Federal do Paraná – Membro Titular

Doutor Marcelo Ricardo Vicari

Universidade Estadual de Ponta Grossa – Orientador e Presidente da Banca

Visto

Professor Doutor Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Genética

Dedico este trabalho aos meus queridos
avós Noemia e Zico (*in memoriam*) e à
minha amada mãe Cleci.

Agradecimentos

A **Deus** por toda força e iluminação durante minha caminhada, por me dar a intuição do melhor caminho a ser seguido.

À minha querida e amada mãe **Cleci** por todo esforço e dedicação para eu chegar até esta etapa da minha vida, além de todos seus ensinamentos e conselhos, mãe você é tudo para mim. Obrigada por toda a formação que deu para mim.

Aos meus avós **Noemia e Zico** (*in memoriam*) por fazerem de minha infância um período muito feliz e por terem participado da minha formação como pessoa, vocês sempre estarão no meu coração e sei que de onde vocês estiverem sempre estarão me auxiliando e torcendo por minhas vitórias. Muitas saudades de vocês.

Ao meu orientador e amigo **Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari** por seus conhecimentos, ideias e ensinamentos teóricos e práticos que direcionaram o meu trabalho, obrigada também por sempre acreditar em mim e por seu incentivo quando tudo parecia estar difícil. Você é uma pessoa admirável pelo que faz, sempre serei grata por tudo o que fez por mim.

À **Prof.^a Dr.^a Viviane Nogaroto Vicari** por sua amizade, pelos seus conhecimentos e auxílio na bancada que foram fundamentais para meu trabalho.

Ao **prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni** por ter me dado à oportunidade de estar trabalhando com evolução e genética de peixes, área que despertou o meu interesse e aprimorou os meus conhecimentos. Agradeço também pelos seus ensinamentos, ideias, apoio oferecido e amizade.

À **Prof.^a Dr.^a Mara Cristina de Almeida Matiello** pela amizade, pelos seus ensinamentos em genética que me despertaram a motivação para trabalhar com esta área, serei sempre grata pela sua confiança depositada em mim. Agradeço também pelos seus

ensinamentos práticos, pelo apoio e incentivo. Nunca esquecerei quando você me deu oportunidade trabalhar tanto no estágio como também no mestrado.

Ao meu pai de coração **Fernando Gehr** por sempre me apoiar e incentivar na minha caminhada, obrigada por me fazer conhecer lugares maravilhosos, que me fizeram sentir renovada.

Aos **meus colegas e amigos de laboratório** Cléber, Kaline, Thais, Karina, Paulo, Viviane, Rafael, Lucas, Bárbara, Marcela, Carla, Alex, Patricia, Jhonatan, Tajiana, Michele, Alain que contribuíram de alguma forma para meu trabalho e também pelos momentos de descontração. Em especial sou muito grata aos amigos **Jordana** pelo seu auxílio nos experimentos e ao **Leonardo**, uma pessoa admirável, um grande irmão que sempre me deu palavras de incentivo e força, além de me ajudar na bancada. **Léo** muito obrigada você merece tudo de bom.

Aos **meus colegas e amigos do Programa de Pós de Graduação em Genética**, Carlos Eduardo (Kadu), Samuel, Douglas, Daiane e Louise, por fazer os meus dias mais agradáveis quando estive em Curitiba. Em especial meus sinceros agradecimentos a minha grande amiga **Fernanda** por sempre me dar força e apoio para enfrentar as dificuldades, estar presente nos momentos de alegrias e tristezas. Nunca esquecerei o que fez por mim.

Ao prof. **Dr. Orlando Moreira-Filho**, a **Dr.^a Elisangela Bellafronte** e a **Kaline Zienniczak** pelos materiais fornecidos de espécies de Parodontidae.

À minha madrinha **Maria Perpétua Abib Antero** que me acolheu de forma carinhosa em sua casa no período em que estive em Curitiba.

Ao meu irmão **Rafael** e minha cunhada **Wanessa** que sempre torceram por mim e por me darem incentivo para vencer mais esta etapa.

À minha amada sobrinha **Marina** por me fazer voltar a ser criança e tornar os meus dias mais leves e felizes.

Às minhas amigas de infância **Carla, Juliana, Caroline** que sempre torceram por mim, obrigada por nossos encontros mesmo que raros, mas sempre agradáveis, adoro voltar ao passado quando estou com vocês.

Às minhas grandes amigas **Marcia e Taciana** obrigada por tudo que vocês representam para mim, nós temos muitas histórias pra contar, guardo sempre comigo. Saudades de vocês.

Ao técnico e amigo **Miguel**, conhecido como “*Magaiver*”, pelo seu auxílio no laboratório e pelos momentos de descontração.

À banca de avaliação **Prof.^a Dr.^a Marta Margarete Cestari, Prof. Dr. Rafael Bueno Noletto, Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni, Prof.^a Dr.^a Iris Hass e Prof.^a Dr.^a Mara Cristina de Almeida Matiello** pela disponibilidade e por contribuírem com o enriquecimento da minha tese.

Ao **Murilo** da secretaria de Pós-Graduação em Genética pelo seu auxílio e bom atendimento.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal do Paraná** e a **Universidade Estadual de Ponta Grossa** pelo suporte.

Ao **Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA/MMA/SISBIO n°: 15117)** pela autorização da captura de peixes. Sou grata também pelo apoio financeiro do **CNPq, CAPES, SETI, Fundação Araucária e FAPESP.**

A **todos** que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente para eu chegar e vencer mais esta etapa de minha vida, meus sinceros agradecimentos.

“Penso noventa e nove vezes e nada descobro; deixo de pensar, mergulho em profundo silêncio: e eis que a verdade se me revela.”

Albert Einsten

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

RESUMO

A família Parodontidae apresenta uma ampla distribuição na América do Sul, conta com 32 espécies válidas e é constituída por três gêneros, *Parodon*, *Apareiodon* e *Saccodon*. O número diploide é conservado nesse grupo com $2n=54$ cromossomos, com espécies sem sistemas de cromossomos sexuais heteromórficos e outras com sistemas de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW ou ZZ/ZW₁W₂. Estudos recentes com mapeamento dos DNAs repetitivos WAp e pPh2004 por hibridação *in situ* fluorescente nos cromossomos de algumas espécies demonstraram possível origem, diferenciação e evolução dos sistemas de cromossomos sexuais desta família. Entretanto estudos mais aprofundados são fundamentais para um maior esclarecimento do papel genômico das sequências repetitivas. Neste estudo foram descritas a localização da sonda de DNA repetitivo WAp sobre cromossomos da espécie *Apareiodon hasemani* discutindo-se a diferenciação do cromossomo W e foram também mapeados rDNA 18S e 5S. Além disso, também foram apresentados os resultados da prospecção de DNAs repetitivos pelo procedimento da cinética de reassociação C₀t-1, onde foram obtidas e caracterizadas molecular e citogeneticamente sequências repetitivas, sendo que algumas estão envolvidas com o processo de diferenciação do cromossomo W. Por fim, análises pormenorizadas do elemento transponível Tc1-Mariner foram realizadas com o intuito de compreender sua funcionalidade, aspectos de degeneração molecular e exaptação no genoma de Parodontidae.

Palavras-chaves: Evolução cariotípica, exaptação, elementos transponíveis, Tc1-Mariner.

ABSTRACT

The family Parodontidae occurs throughout South America, and includes three genera: *Parodon*, *Apareiodon* and *Saccodon* with 32 recognized species. The diploid number is conserved in this group with $2n = 54$ chromosomes. The species within this family are either sex-homomorphic or sex-heteromorphic (i.e., lacking a differentiated sex chromosome system, ZZ/ZW or ZZ/ZW₁W₂). Recent studies with mapping of repetitive DNAs WAp and pPh2004 by fluorescence *in situ* hybridization on chromosomes of some species showed possible origin, differentiation and evolution of sex chromosome system of this family. However further studies are essential to a greater understanding of the genomic function of repetitive sequences. In this study was located repetitive DNA WAp on chromosomes of the species *Apareiodon hasemani* and discussed the differentiation of chromosome W, the rDNA 5S and 18S were also mapped. In addition, repetitive sequences were obtained by reassociation kinetics C₀t-1 and characterized, some these sequences are involved in the differentiation of chromosome W. Finally, detailed analyses of the transposable element Tc1-Mariner were performed in order to understanding of its functionality, molecular aspects and exaptation in the Parodontidae genome.

Keywords: Karyotypic evolution, exaptation, transposable elements, Tc1-Mariner.

LISTA DE FIGURAS

1. INTRODUÇÃO

Figura 1: Classificação dos elementos transponíveis segundo WICKER et al. (2007) 13

3. MATERIAL E MÉTODOS

Figura 1: Mapa hidrográfico do Brasil, mostrando a distribuição das espécies de Parodontidae. Em (1) rio Passa-Cinco - SP; (2) rio Piumhi – MG; (3) rio Piquiri - PR; (4) rio Tibagi – PR; (5) rio Jordão – PR; (6) Córrego do Porta – MG; (7) rio São Francisco - MG; (8) rio Paraguai – MT; (9) rio Taquaralzinho – MT; (10). Ao lado as espécies estudadas numeradas de acordo com a sua localização nas bacias 23

4.1 CAPÍTULO I: Sex chromosome system ZZ/ZW in *Apareiodon hasemani* Eigenmann, 1916 (Characiformes, Parodontidae) and a derived chromosomal region.

Figure 1: Karyotypes of males and female *Apareiodon hasemani* arranged from Giemsa-staining (a, c) and C-banding (b, d) 40

Figure 2: Chromosomal markers in *Apareiodon hasemani* (a) representative double-FISH karyotype, showing five 18S rDNA sites and chromosome pair 14 bearing 5S rDNA sites. (b) representative the *Wap* signals. The nucleolar organizer regions revealed by silver nitrate (Ag-NOR) staining are shown in the insert box 41

Figure 3: Hypothetical derivation of the W chromosome from an ancestral chromosome similar to the Z chromosome in *Apareiodon hasemani* 42

4.2 CAPÍTULO II: Caracterização e clonagem de DNAs repetitivos obtidos por C_0t-1 de Parodontidae.

Figura 1: Gel de agarose 1 % evidenciando DNA de *Apareiodon sp.* submetido à cinética de reassociação e digestão enzimática com S1 nuclease ($Cot-1$ total) 61

Figura 2: Cariótipos de *P. hilarii* submetidos à FISH com a sonda $Cot-1$ total. Em (A) cariótipo de macho de *P. hilarii* com sítios em regiões terminais de vários cromossomos e na região pericentromérica do braço curto do cromossomo Z; em (B) cariótipo de fêmea com sítios em regiões terminais de vários cromossomos e em quase todo braço longo do cromossomo W 62

Figura 3: Localização dos sítios do elemento transponível *Helitron* - clone 9 (A e B) e rDNA 5S - clone 10 (C e D) por FISH em metáfases de fêmeas das espécies *A. ibitiensis* (A e C) e *P. hilarii* (B e D). Foram evidenciados sítios terminais do *Helitron* no braço longo dos cromossomos Ws de ambas as espécies e marcação proximal e terminal no braço curto do cromossomo Z de *P. hilarii*. O rDNA 5S esta presente na região pericentromérica do par 11 de ambas as espécies analisadas 63

Figura 4: Cariótipos submetidos à FISH utilizando a sonda do clone 4 (sinais em vermelho) e do DNA satélite pPh2004 (sinais em verde). Em A fêmea da espécie *A. piracicabae*; em B fêmea da espécie *P. pongoensis*; em C fêmea da espécie *P. nasus*; em D fêmea da espécie *A. hasemani*; em E fêmea de *P. hilarii*; F fêmea de *A. affinis*. Os sítios do clone 4 foram localizados em regiões terminais de vários cromossomos do cariótipo de todas as espécies analisadas, nos cromossomos W de *A. hasemani* e *P. hilarii* e no cromossomo Z de *A. affinis* 64

4.3 Capítulo III: Perda de identidade e exaptação molecular do elemento transponível Tc1-Mariner no genoma de Parodontidae

Figura 1: Caracterização molecular das sequências do elemento Tc1-Mariner das espécies de Parodontidae 88

Figura 2: Região da TIR 5' e TIR 3' identificados nas sequências Tc1-Mariner de Parodontidae 89

Figura 3: Alinhamento das sequências de aminoácidos correspondente a ORF da enzima transposase (somente as sequências contendo uma ORF e os três domínios foram consideradas). 90

Figura 4: Representação gráfica da divergência das sequências do elemento Tc1-Mariner em Parodontidae 91

Figura 5: Número de substituições de nucleotídeos por sítio (distância genética) entre sequências da superfamília Tc1-Mariner em Parodontidae. As análises foram conduzidas utilizando o modelo de Kimura 2-parâmetros. A taxa de variação entre os sítios foi modelada com a distribuição gamma (parâmetro=1)..... 93

Figura 6: - Posição dos sítios regulatórios (figura em relevo colorido) nas sequências de Tc1-Mariner (barra) menos degradadas de Parodontidae. Sendo considerados valores de matriz de similaridade ≥ 0.95 e tamanho do TFBS ≥ 10 pb (dados obtidos pelo Matinspector). Acima da barra a orientação da sequência esta no sentido 5'- 3', e abaixo da barra a sequência esta orientada no sentido 3' - 5' 94

Figura 7: Posição dos sítios regulatórios (figura em relevo colorido) nas sequências de Tc1-Mariner (barra) com maior índice de degradação de Parodontidae. Sendo considerados valores de matriz de similaridade ≥ 0.95 e tamanho do TFBS ≥ 10 pb (dados obtidos pelo Matinspector). Acima da barra a orientação da sequência esta no sentido 5'-3', e abaixo da barra a sequência esta orientada no sentido 3' - 5' 95

Figura 8: Metáfases de *P. hilarii* (A) e *A. affinis* (B) submetidos à FISH com a sonda do clone de *A. ibitiensis* (sequência 3c) Tc1-Mariner (vermelho). A sonda pPh2004 (verde) foi utilizada neste estudo somente com o intuito de identificação cromossômica 96

Figura 9: Gel de agarose 1% evidenciando o produto de PCR do elemento Tc1-Mariner utilizando RNA (extraído das gônadas) como molde da espécie *Apareiodon* sp. Em A macho e em B fêmea. Este resultado indica que o elemento Tc1-Mariner esta tendo atividade transcricional 97

LISTA DE TABELAS

3. MATERIAL E MÉTODOS

Tabela 1: Pontos de amostragem, distribuição nas bacias e número de espécies utilizadas ... 24

4.2 CAPÍTULO II: Caracterização e clonagem de DNAs repetitivos obtidos por Cot-1 de Parodontidae.

Tabela 1: Espécies de Parodontidae, localidade, bacia hidrográfica e número de espécies estudadas..... 58

Tabela 2: Caracterização e mapeamento cromossômico dos clones da biblioteca Cot-1 de Parodontidae. 59

4.3 Capítulo III: Perda de identidade e exaptação molecular do elemento transponível Tc1-Mariner no genoma de Parodontidae

Tabela 1: Espécies da família Parodontidae, localidade, bacia hidrográfica, nome da sequência Tc1-Mariner obtida de cada clone (a letra corresponde à espécie e os números são as sequências obtidas) e tamanho de cada sequência obtida por resultado de sequenciamento 85

Tabela 2: Sítios de ligação de fator de transcrição (TFBS) sobrepostos nas sequências de Tc1-Mariner de Parodontidae, sendo considerados valores de matriz de similaridade ≥ 0.95 e tamanho do TFBS ≥ 10 pb (dados obtidos pelo MatInspector)..... 86

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLA

2n: número diploide

a: acrocêntrico

cDNA: DNA complementar

DNA: ácido desoxirribonucleico

D: aspartato

E: glutamato

FISH: hibridação *in situ* fluorescente

HLD: *homeodomain-like-domain*

HTH: *helix-turn-helix*

LINEs: elementos de sequências interespaçadas longas

LTRs: elementos transponíveis com repetições terminais longas

m: metacêntrico

MITEs: elementos transponíveis miniatura não autônomos

non-LTRs: elementos transponíveis com ausência de repetições terminais longas

ORF: *open reading frame* - matriz de leitura aberta

rDNA: DNA ribossômico

RNA: ácido ribonucleico

RONs: regiões organizadoras de nucléolo

SINEs: elementos de sequencias interespaçadas curtas

sm: submetacêntrico

st: subtelocêntrico

TEs: elementos transponíveis

TIRs: repetições terminais invertidas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A SISTEMÁTICA, DISTRIBUIÇÃO E FILOGENIA DOS REPRESENTANTES DA FAMÍLIA PARODONTIDAE.....	1
1.2 CITOGENÉTICA CLÁSSICA E MOLECULAR DA FAMÍLIA PARODONTIDAE.....	3
1.3 DNA REPETITIVO.....	8
1.3.1 DNA repetitivo em tandem	9
1.3.2 DNAs repetitivos dispersos.....	11
1.4 CROMOSSOMOS SEXUAIS	17
2. JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1. MATERIAL	22
3. 2. MÉTODOS.....	25
4. RESULTADOS.....	27
4.1 CAPÍTULO I: SEX CHROMOSOME SYSTEM ZZ/ZW IN APAREIODON HASEMANI EIGENMANN, 1916 (CHARACIFORMES, PARODONTIDAE) AND A DERIVED CHROMOSOMAL REGION	28
Abstract.....	28
Introduction	29
Materials and Methods.....	31
Results.....	33
Discussion.....	34
Acknowledgments	39
References.....	43
4.2 CAPÍTULO II: CARACTERIZAÇÃO E CONSTRUÇÃO DE BIBLIOTECA DE DNAs REPETITIVOS OBTIDOS POR C ₀ T-1 EM PARODONTIDAE.....	47
Resumo	47
Introdução	48
Material e Métodos.....	49
Resultados.....	52
Discussão.....	53
Agradecimentos	57
Referências	57
4.3 CAPÍTULO III: PERDA DE IDENTIDADE E EXAPTAÇÃO MOLECULAR DO ELEMENTO TRANSPONÍVEL Tc1-MARINER NO GENOMA DE PARODONTIDAE	66
Resumo	66
Introdução	67
Material e Métodos.....	69
Resultados.....	73
Discussão.....	77
Agradecimentos	84
Referências	84
5. CONCLUSÃO.....	98
ANEXOS	113
ANEXO I: OBTENÇÃO DE CROMOSSOMOS MITÓTICOS (BERTOLLO ET AL., 1978)	113

ANEXO II: HIBRIDAÇÃO IN SITU FLUORESCENTE (FISH) (PINKEL ET AL., 1986)	114
ANEXO III. MARCAÇÃO DE SONDAS POR NICK TRANSLATION E VIA PCR	116
ANEXO IV: EXTRAÇÃO DE DNA MÉTODO CTAB (MURRAY E THOMPSON, 1980)	117
ANEXO V: CINÉTICA DE RESSOCIAÇÃO Cot-1 (ZWICK ET AL., 1997).....	118
ANEXO VI: OBTENÇÃO DO ELEMENTO Tc1-MARINER	119
ANEXO VII: CLONAGEM.....	120
ANEXO VIII: CLONES CONTENDO OS FRAGMENTOS DO ELEMENTO Tc1-MARINER	121
ANEXO VIX: GRÁFICOS PLOTCON	122

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais sobre a sistemática, distribuição e filogenia dos representantes da família Parodontidae

Os peixes representam o maior grupo de vertebrados existente, com cerca de 32.500 espécies (ESCHMEYER e FONG, 2013). Na América do Sul, o número de peixes de água doce pode chegar a 5000 espécies, que, juntamente com a América Central, representa uma das mais diversificadas e ricas ictiofaunas, englobando aproximadamente 8000 espécies descritas, representando cerca de 30 % de toda a diversidade de peixes do mundo (BOLHKE et al., 1978; LOWE-MCCONNELL, 1999). A ordem Characiformes é a mais abundante dentre os Ostariophysis, sendo composta pelas famílias: Chilodontidae, Distichodontidae, Citharinidae, Curimatidae, Parodontidae, Prochilodontidae, Lebiasinidae, Anostomidae, Crenuchidae, Hemiodontidae, Alestiidae, Gasteropelecidae, Characidae, Acestrorhynchidae, Cynodontidae, Erythrinidae, Ctenolucidae e Hepsetidae (BUCKUP, 1998; NELSON, 2006). Esta ordem apresenta uma grande diversidade morfológica que é uma fonte importante para estudos de filogenia deste grupo.

A família Parodontidae (Eigenmann, 1910) constitui um grupo pequeno de peixes neotropicais compostos por três gêneros: *Apareiodon* Eigenmann, 1916; *Parodon* Valenciennes, 1849 e *Saccodon* Kner, 1863, apresentando um total de 32 espécies válidas (PAVANELLI, 2003; PAVANELLI e BRITSKI, 2003; INGENITO e BUCKUP, 2005; PAVANELLI, 2006, 2007; INGENITO, 2008; ESCHMEYER e FONG, 2013).

As espécies da família Parodontidae estão amplamente distribuídas pelo Continente Sul Americano e parte do Panamá exceto nos rios costeiros ao sul do estado da Bahia, na Patagônia e no canal do rio Amazonas (PAVANELLI, 2006). O gênero *Saccodon* possui uma

distribuição mais restrita ao norte do Continente Sul Americano, sendo encontrado na bacia costeira no Panamá, Colômbia e Equador (ROBERTS, 1974). Por sua vez, os gêneros *Parodon* e *Apareiodon* estão distribuídos por todo o continente sul americano, com exceção das bacias do Atlântico Sul, Patagônia e canal do rio Amazonas (PAVANELLI e BRITSKI, 2003).

Em relação a sua morfologia eles são peixes fusiformes com a face ventral do corpo plana, e são diferenciados por poucos e sutis caracteres diagnósticos (PAVANELLI e BRITSKI, 2003). Estas diferenças estão relacionadas com o número de raios indivisos nas nadadeiras peitorais, em que há a presença de um raio em *Parodon* e *Apareiodon*, e dois raios em *Saccodon*; e o padrão dentário onde há ausência de dentes na região látero-posterior da mandíbula dos gêneros *Apareiodon* e *Saccodon* (INGENITO, 2008), e também diferenças entre o número de cúspides pré-maxilares entre os gêneros *Parodon* e *Apareiodon*. Além disso, o padrão do desenho das máculas laterais é também utilizado para diferenciá-los (TRAVASSOS, 1955; ROBERTS, 1974; PAVANELLI, 2003; 2007; INGENITO, 2008).

Estudos sobre relações de parentesco na família Parodontidae capazes de analisar todos ou quase a totalidade de seus representantes são escassos. INGENITO (2008) utilizou métodos de parcimônia para análise filogenética com o uso de caracteres osteológicos e de morfologia externa de 28 espécies de Parodontidae, uma espécie não descrita de *Parodon*, e 17 espécies de Characiformes como grupo externo. Neste estudo o gênero *Saccodon* foi considerado como um grupo irmão dos demais Parodontidae, sendo o gênero *Apareiodon* sinônimo júnior de *Parodon*. Além disso, foi mostrado que a presença de dentes mandibulares para diagnosticar grupos monofiléticos é ineficaz, pois grupos definidos por este caráter são polifiléticos. Ainda, foi relatado que nas espécies *P. davisi*, *P. ibitiensis*, *P. moreirai*, *P. tigrinus* e *Parodon* sp. a ocorrência de dentes mandibulares varia intra-especificamente.

Por sua vez, SCHEMBERGER et al. (2011) utilizaram análises comparativas de características cromossômicas distintas (número e fórmula cariotípica, bandamento C, RONS, FISH com as sondas rDNA 5S, rDNA 18S, pPh2004 e WAp) para a análise filogenética e agruparam a espécie *A. affinis* com as espécies do gênero *Parodon*, indicando um maior parentesco entre eles quando comparado com outras espécies do gênero *Apareiodon*. Entretanto, neste estudo *Parodon* e *Apareiodon* formam clados distintos, com exceção de *A. affinis*. Em contrapartida, estudos com sequenciamento do gene mitocondrial Citocromo Oxidase c (COI) de espécies do gênero *Parodon* e *Apareiodon* mostrou a ocorrência de dois clados bem sustentados, corroborando a manutenção destes dois gêneros (BELLAFRONTTE et al., 2013).

1.2 Citogenética clássica e molecular da família Parodontidae

Na família Parodontidae os gêneros *Parodon* e *Apareiodon* possuem características macro-cariotípicas muito semelhantes, onde o número diploide é de 54 cromossomos compostos basicamente por cromossomos meta-submetacêntricos (m-sm), sendo os cromossomos subtelocêntricos (st) ausentes ou variando entre um a três pares entre as espécies (BELLAFRONTTE et al., 2011; SCHEMBERGER et al., 2011). No entanto, exceções ocorrem em populações de *A. affinis* do baixo rio Paraná (Argentina) e rio Paraguai, as quais apesar de apresentar número $2n = 54$, possuem cromossomos do tipo acrocêntrico (a) (JORGE e MOREIRA-FILHO, 2000; 2004). Variações de número cromossômico em Parodontidae também foram visualizadas em *A. piracicabae* coletados no rio Passa Cinco – SP, devido à presença de cromossomos B (FALCÃO et al., 1984). Em relação ao gênero *Saccodon* não há estudos citogenéticos descritos na literatura.

No que se refere ao sistema de cromossomos sexuais há tipos distintos nesta família, onde há espécies sem cromossomos sexuais diferenciados, outras com sistema sexual simples

do tipo ZZ/ZW e um caso de sistema sexual múltiplo do tipo ZZ/ZW₁W₂ (MOREIRA-FILHO et al., 1993; JESUS e MOREIRA-FILHO, 2000a; 2000b; VICENTE et al., 2001; CENTOFANTE et al., 2002; VICENTE et al., 2003; BELLAFRONTE et al., 2005; ROSA et al., 2006; VICARI et al., 2006; SCHEMBERGER et al., 2011).

A análise de mapeamento dos sítios de rDNA é uma importante ferramenta cromossômica que permite inferir sobre a evolução cariotípica, além de também contribuir com a citotaxonomia (VICARI et al., 2010). Os sítios de rDNA 18S, detectados por Ag-RONs e sonda de rDNA 18S por hibridação *in situ* fluorescente (FISH), localizam-se na região terminal do braço longo de um par cromossômico subteloentrico grande, em todas as espécies de *Apareiodon* já estudadas (MOREIRA-FILHO et al., 1984; 1985; JESUS e MOREIRA-FILHO, 2000a; ROSA et al., 2006; VICARI et al., 2006; BELLAFRONTE et al., 2009; 2011; 2012). Por outro lado, no gênero *Parodon*, as RONS têm se mostrado como caracteres espécie – específicos localizados em ambos os cromossomos metacêntricos/submetacêntricos (JESUS e MOREIRA-FILHO, 2000b; VICENTE et al., 2001; CENTOFANTE et al. 2002; BELLAFRONTE et al., 2005). O grupo irmão Anostomidae apresenta sítios de RON localizados na região terminal de um par meta/submetacêntrico na maioria das espécies (GALETTI et al., 1991), que é uma condição também encontrada nas espécies do gênero *Parodon*, com exceção de *Parodon nasus*. Assim, rearranjos cromossômicos podem ter ocorrido na diversificação cariotípica destas espécies (BELLEFRONTE et al., 2011). Sítios adicionais do rDNA 18S já foram detectados em cariótipos de *A. vittatus* e *A. ibitiensis* nas populações do rio São Francisco e do alto rio Paraná (BELLAFRONTE et al., 2009; 2011), que pode ter sido originado por eventos de dispersão de RONS por transposição ou associação com movimento da heterocromatina (MOREIRA-FILHO et al., 1984; SCHWEIZER et al., 1987; VICARI et al., 2008).

Em relação ao rDNA 5S, a localização próxima à região centromérica de um par submetacêntrico é a mais comumente verificada entre os parodontídeos (CENTOFANTE et al., 2002; VICARI et al., 2006; BELLAFRONTE et al., 2009), característica que é homóloga a encontrada na família Anostomidae (SCHEMBERGER et al., 2011). Sítios adicionais desta sequência com localizações variáveis ocorrem em algumas espécies do gênero *Parodon*, além da provável correspondência entre os sítios de rDNA 18S e 5S com heterocromatina GC-rica em alguns representantes da família (VICENTE et al., 2001; BELLAFRONTE et al., 2005; VICARI et al., 2006; BELLAFRONTE et al., 2009). A espécie *Parodon nasus* é a única que apresenta os rDNAs 5S e 18S sintênico, que provavelmente foi originado por um evento de translocação cromossômica quando analisados em comparação com o grupo irmão Anostomidade e as demais espécies de Parodontidae (BELLAFRONTE et al., 2011).

A heterocromatina constitutiva nos cromossomos de Parodontidae foi localizada nas regiões centroméricas e pericentroméricas e se apresenta como blocos bem evidentes, sendo também observadas marcações terminais em todas as espécies de Parodontidae analisadas (MOREIRA-FILHO et al., 1984; 1993, JESUS et al., 1999; JESUS e MOREIRA-FILHO, 2000a; JORGE e MOREIRA-FILHO, 2004; VICARI et al., 2006). A localização da heterocromatina constitutiva é imprescindível para identificação do sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW entre os parodontídeos. Nas espécies que possuem sistema ZZ/ZW o cromossomo Z apresenta pequenos blocos heterocromáticos, sendo um proximal e outro terminal no braço curto. O cromossomo W, por sua vez, sofreu um processo de heterocromatização e acúmulo de sequências repetitivas na diferenciação em relação ao cromossomo Z. A heterocromatização e o acúmulo de sequências do W ocorreram a partir de uma pequena região heterocromática proximal do braço curto presente no cromossomo Z, a qual, no cromossomo W diferenciado é maior e corresponde ao braço longo. Esta hipótese de diferenciação é utilizada para explicar a origem evolutiva do sistema ZZ/ZW presente em *P.*

hilarii, *P. moreirai* citado como *Parodon* sp., *A. vladii* citado como *Apareiodon* sp., *Apareiodon* sp. (rio Verde), *A. ibitiensis* (CENTOFANTE et al., 2002; VICENTE et al., 2003; ROSA et al., 2006; VICARI et al., 2006; BELLAFRONTE et al., 2009).

VICENTE et al. (2003) isolaram e identificaram uma família de DNA satélite em Parodontidae utilizando o método de restrição genômica do DNA de *P. hilarii*. Este DNA satélite, denominado pPh2004, foi identificado como uma sequência monomérica de 200 pb e 60 % rico em bases AT. A FISH, utilizando sonda deste satélite, evidenciou 16 sítios em autossomos, além de um sítio na região terminal do braço longo do cromossomo Z e um sítio na região terminal do braço curto do cromossomo W de *P. hilarii* (VICENTE et al., 2003). A sonda pPh2004 também foi localizada sobre os cromossomos de *Parodon moreirai* (CENTOFANTE et al., 2002) onde foram evidenciados os mesmos sítios encontrados nos cromossomos Z e W de *P. hilarii*, além de dois pequenos sítios adicionais nos autossomos. SCHEMBERGER et al. (2011) realizaram um mapeamento desta sonda por FISH sobre os cromossomos das espécies *P. nasus*, *P. pongoensis*, *P. moreirai*, *P. hilarii*, *A. ibitiensis*, *A. affinis*, *A. vladii*, *A. piracicabae*, e *Apareiodon* sp. O resultado obtido para *P. nasus* foi 10 sítios deste marcador, oito sobre os autossomos e dois sobre os proto-cromossomos sexuais; em *P. pongoensis* foram detectados dois sítios no par 13 (proto-cromossomo sexual); *P. moreirai* apresentou dois sítios autossômicos e nos cromossomos sexuais ZW; *P. hilarii* mostrou 14 sítios autossômicos e nos cromossomos sexuais ZW e; em *A. affinis* ocorreu a presença de seis sítios sobre autossomos. As demais espécies estudadas não apresentaram marcações deste DNA satélite, assim pode-se inferir que as espécies que possuem o DNA satélite pPh2004 divergiram mais recentemente e são mais relacionadas (BELLAFRONTE et al. 2011). Estudos realizados por SCHEMBERGER et al. (2011) com uso da FISH com esta mesma sequência repetitiva demonstrou que as espécies *A. affinis*, *P. moreirai*, *P. hilarii*, *P. nasus*, *P. pongoensis* apresentaram marcações no braço longo de um par metacêntrico

comparável, sendo este correspondente ao cromossomo Z das espécies com sistema de cromossomos sexuais e ao par de proto-cromossomos sexuais nas espécies sem sistema sexual, sugerindo a origem deste DNA satélite neste par cromossômico.

Sequências de DNAs repetitivos também foram obtidas dos cromossomos sexuais da família Parodontidae pela microdissecção do cromossomo W de *Apareiodon* sp. submetido ao bandamento C seguido de uma amplificação pela PCR, utilizando iniciadores degenerados (DOP-PCR – *Degenerated Oligonucleotide Primed – Polimerase Chain Reacton*) (VICARI et al., 2010). Esta porção de DNA repetitivo foi denominada de *WAp* e evidenciou um arrasto em gel de agarose entre 100 e 500 pb com uma intensidade maior em 250 pb. A utilização desta sonda na FISH evidenciou sítios em regiões terminais de alguns cromossomos do cariótipo de todas as espécies da família Parodontidae estudadas (*Apareiodon* sp., *A. ibitiensis*, *A. vladii*, *A. piracicabae*, *A. vittatus*, *A. affinis*, *P. hilarii*, *P. moreirai*, *P. nasus* e *P. pongoensis*) além de marcações nos cromossomos sexuais em *A. affinis* que apresenta sistema de cromossomo sexual do tipo ZZ/ZW_1W_2 e em todas as espécies com sistema de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW (SCHEMBERGER et al., 2011). As marcações da sonda *WAp* nos cromossomos Z e W das espécies com sistema ZZ/ZW corroboram com a hipótese de que houve um acúmulo de sequências repetitivas para a derivação do cromossomo W (CENTOFANTE et al., 2002; VICENTE et al., 2003; ROSA et al., 2006; VICARI et al., 2006), sendo esta sequência não exclusiva dos cromossomos sexuais uma vez que foram detectadas também marcações em regiões terminais de vários cromossomos autossômicos do cariótipo de todas as espécies analisadas (SCHEMBERGER et al., 2011).

Além disso, com os resultados obtidos com a sonda *WAp* pode-se inferir uma possível origem dos cromossomos sexuais por um evento de inversão de sequências *WAp* de regiões terminais para a região proximal do braço curto de um par metacêntrico, originando um par de cromossomos proto-sexuais (presente nas espécies *P. nasus* e *P. pongoensis*)

seguido de acúmulo destas sequências na origem do cromossomo W heteromórfico (SCHEMBERGER et al., 2011). O mapeamento desta sequência em conjunto com o DNA satélite pPh2004 nos cromossomos das espécies *P. hilarii*, *P. moreirai*, *P. nasus*, *P. pongoensis* e *A. affinis* propiciou também inferências de que o sistema de cromossomos sexuais múltiplos ZZ/ZW₁W₂ de *A. affinis* deve ter origem por translocação cromossômica entre os elementos cromossômicos de um par autossômico grande portador de sítios WAp terminal, possivelmente o primeiro par do cariótipo, e os cromossomos sexuais Z e W portadores de sítios pPh2004 e WAp, a partir de uma forma ancestral semelhante à encontrada em *P. hilarii*. Somente nestas duas espécies, o satélite pPh2004 foi encontrado também em um par metacêntrico homeólogo com marcações em ambas as regiões terminais (par cromossômico 2). Nesse modelo, uma translocação recíproca entre os cromossomos autossômicos e os cromossomos sexuais originaria um par de cromossomos portadores de sítios de DNA satélite pPh2004 na região terminal, sendo correspondente ao par 13 metacêntrico de *A. affinis*, e o outro par corresponderia aos cromossomos Z e W sem a presença de sequências de DNA satélite pPh2004 (SCHEMBERGER et al., 2011). O W ancestral por sua vez sofreria rearranjos do tipo fissão cêntrica, seguido de inversão pericêntrica originando os cromossomos W₁ e W₂, como proposto por MOREIRA-FILHO et al. (1993), porém de acordo com a origem de sistemas múltiplos a partir de sistemas simples (WHITE, 1973; SMITH e VIRKK, 1978; SCHNEIDER et al., 2006).

1.3 DNA repetitivo

Os DNAs repetitivos constituem grande porcentagem do genoma eucariótico consistindo de sequências que podem ser idênticas ou semelhantes, que se repetem diversas vezes podendo estar em tandem (em sequência) ou podem estar dispersas no genoma

(TIMBERLAKWE, 1978; SUMNER, 2003). Por muito tempo o DNA repetitivo foi considerado como DNA lixo (*junk DNA*), DNA egoísta (*selfish DNA*) ou DNA parasítico (*parasitic DNA*) (DOOLITTLE e SAPIENZA, 1980; ORGEL e CRICK, 1980; NOWAK, 1994) por falta de conhecimentos sobre suas funções. Atualmente, já se sabe que estas repetições possuem funções estruturais e organizacionais, na regulação de genes, rearranjos cromossômicos, replicação, reparo de DNA, diferenciação e regulação cromossômica, podendo também estar envolvido na causa de algumas doenças (SUMNER, 2003). Também possuem interesse especial em estudos de estrutura e função cromossômica, evolução, identificação de rearranjos cromossômicos, cromossomos supranumerários e cromossomos sexuais (KIDWELL e LISCH, 1997; KIDWELL, 2002; SUMNER, 2003).

O método utilizado tradicionalmente para isolar os DNAs repetitivos é por digestão de DNA genômico utilizando enzimas de restrição, e após sua localização cromossômica em uma grande soma de espécies podem ser utilizados como marcadores moleculares na perspectiva de entender os processos de evolução do DNA destas espécies. No entanto, atualmente, sequências repetitivas podem ser obtidas também por cinética de reassociação C_0t-1 e também por microdissecção de cromossomos submetidos ao bandamento C, seguido de amplificação das regiões heterocromática por DOP-PCR (VICARI et al., 2010).

1.3.1 DNA repetitivo em tandem

Os DNAs repetitivos em tandem são classificados de acordo com sua unidade de repetição, a qual varia em tamanho, onde maiores que 100 pb são denominadas de satélites clássicos, de 10-100 pb minissatélites e 2-6 pb microssatélites (SUMNER, 2003). Estes estão localizados em regiões centroméricas/pericentroméricas e ocasionalmente em regiões intersticiais e terminais dos cromossomos (CHARLESWORTH et al., 1994). A composição

deste DNA repetitivo pode variar de AT ricos ou GC ricos (BERIDZE, 1986). Incluso na classificação do DNA repetitivo em tandem há também as famílias multigênicas como as histonas e o DNA ribossômico (LONG e DAVID, 1980).

O DNA satélite está empacotado de forma densa ou inerte nas regiões de heterocromatina constitutiva (YUNIS e YASMINEB, 1971; PLOHL et al., 2008). Apesar do DNA satélite estar frequentemente relacionado à inatividade transcricional (BERIDZE, 1986), tem sido sugerido sua importância juntamente com proteínas específicas, nos processos da estabilidade da estrutura genômica, efeito de regulação gênica (ex. efeito de posição de variação), pareamento cromossômico e segregação atuando em função estrutural, assim como na investigação de variabilidade e diversidade genética envolvendo aspectos evolutivos (KURENOVA et al., 1998; O'CONNELL e WRIGTH, 1997; MONOD et al., 2002; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ et al., 2008; BUSSIEK et al., 2009).

Os mecanismos para explicar a origem do DNA satélite tem sido diversos, entre eles estão descritos na literatura a replicação saltatória (BRITTEN e KOHNE, 1966; 1968), o *crossing-over* desigual (SMITH, 1974) e origem por elementos transponíveis (HEIKKINEN et al., 1995). Na realidade, sabe-se atualmente que todos esses mecanismos podem atuar na origem e diversificação de famílias de DNA satélite.

Outra peculiaridade dos DNAs satélites é que estes podem estar organizados em sítios específicos de um par cromossômico. No entanto, na maioria das vezes, estas unidades de repetição evoluem em paralelo (DOVER, 1986), levando a uma homogeneização intra-específica entre as unidades repetitivas (UGARKOVIC e PLOHL, 2002). Esta distribuição cromossômica é reflexo do modo de evolução em concerto de sequências entre cromossomos não homólogos (PLOHL et al., 1992). Nestes casos, a dispersão intercromossômica seria mais rápida que as taxas de mutação e/ou homogeneização intracromossômica. Diante da dinâmica evolutiva extremamente variável dos DNAs satélites estes podem, de fato, prover informações

úteis tanto para estudos microevolutivos (no caso de DNAs satélites espécie específicos ou cromossomo específicos) (UGARKOVIC e PLOHL, 2002), como para estudos filogenéticos (onde um DNA satélite é compartilhado por algumas espécies em um determinado grupo) (PONS et al., 2002; PONS e GILLESPIE, 2003; KANTEK et al., 2009). No entanto, famílias de DNA satélite podem, paralelamente, permanecer conservadas ao longo do tempo por terem evolução lenta, mantidas por baixas taxas de mutação, com reflexo na homogeneização das sequências (DE LA HERRÁN et al., 2001).

Em peixes, DNAs satélites cromossomo específicos podem tornar-se marcadores citogenéticos úteis (SAITO et al., 2007), utilizados algumas vezes para compreender as relações filogenéticas entre diferentes táxons (DE LA HERRÁN et al., 2001; SAITO et al., 2007), esclarecer a citotaxonomia em complexos de espécies (MANTOVANI et al., 2004; VICARI et al., 2008b; KANTEK et al., 2009), evidenciar as prováveis origens de cromossomos supranumerários (MESTRINER et al., 2000; ZIEGLER et al., 2003; JESUS et al., 2003; ARTONI et al., 2006; VICARI et al., 2011) e na caracterização dos cromossomos sexuais (DEVLIN et al., 1998; 2001; MACHADO et al., 2011; SCHEMBERGER et al., 2011; PUCCI et al., 2013).

1.3.2 DNAs repetitivos dispersos

O DNA repetitivo disperso é composto pelos elementos transponíveis (TEs), os quais têm a capacidade de se moverem no DNA e estão presentes em grande abundância no genoma dos eucariotos (KIDWELL, 2002). Há uma grande diversidade destes elementos e eles são classificados em Classe I ou Classe II conforme o mecanismo de transposição. Os transposons de Classe I, também denominados de retrotransposons, dependem de um RNA intermediário

para moverem-se no genoma, enquanto que os de Classe II, ou elementos de DNA, movem-se diretamente no genoma (WICKER et al., 2007).

Há também subdivisões de classificação destes elementos (Figura 1), que são a subclasse, superfamília e família, além de outras. A Classe I apresenta a subclasse dos elementos com longas repetições terminais (LTR) e a subclasse não-LTRs as quais não apresentam as longas repetições terminais e estão inclusos os LINEs (*long interspersed nuclear element*) e SINEs (*short interspersed nuclear element*). Os LTRs geralmente codificam as enzimas *ap* (*aspartic proteinase*), *gag* (*capsid protein*), *rt* (*reverse transcriptase*), *rh* (*RNase H*) e *int* (*integrase*), e movem-se no genoma pelo mecanismo de transcrição em RNAm, conversão em DNA, o qual é uma molécula livre no meio celular, pela transcriptase reversa, seguido da inserção em um novo local (HAVECKER et al., 2004). Os elementos não-LTRs transpõe-se pelo mecanismo em que o RNA intermediário ancora-se ao DNA-alvo antes de ser transcrito em DNA, neste caso não há moléculas de DNA livres (OSTERTAG e KAZAZIAN, 2001).

Em relação à Classe II há duas superclasses as quais são distinguidas pelo número de fitas de DNA que são cortadas durante a transposição; na superclasse I estão inclusos os transposons caracterizados por apresentar as *terminal inverted repeats* (TIRs - repetições terminais invertidas) flanqueando a região interna com uma *open reading frame* (ORF -fase aberta de leitura) que codifica a enzima transposase a qual é responsável por mediar a transposição, o mecanismo de transposição pode ser replicativo em que há a duplicação de uma cópia ou conservativo que consiste somente em excisão e inserção em um novo local (HURST e WERREN, 2001). Na superclasse II estão presentes o *Helitron* que se replica pelo mecanismo *rolling-circle*, cortando somente uma fita de DNA e o *Maverik* que se move provavelmente por um mecanismo via excisão de uma fita de DNA seguido de uma

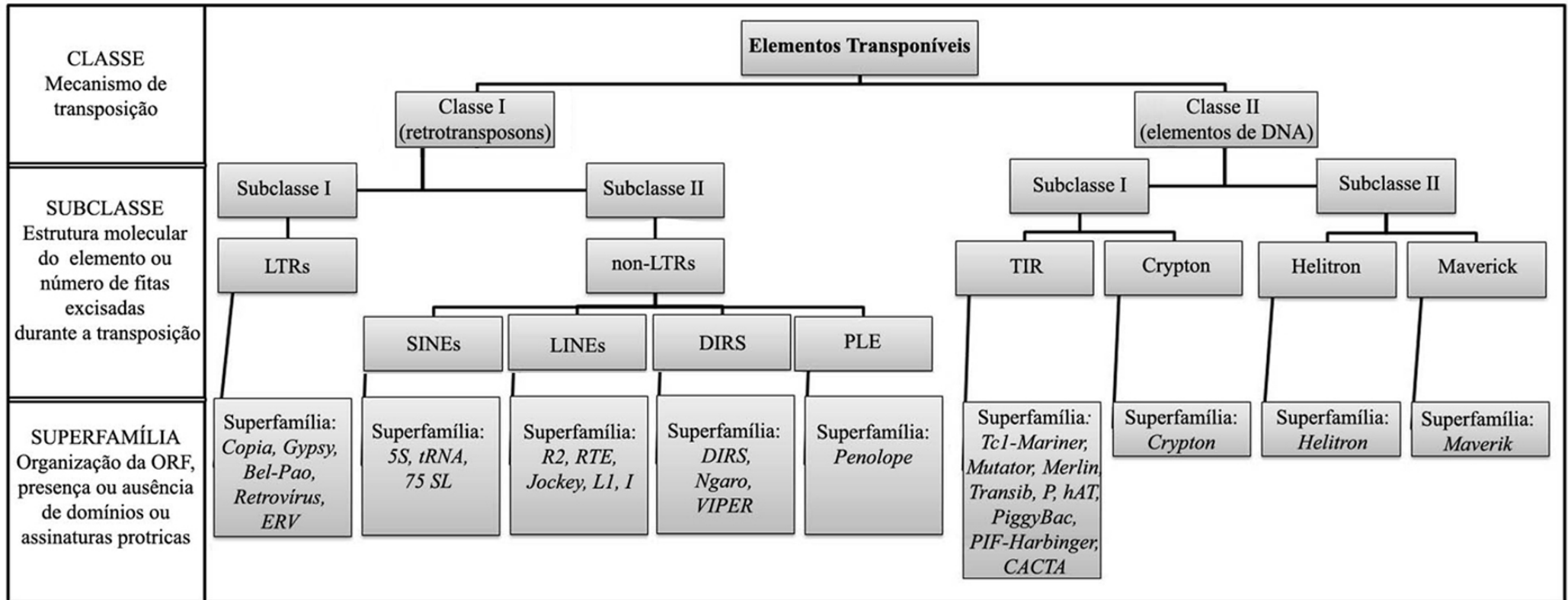


Figura 1 - Classificação dos elementos transponíveis segundo WICKER et al. (2007).

replicação extracromossômica e integração a um novo local. No nível das superfamílias os TEs são classificados de acordo com a organização da ORF e pela presença ou ausência de assinaturas e domínios proteicos, já as famílias são definidas pela conservação da sequência de DNA (WICKER et al., 2007).

Os TEs podem estar presentes como cópias autônomas que possuem toda a maquinaria enzimática necessária para sua mobilidade, ou como cópias não autônomas que necessitam das enzimas produzidas pelos autônomos para se transpor. Sob esse aspecto é importante destacar os elemento transponíveis miniatura (MITEs) que são elementos transponíveis de Classe II curtos (100-600 pb), não autônomos e compostos por sequências repetidas invertidas, os quais podem surgir por mutação e conseqüente degeneração de elementos TEs autônomos (WICKER et al., 2007). Estes são importantes para o processo de biogênese de sítios regulatórios, o elemento *Tourist*, por exemplo, está inserido em regiões que flanqueiam genes ou em introns no genoma de milho e cevada e parecem ter influência sobre genes (BUREAU e WESSLER, 1994).

A maioria dos TEs está presente nos genomas como cópias defectivas sem a capacidade de transposição e podem estar localizados tanto em regiões da heterocromatina como também na eucromatina próximos a genes, em regiões intergênicas ou nos introns (BIÉMONT et al., 1997). Além disso, eles são considerados como “parasitas” devido ao fato de que são uma das principais fontes de mutação podendo promover a inativação gênica e rearranjos cromossômicos, além de possuir a habilidade de induzir a recombinação desigual uma vez que por estarem presentes em várias cópias podem causar o pareamento incorreto cromossômico. Entretanto estudos tem demonstrado que muitos TEs podem adquirir novas funções no genoma do hospedeiro, que é chamado de processo de “domesticação”, “exaptação” ou “co-opção” molecular (MILLER et al., 1997). Neste sentido tem sido descrito

o ciclo de vida dos TEs que consiste na sua origem que pode ser por eventos de mutação ou recombinação de sequências presentes no genoma ou por meio de transferência horizontal, depois há o seu aumento de número de cópias, e inativação por processos de deterioração de TEs pelo acúmulo de mutações ou seu silenciamento causado por mecanismos epigenéticos do genoma do hospedeiro (FERNÁNDEZ-MEDINA et al., 2012). Então estes podem ser eliminados, permanecerem no genoma como fósseis ou, serem domesticados para novas funções que são benéficas para o hospedeiro.

Esta nova visão da importância dos TEs para o genoma tem sido evidenciada pelo fato de que: há a presença de sequências de transposons em regiões gênicas; a inserção destes elementos está presente por tempo suficiente para ser fixada; alguns TEs podem participar da regulação de genes próximos (MARIÑO-RAMIREZ et al., 2005 para revisão); estruturas palíndromos de alguns MITEs podem evoluir em genes de microRNAs (FESCHOTTE e PRITHAM, 2007). Em humanos, por exemplo, aproximadamente 25% dos promotores contêm sequências de TE derivadas (JORDAN et al., 2003). Adicionalmente, a origem do sistema imune de vertebrados parece ter sido a partir do elemento *Transib*, outro estudo tem relatado também que a família FAR1/FHY3 de fatores de transcrição em plantas tem um específico domínio de ligação de DNA na região N-terminal que é conservada na transposase codificada pelo elemento *MULE*, além disso, o gene SETMAR dos primatas foi possivelmente originado de uma fusão transcricional do domínio SET com uma transposase do transposon *Mariner* (FESCHOTE, 2008).

Em peixes, apesar de poucos estudos com TEs, tem sido relatado que há uma maior diversidade destes elementos do que a encontrada em mamífero e aves. É importante destacar que uma abordagem mais ampla destes elementos tem sido realizada principalmente nas espécies com genomas sequenciados que são: *Takifugu rubripes*, *Tetraodon nigroviridis*, *Danio rerio* e *Oryzias latipes*. Em relação ao mapeamento físico dos transposons, os estudos

têm se restringido a 15 elementos no genoma de 32 espécies, sendo os retrotransposons melhores estudados. O elemento do grupo REX (retrotransposons não-LTRs caracterizados do genoma do peixe *Xiphophorus*) esta presente em 28 espécies estudadas, sendo que em 11 espécies eles estão presentes na região heterocromática e nas outras 17 eles estão dispersas pelo genoma. Interessantemente há o envolvimento do REX juntamente com o elemento de Classe II *Tc1-Mariner* no processo de diferenciação de cromossomos sexuais de *Chionodraco hamatus*, outros dados na literatura relacionados com esse evento tem sido descrito para a espécie *Oreochromis niloticus* (FERREIRA et al., 2011). Na família Parodontidae ainda não há descrição na literatura sobre os TEs.

Devido sua natureza egoísta e parasítica o movimento e a acumulação dos TEs são visualizados com uma forte influência na trajetória evolutiva dos genomas hospedeiros (FESCHOTTE e PRITHAM, 2007). Inúmeras vias tem demonstrado que os TEs podem influenciar a regulação da expressão gênica, tanto no nível transcricional com pós-transcricional (FESCHOTTE, 2008). Desta forma, foi postulado que a inserção de TEs nas vizinhanças ou domínios das sequências cis regulatórias provavelmente contribuem para o estabelecimento de padrões de linhagens específicas da expressão gênica (MARINO-RAMIREZ e JORDAN, 2006). Em adição para a doação de elementos cis regulatórios está a criação de novas redes regulatórias. Assim, o movimento e o acúmulo de TEs têm sido propostos para participar da reestruturação de redes de regulação gênica pré-estabelecidas. No peixe medaka, o qual possui determinação sexual pela ação do gene DMY foi verificado que o promotor deste gene sofreu invasão de elementos transponíveis. Neste caso, estes elementos transponíveis forneceram uma nova rota regulatória por carrear sequências para a ligação de fatores de transcrição (HERPIN et al., 2010).

Neste aspecto, associar a caracterização de genes que auxiliam na determinação sexual e suas regiões promotoras, bem como, a composição dos DNAs repetitivos é de suma

importância para novas informações sobre a função destes genes e DNAs repetitivos em peixes Neotropicais.

1.4 Cromossomos sexuais

Os mecanismos de diferenciação cromossômica do sexo podem ser do tipo ZW com heterogametia feminina ou XY com heterogametia masculina. Nos mamíferos a fêmea geralmente possui os cromossomos sexuais homomórficos (XX) e os machos são heterogaméticos (XY). Esta situação é inversa para as aves e cobras em que a maioria das espécies apresenta sistema sexual do tipo ZZ/ZW (CLARK e WALL, 1996). Os anfíbios apresentam tanto sistema do tipo ZZ/ZW como XX/XY, além daqueles sem sistema de cromossomos sexual diferenciado (CLARK e WALL, 1996). Os mecanismos cromossômicos de diferenciação do sexo em peixes são variados e incluem sistemas de cromossomos sexuais simples (XX/XY e ZZ/ZW) somados aos sistemas de cromossomos sexuais múltiplos originados através de vários mecanismos, como por exemplo, de translocação X-autossomo, Y-autossomo e fissão cêntrica, tais como: XX/XY_1Y_2 , $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ e ZZ/ZW_1W_2 , respectivamente (MOREIRA-FILHO et al., 1993; ALMEIDA-TOLEDO et al., 2000; ALMEIDA-TOLEDO e FORESTI, 2001), entretanto a maioria das espécies de peixes não apresenta cromossomos sexuais diferenciados citogeneticamente (VICENTE et al., 2003).

Os cromossomos sexuais surgem a partir de um par de autossomos que passa por uma intensa diferenciação. O primeiro passo para que esta diferenciação ocorra é a supressão da recombinação entre homólogos (NEI, 1969). Este evento faz com que os cromossomos Y ou W derivados percam genes que antes estavam presentes em cromossomos ancestrais homólogos ao X e Z respectivamente (proto-cromossomos sexuais), ou seja, ocorre uma degeneração genética (CHALESWORTH e CHALESWORTH, 2000). Em relação ao decréscimo da função dos locos localizados na região heteromórfica dos cromossomos

sexuais tem-se a hipótese de Müller em que a degeneração do Y é a consequência de sua permanente heterozigosidade (MÜLLER, 1932). A degeneração do Y é caracterizada por dois principais fenômenos: (1) a mudança de regiões eucromáticas em estrutura de heterocromatina, e (2) a erosão da atividade gênica do Y. Em mamíferos somente poucos genes ligados ao X tem homologia com os genes ligados ao Y e vários genes ligados ao Y não tem homologia com aqueles ligados ao X (LAHN et al., 2005).

Vários são os mecanismos que podem ocasionar a supressão da recombinação cromossômica, dentre eles estão os gênicos, a heterocromatização e processos de rearranjos cromossômicos (CHALESWORTH et al., 2005). A seleção para genes que reduzem a recombinação pode ser um dos fatores iniciais, mas outros efeitos são mais significativos (CLARK e WALL, 1996). Mudanças conformacionais como a heterocromatização, originada tanto pela inserção de elementos transponíveis como também pela duplicação de sequências repetitivas, ocasionam um padrão de replicação tardio em relação ao seu homólogo (CHALESWORTH et al., 2005). De fato a presença de regiões heterocromáticas nas proximidades da região de determinação do sexo do cromossomos Y favorece a ausência ou baixa frequência de recombinação (NANDA et al., 2000).

Mudanças cromossômicas estruturais como inversões peri/paracêntricas aumentam o isolamento gênico entre homólogos e por consequência supressão da recombinação favorecendo surgimento de cromossomos sexuais diferenciados (CHALESWORTH et al., 2005). Sabe-se atualmente que todos esses processos podem agir em conjunto para a diferenciação dos cromossomos sexuais. Estudos com mamíferos, por exemplo, têm evidenciado que o *crossing over* tem sido suprimindo tanto por eventos em pequena escala como as inversões, como também por inserções de elementos transponíveis (MARIAS e GALTIER, 2003).

Muitos estudos têm sido realizados sobre a temática dos cromossomos sexuais devido a sua importância principalmente no que diz respeito à evolução. Mapeamentos comparativos de genes entre humanos e aves revelam que humanos com sistema XX/XY e aves com sistema sexual ZZ/ZW não possuem homologia (NANDA et al., 1999), sugerindo que os cromossomos sexuais em mamíferos e aves foram derivados em diferentes pares de autossomos de um ancestral comum (MATSUBARA et al., 2006). Em relação aos peixes, tem sido relatado na literatura muitos casos de evolução independente dos cromossomos sexuais, resultando em distintos sistemas de cromossomos sexuais (ARTONI e BERTOLLO, 2002; MACHADO et al., 2011; SCHEMBERGER et al., 2011).

Sequências repetitivas sexo-específicas já foram isoladas e mapeadas nos cromossomos de diversas espécies de peixes, incluindo *Leporinus elongatus* (NAKAYAMA et al., 1994), *Chionodraco hamatus* (CAPRIOLIONE et al., 1994), *Poecilia reticulata* (NANDA et al., 1990), *Oncorhynchus tshawytscha* (DEVLIN et al., 1991; STEIN et al., 2001), *Hoplias malabaricus* (BORN e BERTOLLO, 2000), gênero *Triporthus* (ARTONI e BERTOLLO, 2002), *Salvelinus namaycush* (STEIN et al., 2002) e *Oreochromis niloticus* (HARVEY et al., 2002; EZAZ et al., 2004). Entretanto pouco se sabe sobre sequências gênicas de determinação do sexo neste grupo, estudos demonstram alguns genes candidatos como o *Dmrt1* isolado da espécie *Odontesthes bonariensis* e *DMY* que é um homólogo do *Dmrt1* presente na espécie *Orzyas latipes* (MATSUDA et al., 2002; LUFFALA et al., 2003; FERDINANDINO et al., 2006).

2. JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS

As espécies da família Parodontidae apresentam um número conservado de $2n=54$ cromossomos, com espécies homomórficas em relação ao sexo ao lado de outras com sistema de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW e ZZ/ZW₁W₂ (BELLAFRONTTE et al., 2011; SCHEMBERGER et al., 2011). As sequências de DNA repetitivo atualmente têm sido extensivamente utilizadas como marcadores cromossômicos para estudos evolutivos de espécies, identificação de rearranjos cromossômicos, identificação e evolução de cromossomos sexuais e também pesquisas sobre sua atuação na regulação gênica, entre outros (DELVIN et al. 2001; SAITO et al., 2007; VICARI et al., 2008; KANTEK et al, 2009; MARGUERON e REINBERG, 2010; VICARI et al., 2010).

Na família Parodontidae foram isoladas as sequências de DNA repetitivo pPh2004 e WAp. Os resultados obtidos por FISH utilizando ambas as sondas puderam esclarecer diversos aspectos relacionados à evolução do DNA satélite pPh2004 e dos cromossomos sexuais na família Parodontidae (SCHEMBERGER et al, 2011). Nesse contexto, o reconhecimento e caracterização de outras famílias de DNA repetitivo, tanto em tandem como dispersas, assim como a busca de sequências sexo específicas são importantes para análises evolutivas e para o entendimento do papel do DNA repetitivo no genoma e evolução dos cromossomos sexuais da família Parodontidae.

Assim, o objetivo geral do presente estudo foi:

a) Isolar e avaliar o papel genômico de famílias de DNAs repetitivos em peixes da família Parodontidae;

Para isto, foram propostos os seguintes objetivos específicos:

a) Obtenção de DNAs repetitivos de espécies da família Parodontidae por cinética de renaturação (C_0t-1);

b) Obtenção, caracterização e inferência do papel genômico do elemento transponível Tc1-Mariner;

c) Clonagem das sequências obtidas para a identificação e formação de biblioteca de DNA repetitivo da família Parodontidae;

d) Citogenética e mapeamento citogenético das sequências dos DNAs repetitivos obtidos no presente estudo, e também *WAp*, *pPh2004* e *rDNA* sobre cromossomos de exemplares da família Parodontidae.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material e Locais de coleta

Foram estudadas citogeneticamente espécies de peixes da família Parodontidae das bacias do alto rio Paraná, São Francisco, Iguaçu, Araguaia e Paraguai (Figura 1). O material cromossômico foi obtido de espécies coletadas da natureza (Licença permanente para coleta de material zoológico MMA/IBAMA/SISBIO: 15117-1) por rede de arrasto ou tarrafas; ou a partir do banco de preparações cromossômica do laboratório de citogenética da Universidade Federal de São Carlos. Os procedimentos foram de acordo com o Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Ponta Grossa (Protocolo CEUA: 07/2011). As espécies de Parodontidae estudadas estão listadas na Tabela 1.

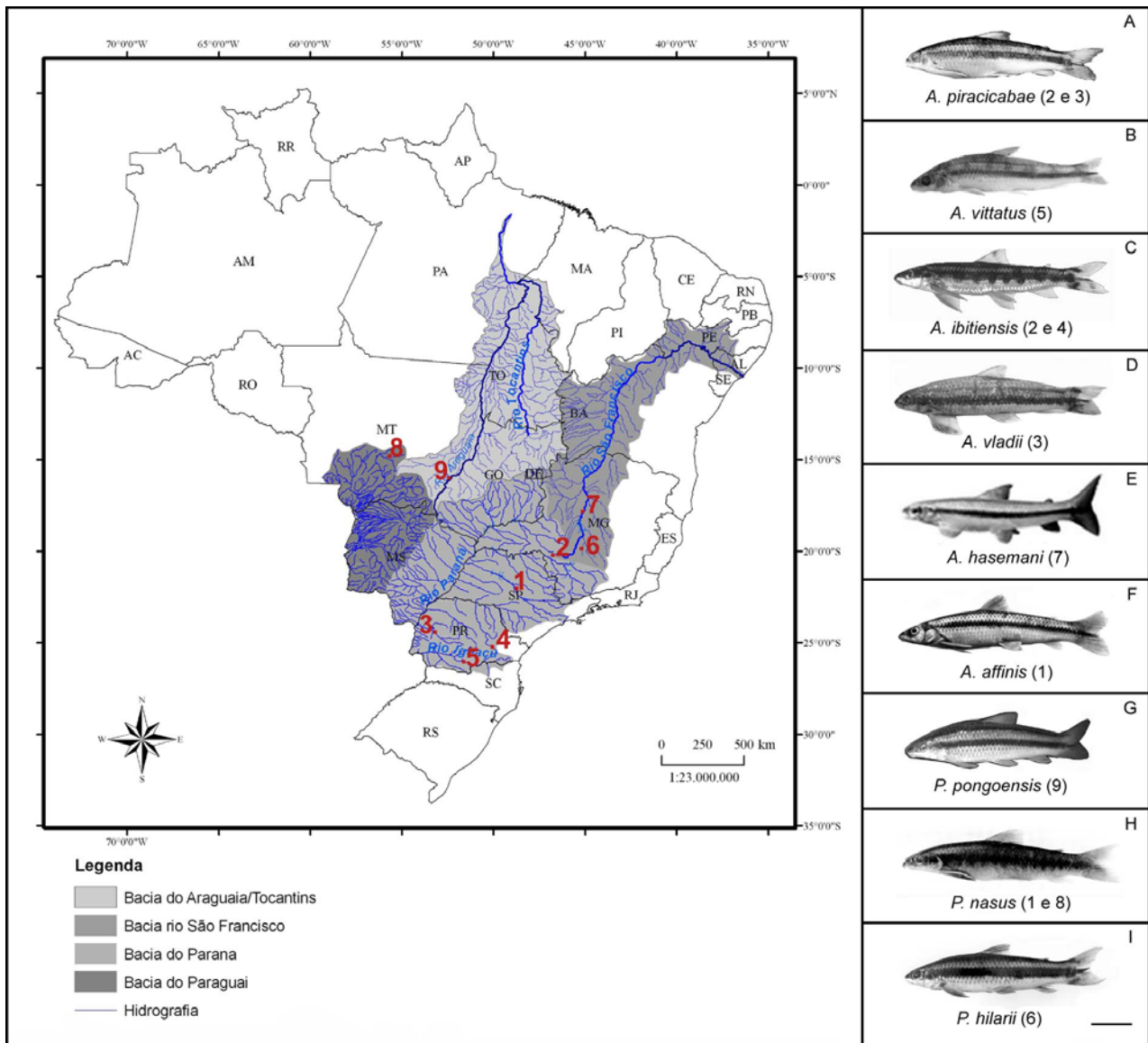


Figura 1 - Mapa hidrográfico do Brasil, mostrando a distribuição das espécies de Parodontidae. Em (1) rio Passa-Cinco - SP; (2) rio Piumhi – MG; (3) rio Piquiri - PR; (4) rio Tibagi – PR; (5) rio Jordão – PR; (6) Córrego do Porta – MG; (7) rio São Francisco - MG; (8) rio Paraguai – MT; (9) rio Taquaralzinho – MT. Ao lado as espécies estudadas numeradas de acordo com a sua localização nas bacias. Fotos: (A) PAVANELLI, 2006; (B) SCHEMBERGER, 2009; (C) VICARI et al., 2006; (D) ROSA et al., 2006; (E) NOREN, 2013; (F) JESUS et al., 1999; (G) CENTOFANTE et al., 2002; (H) VICENTE, et al., 2003; (I) HOOKER. Barra=2 cm.

Tabela 1: Pontos de amostragem, distribuição nas bacias e número de espécies utilizadas.

Espécies	Rio (Estado)	Bacia hidrográfica	Localização (GPS)	Nº ♂	Nº ♀
<i>A. piracicabae</i>	Rio Piumhi (MG)	São Francisco	-20°31'55" e -46°02'42"	5	3
<i>A. vittatus</i>	Rio Jordão (PR)	Iguaçu	-25°42'31" e -51°53'53"	2	2
<i>Apareiodon</i> sp.	Rio Verde (PR)	Alto Paraná	-25°04'35" e -50°04'03"	10	15
<i>A. vladii</i>	Rio Piquiri (PR)	Alto Paraná	-25°01'40" e -52°27'32"	4	5
<i>A. hasemani</i>	Rio São Francisco (MG)	São Francisco	-17°21'17" e -44°57'18"	2	2
<i>A. affinis</i>	Rio Passa-Cinco (SP)	Alto Paraná	-22°25'26" e -47°41'56"	7	5
<i>P. pongoensis</i>	Rio Taquaralzinho (MT)	Araguaia	-15°53'28" e -52°14'56"	4	5
<i>P. nasus</i>	Rio Paraguai (MT)	Paraguai	-15°34'40" e -56°09'58"	6	3
<i>P. hilarii</i>	Córrego do Porta (MG)	São Francisco	-17°21'17" e -44°57'15"	9	12

3. 2 Métodos

As preparações mitóticas das espécies de Parodontidae foram obtidas pela técnica de “*air drying*” conforme descrito por BERTOLLO et al. (1978) (Anexo I). A hibridação *in situ* fluorescente foi realizada de acordo com protocolo PINKEL et al. (1986) (Anexo II), onde foram utilizadas as sondas WAp (VICARI et al., 2010), pPh2004 (VICENTE et al. 2003), rDNA 18S (HATANAKA e GALETTI Jr, 2004), rDNA 5S (MARTINS e GALETTI Jr, 1999), DNAs repetitivos obtidas pelo C_ot-1, e do elemento transponível Tc1-Mariner obtido por PCR. A marcação das sondas foi realizada por “*nick translation*” ou “*degenerated oligonucleotide primed – polymerase chain reaction*” (DOP-PCR) seguindo instruções do fabricante (Anexo III). O DNA genômico foi extraído pelo método utilizando o tampão CTAB (MURRAY e THOMPSON, 1980) (Anexo IV). Para a obtenção dos DNAs repetitivos foi utilizada a técnica do C_ot-1 descrita por ZWICK et al. (1997) (Anexo V), e também a PCR onde foi utilizado primer desenhado a partir da região da TIR do elemento Tc1-Mariner da espécie *Takifugu rubripes* (SMIT, 2002) (Anexo VI). A clonagem dos fragmentos obtidos pelo C_ot-1 foi realizada de acordo com instruções do Kit de clonagem RPN5110 no vetor pMOSblue Blunt ended (Amershan Bioscience[®]); e das sequências do elemento Tc1-Mariner foi realizado de acordo com kit do vetor pTZ57R/T (Fermentas[®]) (Anexo VII). Os clones positivos foram sequenciados pelo Serviço de Sequenciamento Ludwig Biotec LTDA utilizando o sequenciador automático ABI-PRISM Genetic Analyzer armado com capilares de 50 cm e polímero POP6 (Applied Biosystems[®]). A análise das metáfases foi realizada em microscópio de epifluorescência Olympus BX41[®]. As imagens cromossômicas foram capturadas com a utilização do software DP Controller 3.2 (Olympus). Os cromossomos foram organizados em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm) e subtelocêntricos (st),

dependendo da razão de braços (LEVAN et al., 1964), e arrançados em decréscimo de tamanho nos respectivos cariótipos.

A análise das sequências obtidas por C_0t-1 foi realizada utilizando CENSOR online software (JURKA et al., 2005), RepeatMasker (<http://www.repeatmasker.org>) e BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para identificação de similaridades com sequências depositadas em banco de dados. As sequências obtidas por PCR do elemento Tc1-Mariner foram analisadas utilizando: CENSOR online software (JURKA et al., 2005), RepeatMasker (<http://www.repeatmasker.org>) e BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para identificação de similaridades com sequências depositadas em banco de dados; MUSCLE (EDGAR, 2004) para o alinhamento; software Geneious 4.8.5 (DRUMMOND et al., 2009) e banco de dados Pfam (FINN et al., 2010) para identificação de domínios proteicos; o MUST (<http://csbl1.bmb.uga.edu/ffzhou/MUST/>) foi utilizado para identificação de MITES; a similaridade entre as sequências foi realizada pelo programa EMBOSS Plotcon (<http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/plotcon>); o número de substituições de base por sítio entre as sequências foram calculadas usando o MEGA 5.0 (TAMURA et al., 2011); e as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa estatístico Sistema R (<http://www.Rproject.org>). As sequências serão depositadas por ocasião da publicação no banco de dados do Genetic Information Research Institute (<http://www.girinst.org/>) e do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

4. RESULTADOS

Os resultados estão organizados na forma de artigo em três capítulos:

4.1 Capítulo I: *Sex chromosome system ZZ/ZW in *Apareiodon hasemani* Eigenmann, 1916*

(*Characiformes, Parodontidae*) and a derived chromosomal region. De autoria: Elisângela Bellafronte, Michelle Orane Schemberger, Roberto Ferreira Artoni, Orlando Moreira Filho e Marcelo Ricardo Vicari. Publicado na *Genetics and Molecular Biology*, v.35, p. 770-776, 2012.

4.2 Capítulo II: Caracterização e construção de biblioteca de DNAs repetitivos em *Parodontidae* (Actinopterygii; Characiformes): uma abordagem genômica e evolutiva

4.3 Capítulo III: Perda de identidade e exaptação molecular do elemento transponível Tc1-Mariner em genomas de peixes (Teleostei: *Parodontidae*)

4.1 Capítulo I: Sex chromosome system ZZ/ZW in *Apareiodon hasemani* Eigenmann, 1916 (Characiformes, Parodontidae) and a derived chromosomal region

Genetics and Molecular Biology, 35, 4, 770-776 (2012)

Copyright © 2012, Sociedade Brasileira de Genética. Printed in Brazil

www.sbg.org.br

Sex chromosome system ZZ/ZW in *Apareiodon hasemani* Eigenmann, 1916 (Characiformes, Parodontidae) and a derived chromosomal region

Elisangela Bellafronte¹, Michelle Orane Schemberger², Roberto Ferreira Artoni², Orlando Moreira Filho¹ and Marcelo Ricardo Vicari²

¹Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brazil.

²Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, PR, Brazil.

Abstract

Parodontidae fish show few morphological characteristics for the identification of their representatives and chromosomal analyses have provided reliable features for determining the interrelationships in this family. In this study, the chromosomes of *Apareiodon hasemani* from the São Francisco River basin, Brazil, were analyzed and showed a karyotype with $2n = 54$ meta/submetacentric chromosomes, and a ZZ/ZW sex chromosome system. The study revealed active NORs located on pair 11 and additional 18S rDNA sites on pairs 7 and 22.

The 5S rDNA locus was found in pair 14. It showed a pericentric inversion regarding the ancestral condition. The satellite DNA pPh2004 was absent in the chromosomes of *A. hasemani*, a shared condition with most members of *Apareiodon*. The WAp probe was able to detect the amplification region of the W chromosome, corroborating the common origin of the system within Parodontidae. These chromosomal data corroborate an origin for the ZW system of Parodontidae and aid in the understanding of the differentiation of sex chromosome systems in Neotropical fishes.

Keywords: cytogenetics, FISH, 18S rDNA, 5S rDNA, Neotropical fishes.

Received: June 21, 2012; Accepted: September 5, 2012.

Introduction

Fishes are the largest group of vertebrates, with a wide variety of adaptive responses to diversified aquatic habitats and ecological limitations. Also with respect to sex determination, fishes exhibit much variety. Unlike the situation in most vertebrates, where the male and female sexes are represented by two different individuals (gonochorism), hundreds of fish species are known to be hermaphroditic (Devlin and Nagahama, 2002; Scharl, 2004).

Sex chromosomes are fundamental in many vertebrate species for the development of either a male or a female (Livernois et al., 2012). Few species of fish are carriers of heteromorphic chromosomal systems when compared to the enormous taxa diversity (Oliveira et al., 2007). However, fishes have a remarkable variety of sex determination chromosome systems (XY, X0, X₁X₂Y, XY₁Y₂, ZW, Z0, ZW₁W₂, Z₁Z₁Z₂Z₂/Z₁Z₂, W₁W₂, WXZ) (Moreira-Filho et al., 1993; Devlin and Nagahama, 2002; Oliveira et al., 2008), in which the ZZ/ZW

simple system with female heterogamety is the most frequent one among Neotropical fishes (Artoni and Bertollo, 2002; Bellafronte et al., 2011; Machado et al. 2011).

The family Parodontidae occurs throughout South America and its species are classified in three genera: *Parodon*, *Apareiodon* and *Saccodon* (Pavanelli, 2003). Generally they are robust fish, with strong pectoral, ventral and caudal fins, a fusiform body, and a dorsal profile which is more arched than the ventral one (Travassos, 1957). Parodontidae taxonomy is controversial because the family members lack diagnostic morphological traits that are sufficiently reliable for accurate phylogenetic analysis (Pavanelli and Britski, 2003; Ingenito LFS, 2008, Ph.D Thesis, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil). Ingenito argued that existing morphological phylogenetic evidence for the genus *Apareiodon* is insufficient to support its maintenance, and that *Apareiodon* should be regarded as a junior synonym of *Parodon*.

Cytogenetic analyses of both *Parodon* and *Apareiodon* revealed a conserved diploid number of 54 chromosomes, but with remarkable heterogeneity in the distribution of heterochromatin, NOR activity, number and location of 18S rDNA, 5S rDNA and satellite DNA family sites, and morphologically differentiated sex chromosome systems (for a review see Bellafronte et al., 2011). From the Parodontidae species that have been cytogenetically analyzed, six have sex chromosomes: ZZ/ZW₁W₂ for *Apareiodon affinis* Steindachner, 1879, and ZZ/ZW for *Parodon hilarii* Reinhardt, 1867, *Parodon moreirai* Ingenito & Buckup, 2005, *Apareiodon vladii* Pavanelli, 2006, *Apareiodon* sp. and *Apareiodon ibitiensis* Campos, 1944 (Moreira-Filho et al., 1980, 1993; Centofante et al., 2002; Vicente et al., 2003; Rosa et al., 2006; Vicari et al., 2006; Bellafronte et al., 2009).

In Parodontidae, satellite DNA has great importance for the understanding of karyotype differentiation. So far, two satellite DNAs have been described for this fish group: pPh2004 (Vicente et al., 2003) and WAp (Schemberger et al., 2011). The physical mapping of

the pPh2004 sequence showed that this satellite DNA is present on chromosomes Z and W (also on autosomal chromosomes); however, it is not a part of the heterochromatic amplified region of the W chromosome heteromorphism (Bellafronte et al., 2011). The WAp satellite DNA probe is capable of detecting the amplification region and the chromosome W heteromorphism, corroborating the common origin of this system in Parodontidae, apart from homologies to other chromosome sites (Schemberger et al., 2011).

The integrated analysis of chromosomal markers has also allowed to deduce the chromosomal differentiation of the family, which is organized in: (i) species without morphologically differentiated sex chromosomes (*Apareiodon piracicabae* Eigenmann, 1907 and *Apareiodon vittatus* Garavello, 1977), (ii) species with differentiated sex chromosomes and without satellite DNA pPh2004 (*A. ibitiensis*, *Apareiodon* sp., *A. vladii*), and (iii) species with proto sex chromosomes and/or heteromorphic sex chromosome systems and presence of satellite DNA pPh2004 (*A. affinis*, *P. hilarii*, *P. moreirai*, *Parodon nasus* Kner, 1859 and *Parodon pongoensis*, Allen, 1942) (Schemberger et al., 2011).

Based on these data, the present study aimed at characterizing the species *Apareiodon hasemani* Eigenmann, 1916 (from the São Francisco River basin, Brazil) with respect to chromosome number, morphology, banding, sex system, presence or absence of certain molecular cytogenetic markers, as well as to establish karyoevolutionary relationships based in other cytogenetic studies performed in the family Parodontidae.

Materials and Methods

Chromosome studies were carried out in 18 specimens (7 males and 11 females) of *A. hasemani*, collected in the main channel of the São Francisco River, in Pirapora city, state of Minas Gerais, Brazil (17°21'17.47" S and 44°57'18.45" W). The analyzed samples were

deposited in the Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (Nupelia), Universidade Estadual de Maringá, Brazil, with voucher number NUP11512. Samples were collected in compliance with the Ethics Committee on Animal Experimentation (Process CEUA 07/2011) of the Universidade Estadual de Ponta Grossa, Brazil) and with authorization to collect the biological material (Brazilian Federal license: Ministério do Meio Ambiente/Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis MMA/IBAMA/SISBIO number 10538-1) and the Instituto Estadual de Florestas de Minas Gerais.

Mitotic chromosomes were obtained from the anterior kidney, according to the methodology described by Bertollo et al. (1978). The heterochromatin was detected using the methodology of C-banding (Sumner, 1972). C banded chromosomes were stained with propidium iodide (50 g mL⁻¹) according to Lui et al. (2009). The nucleolar organizer regions were detected using the silver nitrate method (Ag-NOR) described by Howell and Black (1980).

Fluorescence in situ hybridization (FISH) experiments were performed in the Parodontidae specimens using probes for 18S rDNA (Hatanaka and Galetti Jr, 2004), 5S rDNA (Martins and Galetti Jr, 1999), pPh2004 satellite DNA (Vicente et al., 2003) and *WAp* satellite DNA (Schemberger et al., 2011). The 18S rDNA, 5S rDNA and pPh2004 cloned probes were labeled with biotin or digoxigenin via PCR, using plasmid vector primers (T7 promoter and M13 reverse). The PCR amplification was done with: 20 ng of template DNA, 1X reaction buffer, 2 mM MgCl₂, 40 μM dATP, dGTP and dCTP, 28 M dTTP, 12 μM biotin 16-dUTP, or digoxigenin 11 dUTP (Roche Applied Science), 0.3 μM each primer and 1 U Taq DNA Polymerase (Invitrogen). The *WAp* probe was labeled via degenerate oligonucleotide-primed polymerase chain reaction (DOP-PCR), using 11-dUTP- digoxigenin (Roche Applied Science). This PCR amplification was done with: 100 ng of template DNA,

1X reaction buffer, 2 mM MgCl₂, 40 μM dATP, dGTP and dCTP, 28 μM dTTP, 12 μM 11-dUTP-digoxigenin, 2 M DOP primer, and 1 U Taq DNA polymerase (Invitrogen). The FISH procedure was performed under high stringency conditions (2.5 ng/ L probe, 50% formamide, 2 x SSC, 10% dextran sulfate) following the methodology described by Pinkel et al. (1986). The signal was detected using the anti-streptavidin antibody conjugated to Alexa Fluor 488 (Invitrogen) and an anti-digoxigenin antibody conjugated to rhodamine (Roche Applied Science). The chromosomes were counterstained with DAPI (0.2 g/mL), covered with Vectashield mounting medium (Vector) and analyzed with the aid of an Olympus BX41 epifluorescence microscope equipped with a DP71 digital image capture system (Olympus).

Chromosomes were identified based on the system proposed by Levan et al. (1964) and classified as metacentric (m), submetacentric (sm), or subtelocentric (st).

Results

The species *A. hasemani* showed $2n = 54$ meta-submetacentric chromosomes, with a fundamental number equal to 108 for both sexes (Figure 1). However, a heteromorphism in size and morphology was observed for chromosome pair 4, restricted to females, which had a medium-sized submetacentric chromosome (Z) and a large metacentric chromosome (W) (Figure 1). The C-banding technique revealed centromeric heterochromatin regions in some chromosomes, as well as interstitial and terminal bands (Figure 1b and 1d). The ZZ pair showed centromeric and terminal C-bands on both chromosome arms. In all metaphases of females, the W chromosome had similar centromeric and terminal heterochromatin bands on the long arm, when compared to the Z chromosome. The heterochromatin segments, however, occupied almost the entire short arm of the W chromosome, being twice as large as in the Z chromosome (Figure 1b, d). The nucleolar organizer regions stained with silver (Ag-NORs)

showed terminal signals on the long arm of one chromosome pair, pair 11, which was subtelocentric (Figure 2, box), while FISH with 18S rDNA probes showed up to five terminal signals on the long arm of pairs 11 (larger and more evident marks), 7 and 22 (smaller in size), and all these signals generally coinciding with GC-rich regions (Figure 2a). FISH with 5S rDNA probes showed only one marked pair, located in the interstitial region of the long arm of chromosome pair 14 (Figure 2a). *Apareiodon hansemani* did not show pPh2004 satellite DNA sites (data not shown), but WAp satellite DNA sites were found in the terminal regions of some chromosomes of the karyotype (Figure 2b). The Z chromosome showed the satellite DNA WAp in the terminal region of the short and long arms and in the proximal region of the short arm (Figure 2b). In turn, the W chromosome also showed a WAp amplification from the proximal region of the short arm (Figure 2b).

Discussion

Karyotype analyses of *Apareiodon hansemani* (Figure 1) show a diploid number of 54 chromosomes, similarly to other species of Parodontidae, except for the population of *A. affinis* from the Upper Paraná River basin (Moreira-Filho et al., 1980), which has $2n = 54/55$ chromosomes. The chromosome morphology of *A. hansemani* consists mainly of meta-submetacentric chromosomes, a characteristic shared with *A. affinis* (Moreira-Filho et al., 1980), *P. hilarii* (Moreira-Filho et al., 1993) and *P. moreirai* (Centofante et al., 2002). In addition to meta/submetacentric chromosomes, other species also have subtelocentric chromosomes (Moreira-Filho et al., 1985; Jesus and Moreira-Filho 2000a, b; Bellafronte et al., 2005; Vicari et al., 2006; Rosa et al., 2006). Populations of *A. affinis* from the Lower Paraná and Paraguay River basins showed a structural polymorphism with the presence of

acrocentric chromosomes, probably caused by pericentric inversions (Jesus et al., 1999; Jorge and Moreira-Filho, 2000).

The location of the major NORs sites of *A. hasemani* in the terminal region of the long arm of a submetacentric chromosome pair, revealed by silver nitrate staining and the 18S rDNA probes (Figure 2a, box), is a character shared by other species of the genus *Apareiodon* and by *P. nasus* (Bellafronte et al., 2005; Rosa et al., 2006; Vicari et al., 2006; Bellafronte et al., 2009, 2011). In populations of *A. affinis* in the Lower Paraná and Paraguay basins, acrocentric chromosomes originated from pericentric inversions are NOR carriers (Jesus et al., 1999; Jorge and Moreira-Filho, 2004). Additional sites were also found in *A. hasemani*, in a characteristic shared with *A. ibitiensis* and *A. vittatus*. Dispersal events may have originated the additional 18S rDNA sites in these species, since they are found in more than one chromosome pair (Jesus and Moreira-Filho, 2000a; Bellafronte et al., 2009, 2011, this study). Considering that NORs are generally associated with terminal heterochromatin, chromosome rearrangements and transpositions become more likely, which may result in dispersion in the genome (Moreira Filho et al., 1984).

FISH with 5S rDNA probes in Parodontidae revealed that these cistrons are often located on the short arm of one of the submetacentric chromosome pairs (Centofante et al., 2002; Vicari et al., 2006; Bellafronte et al., 2009, 2011) (Figure 2a). Additional sites may, however, occur in different locations in *A. vladii*, *P. hilarii*, *P. pongoensis* and *P. nasus*, which show a case of synteny with the 18S rDNA gene (Vicente et al., 2001; Bellafronte et al., 2005; Rosa et al., 2006). *Apareiodon hasemani* and most species of Parodontidae show only one submetacentric pair carrying 5S rDNA sites; however, the cistron is located in the subterminal region of the long arm. It is likely that this pattern originated from a pericentric inversion, since in other Parodontidae species and in the outgroup Anostomidae the 5S rDNA sites are located on the short arm (Bellafronte et al., 2011). A similar case was observed in the

genus *Astyanax* (Kavalco et al. 2004), where *A. intermedius* shows all 5S rDNA sites located on acrocentric chromosomes, while *A. guiton* has a marked subtelocentric pair besides the aforementioned acrocentric chromosomes, probably originated by a pericentric inversion.

Apareiodon hasemani shares a ZZ/ZW heteromorphic sex chromosome system with *P. hilarii*, *P. moreirai*, *A. vladii*, *A. ibitiensis* and *Apareiodon* sp. (Bellafronte et al., 2011). The distribution of constitutive heterochromatin in *A. hasemani* (Figure 1b,d) is characterized by centromeric bands in some chromosome pairs, large interstitial and terminal blocks, and blocks adjacent to the NORs, which have also been found in several other species of Parodontidae (Moreira-Filho et al., 1984; Jesus and Moreira-Filho 2000a,b; Vicente et al., 2001, 2003; Centofante et al., 2002; Bellafronte et al., 2005; Rosa et al., 2006; Vicari et al., 2006). Moreover, the Z sex chromosome exhibited a correspondence of proximal and terminal bands on short arms with those of other parodontids bearing sex chromosomes (Bellafronte et al., 2011; Schemberger et al., 2011). Schemberger et al. (2011) inferred that the Z and W chromosomes of Parodontidae were initially a homologous pair, and that heterochromatinization through the accumulation of *WAp* sequences was a decisive step in the differentiation of the W chromosome.

On the other hand, the terminal heterochromatic block in the long arm of the Z and W chromosomes of *A. hasemani* (Figure 2b) led to a size increase of the long arm of these chromosomes, in relation to other species in the group. Thus, with the increase in the long arm of the Z chromosome due to this terminal heterochromatin, the heterochromatic differentiation of the W chromosome in the short arm region did not lead to a sufficient size increase to exceed the total length of the long arm (Figure 3), a common state observed among the other parodontid carriers of heteromorphic sex chromosomes. In this proposed scenario, not only would the W chromosome change in shape and size, but the Z chromosome would also have increased in size in relation to a possible ancestral condition. This

mechanism is in agreement with the model for the evolution of heteromorphic sex chromosomes (Muller, 1964; Charlesworth, 1978; Green, 1990).

During the evolution of the heteromorphic sex chromosomes XY or ZW, there is a suppression of meiotic recombination between a pair of homomorphic chromosomes (homologues), which progressively accumulate sex determining genes, followed by structural chromosomal rearrangements such as deletions, insertions, accumulation of transposable elements, and expansion of repetitive sequences (Schartl, 2004; Kasahara, 2009; Livernois et al., 2012). In recent years, repetitive DNA sequences have been widely studied in fishes, providing important information on the differentiation and evolution of sex chromosomes. These studies have shown that the differentiation of sex chromosomes is frequently associated with the accumulation of such DNA sequences on chromosomes (Vicente et al., 2003; Parise-Maltempi et al., 2007; Machado et al., 2011). FISH with the sequence pPh2004 in *A. hasemani* showed that this satellite DNA is not present in the karyotype or in species with heteromorphic ZW sex chromosomes: *A. ibitiensis*, *Apareiodon* sp. and *A. vladii* (Bellafronte et al., 2011).

Furthermore, the WAp satellite DNA probe (Schemberger et al., 2011) detected the W chromosome amplification region of *A. hasemani*, suggesting that this system is common to other parodontid carriers of sex chromosomes. In the family Parodontidae, all species studied so far have positive sites for this marker, suggesting a common origin of this satellite DNA and therefore of the sex chromosome systems (Schemberger et al., 2011). The simple ZZ/ZW sex chromosome systems may have originated from a paracentric inversion of a WAp terminal site to the proximal region of the short arm of a metacentric chromosome pair, with the subsequent amplification of this sequence leading to differentiation of the W sex chromosome in most species. Through the use of chromosome markers, Schemberger et al. (2011) demonstrated the existence of closely related species groups: (i) those without heteromorphic

sex chromosomes (*A. piracicabae* and *A. vittatus*); (ii) those with proto sex chromosomes and the presence of satellite DNA pPh2004 (*P. nasus* and *P. pongoensis*); (iii) those with a heteromorphic sex chromosome system (*A. ibitiensis* and *A. vladii*); (iv) those with a heteromorphic sex chromosome system and the presence of satellite DNA pPh2004 (*P. moreirai* and *P. hilarii*); and (v) a species with a multiple sex chromosome system and satellite DNA pPh2004 (*A. affinis*). *Apareiodon hasemani* shows chromosomal markers similar to those found in *A. ibitiensis*, *Apareiodon* sp. and *A. vladii* (Bellafronte et al., 2011; Schemberger et al., 2011); however, the location of the 5S rDNA can be considered derived in *A. hasemani*.

The main Brazilian rivers are separated by barriers that prevent the dispersal of species and populations, favoring the occurrence of events that cause the isolation of groups (Weitzman et al., 1988). By such conditions, unique karyotypes and distinct sex chromosomes systems in fish may have become fixed independently in different species of a genus, promoting diversification and contributing to the speciation process (Centofante et al., 2001). Although allopatry may have contributed to the origin of sex chromosome systems, Moreira-Filho et al. (1985) reported the occurrence of four species of Parodontidae in sympatry and syntopy, so the different sex chromosomes systems in some species would play an important role in their isolation. This study found that the repetitive DNA in Parodontidae seemed to play an important role in the chromosome diversification of the studied species, as in *A. hasemani*. Furthermore, *A. hasemani* presented derived chromosomal regions with respect to 5S rDNA, contributing to the genetic isolation of the population and differentiation of strains.

Acknowledgments

The authors thank the Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA - License number: 10538-1) and the Instituto Estadual de Florestas (IEF/MG) for authorization to collect the material. This study was financed by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), the Fundação Araucária (Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná), and Instituto Estadual de Florestas de Minas Gerais.

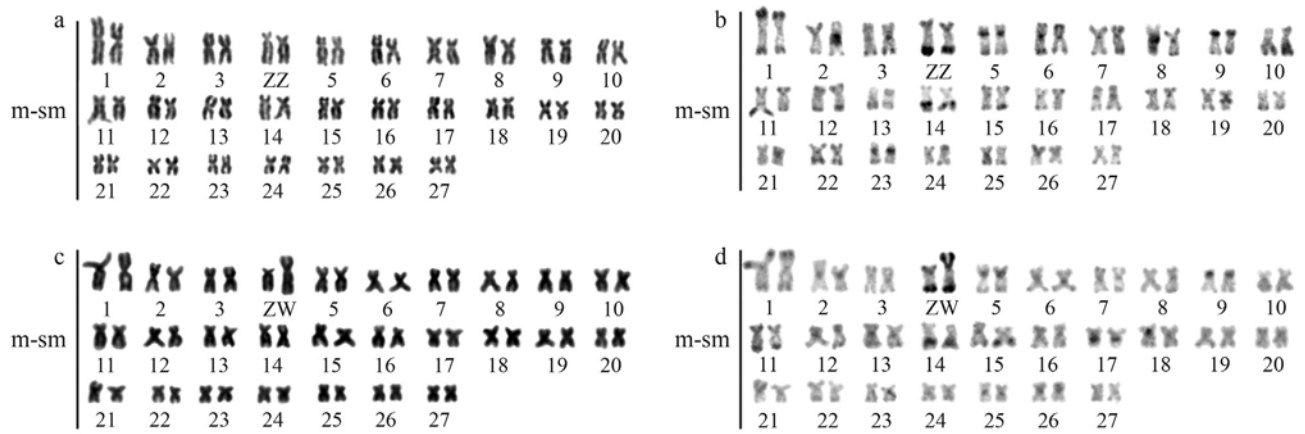


Figure 1 - Karyotypes of male and female of the *Aporeiodon hasemani* arranged from Giemsa-staining (a, c) and C-banding (b, d). Bar = 10 μ m.

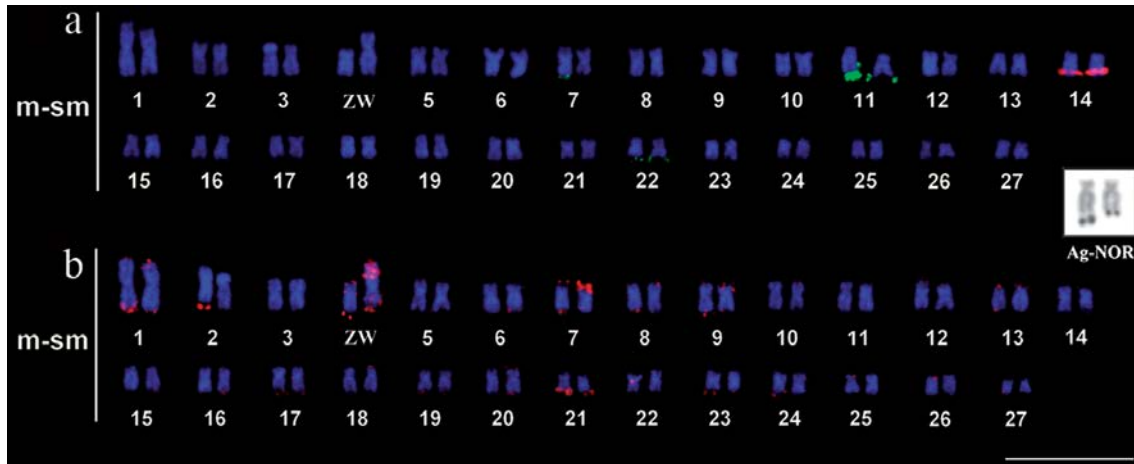


Figure 2 - Chromosomal markers in *Apareiodon hasemani* (a) representative double-FISH karyotype, showing five 18S rDNA sites and chromosome pair 14 bearing 5S rDNA sites. (b) representative the WAp signals. The nucleolar organizer regions revealed by silver nitrate (Ag-NOR) staining are shown in the insert box. Bar = 10 μ m.

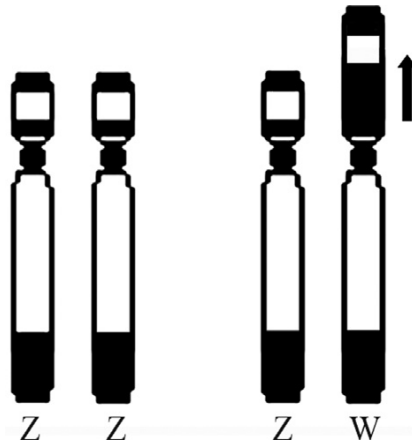


Figure 3 - Hypothetical derivation of the W chromosome from an ancestral chromosome similar to the Z chromosome in *Apareiodon hasemani*.

References

- Artoni RF and Bertollo LAC (2002) Evolutionary aspects of the ZZ/ZW sex chromosome system in the Characidae fish, genus *Triportheus*. A monophyletic state and NOR location on the W chromosome. *Heredity* 89:15-19.
- Bellafronte E, Margarido VP and Moreira-Filho O (2005) Cytotaxonomy of *Parodon nasus* and *Parodon tortuosus* (Pisces, Characiformes). A case of synonymy confirmed by cytogenetic analyses. *Genet Mol Biol* 28:710-716.
- Bellafronte E, Vicari MR, Artoni RF, Margarido VP and Moreira-Filho O (2009) Differentiated ZZ/ZW sex chromosomes in *Apareiodon ibitiensis* (Teleostei, Parodontidae): Cytotaxonomy and biogeography. *J Fish Biol* 75:2313-2325.
- Bellafronte E, Schemberger MO, Moreira-Filho O, Almeida MC, Artoni RF, Margarido VP and Vicari MR (2011) Chromosomal markers in Parodontidae: An analysis of new and reviewed data with phylogenetic inferences. *Rev Fish Biol Fisheries* 21:559-570.
- Bertollo LAC, Takahashi CS and Moreira-Filho O (1978) Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Braz J Genet* 21:103-120.
- Centofante L, Bertollo LAC and Moreira-Filho O (2001) Comparative cytogenetics among sympatric species of *Characidium* (Pisces, Characiformes). Diversity analysis with the description of a ZW sex chromosome system and natural triploidy. *Caryologia* 54:253-260.
- Centofante L, Bertollo LAC and Moreira-Filho O (2002) A ZZ/ZW sex chromosome system in a new species of the genus *Parodon* (Pisces, Parodontidae). *Caryologia* 55:139-150.
- Centofante L, Bertollo LAC, Buckup PA and Moreira Filho O (2003) Chromosomal divergence and maintenance of sympatric *Characidium* fish species (Crenuchidae, Characidiinae). *Hereditas* 138:213-218.
- Charlesworth B (1978) Model for evolution of Y chromosomes and dosage compensation. *Proc Natl Acad Sci USA* 75:5618-5622.
- Devlin RH and Nagahama Y (2002) Sex determination and sex differentiation in fish: An overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture* 208:191-364.
- Green DM (1990) Muller's Ratchet and the evolution of supernumerary chromosomes. *Genome* 33:818-824.
- Hatanaka T and Galetti Jr PM (2004) Mapping 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1929 (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetica* 122:239-244.
- Howell WM and Black DA (1980) Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: A 1-step method. *Experientia* 36:1014-1015.
- Ingenito LFS and Buckup PA (2005) A new species of *Parodon* from the Serra da Mantiqueira, Brazil (Teleostei, Characiformes, Parodontidae). *Copeia* 4:765-771.

Jesus CM, Bertollo LAC and Moreira-Filho O (1999) Comparative cytogenetics in *Apareiodon affinis* (Pisces, Characiformes) and considerations regarding diversification of the group. *Genetica* 105:63-67.

Jesus CM and Moreira-Filho O (2000a) Cytogenetic studies in some *Apareiodon* species (Pisces, Parodontidae). *Cytologia* 65:397-402.

Jesus CM and Moreira-Filho O (2000b) Karyotypes of three species of *Parodon* (Teleostei, Parodontidae). *Ichthyol Explor Freshwaters* 11:75-80.

Jorge LC and Moreira-Filho O (2000) Cytogenetic studies on *Apareiodon affinis* (Pisces, Characiformes) from Paraná river basin: Sex chromosomes and polymorphism. *Genetica* 109:267-273.

Jorge LC and Moreira-Filho O (2004) Nucleolar organizer regions as markers of chromosomal polymorphism in *Apareiodon affinis* (Pisces, Parodontidae). *Caryologia* 57:203-207.

Kasahara S (2009) *Introdução à Pesquisa em Citogenética de Vertebrados*. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, pp 160.

Kavalco KF, Pazza R, Bertollo LAC and Moreira-Filho O (2004) Gene mapping of 5S rDNA sites in eight fish species from the Paraíba do Sul river basin, Brazil. *Cytogenet Genome Res* 106:107-110.

Levan A, Fredga K and Sandberg AA (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52:201-220.

Livernois AM, Graves JAM and Waters PD (2012) The origin and evolution of vertebrate sex chromosomes and dosage compensation. *Heredity* 108:50-58.

Lui RL, Blanco DR, Margarido VP and Moreira-Filho O (2009) First description of B chromosomes in the family Auchenipteridae, *Parauchenipterus galeatus* (Siluriformes) of the São Francisco River basin (MG, Brazil). *Micron* 40:552-559.

Machado TC, Pansonato-Alves JC, Pucci MB, Nogaroto V, Almeida MC, Oliveira C, Foresti F, Bertollo LAC, Moreira-Filho O, Artoni RF, et al. (2011) Chromosomal painting and ZW sex chromosomes differentiation in *Characidium* (Characiformes, Crenuchidae). *BMC Genetics* 12:e65.

Martins C and Galetti Jr PM (1999) Chromosomal localization of 5S DNAr genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). *Chromosome Res* 7:363-367.

Moreira-Filho O, Bertollo LAC and Galetti Jr PM (1980) Evidences for a multiple sex chromosome system with female heterogamety in *Apareiodon affinis* (Pisces, Parodontidae). *Caryologia* 33:83-91.

Moreira-Filho O, Bertollo LAC and Galetti Jr PM (1984) Structure and variability of nucleolar organizer regions in Parodontidae fish. *Can J Genet Cytol* 26:564-568.

Moreira-Filho O, Bertollo LAC and Galetti Jr. PM (1985) Karyotypic study of some species of family Parodontidae (Pisces-Cypriniformes). *Caryologia* 38:47-55.

Moreira-Filho O, Bertollo LAC and Galetti Jr PM (1993) Distribution of sex chromosome mechanisms in Neotropical fish and description of a ZZ/ZW system in *Parodon hilarii* (Parodontidae). *Caryologia* 46:115-125.

Muller HJ (1964) The relation of recombination to mutational advance. *Mutat Res* 1:2-9.

Oliveira RR, Feldberg E, Anjos MB and Zuanon J (2007) Karyotype characterization and ZZ/ZW sex chromosome heteromorphism in two species of the catfish genus *Ancistrus* Kner, 1854 (Siluriformes, Loricariidae) from the Amazon basin. *Neotrop Ichthyol* 5:301-306.

Oliveira RR, Feldberg E, Anjos MB and Zuanon J (2008) Occurrence of multiple sexual chromosomes (XX/XY₁Y₂ and Z₁Z₁Z₂Z₂/Z₁Z₂W) in catfishes of the genus *Ancistrus* (Siluriformes, Loricariidae) from the Amazon basin. *Genetica* 13:243-249.

Parise-Maltempi PP, Martins C, Oliveira C and Foresti F (2007) Identification of a new repetitive element in the sex chromosomes of *Leporinus elongatus* (Teleostei, Characiformes, Anostomidae): New insights into the sex chromosomes of *Leporinus*. *Cytogenet Genome Res* 116:218-223.

Pavanelli CS (2003) Family Parodontidae (Parodonts). In: Reis RE, Kullander SO and Ferraris Jr CJ (eds) Check List of the Freshwaters Fishes of South and Central America. EDIPUCRS, Porto Alegre, pp 46-50.

Pavanelli CS and Britski HA (2003) *Apareiodon* Eigenmann, 1916 (Teleostei, Characiformes), from the Tocantins-Araguaia Basin, with description of three new species. *Copeia* 2:337-348.

Pinkel D, Straume T and Gray JW (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:2934-2938.

Rosa R, Bellafronte E, Moreira-Filho O and Margarido VP (2006) Description of the ZZ/ZW sex chromosome system and localization of 5S and 18S DNAr genes in *Apareiodon* sp. (Pisces, Characiformes, Parodontidae). *Genetica* 128:159-166.

Schartl M (2004) Sex chromosome evolution in non-mammalian vertebrates. *Curr Opin Genet Dev* 14:634-641.

Schemberger MO, Bellafronte E, Nogaroto V, Almeida MC, Schuhli GS, Artoni RF, Moreira-Filho O and Vicari MR (2011) Differentiation of repetitive DNA sites and sex chromosome systems reveal closely related group in Parodontidae (Actinopterygii, Characiformes). *Genetica* 139:1499-1508.

Sumner AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp Cell Res* 75:304-306.

Travassos H (1957) Sobre um novo "Parodontidae" do Estado de Goiás, Brasil (Cypriniformes, Characoidei). Rev Bras Biol 17:147-151.

Vicari MR, Moreira-Filho O, Artoni RF and Bertollo LAC (2006) ZZ/ZW sex chromosome system in an undescribed species of the genus *Apareiodon* (Characiformes, Parodontidae). Cytogenet Genome Res 114:163-168.

Vicari MR, Artoni RF, Moreira-Filho O and Bertollo LAC (2008) Colocalization of repetitive DNAs and silencing of major rRNA genes. A case report of the fish *Astyanax janiroensis*. Cytogenet. Genome Res 122:67-72.

Vicente VE, Jesus CM and Moreira-Filho O (2001). Chromosomal localization of 5S and 18S rRNA genes in three *Parodon* species (Pisces, Parodontidae). Caryologia 54:365-369.

Vicente VE, Bertollo LAC, Valentini SR and Moreira-Filho O (2003) Origin and differentiation of sex chromosome system in *Parodon hilarii* (Pisces, Parodontidae). Satellite DNA, G and C-banding. Genetica 119:115-120.

Weitzman SH, Menezes NA and Weitzman MJ (1988) Phylogenetic biogeography of the Glandulocaudini (Teleostei, Characiformes, Characidae) with comments on the distributions of other freshwater fishes in Eastern and Southeastern Brazil. In: Vanzolini PE and Heyer WR (eds) Proceedings of a Workshop on Neotropical Distribution Patterns. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, pp 379-427.

4.2 Capítulo II: Caracterização e construção de biblioteca de DNAs repetitivos em Parodontidae (Actinopterygii; Characiformes): uma abordagem genômica e evolutiva

Resumo

As sequências de DNA repetitivo estão presentes em uma grande fração do genoma de eucariotos e incluem os microssatélites, minissatélites, satélites e elementos transponíveis. É grande a importância dos DNAs repetitivos no genoma para o entendimento de regulação gênica, diferenciação de cromossomos sexuais e evolução cariotípica. Na família Parodontidae somente os DNAs repetitivos WAp, pPh2004 e rDNAs foram estudados utilizando a técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH). Assim, este estudo teve por objetivo a construção de uma biblioteca de DNA repetitivo em Parodontidae. De um total de 40 clones isolados pela técnica de cinética de reassociação (C_0t-1), 15 apresentaram identidade com sequências de DNAs repetitivos, incluindo DNAs satélites, minissatélites, microssatélites e elementos transponíveis da Classe I e II. A FISH detectou sinais de um DNA satélite e também do elemento *Helitron* nos cromossomos sexuais, sendo ambos envolvidos com o processo de diferenciação do W. Alguns clones apresentaram sinais dispersos na FISH, outros não foram detectados, enquanto o rDNA 5S foi detectado em um par autossômico. A provável função destes DNAs repetitivos foi inferida na degeneração molecular do cromossomo W de Parodontidae. Desta forma, a localização nos cromossomos destes elementos é de suma importância para estudos integrativos com sequenciamento do genoma, além de auxiliarem a um maior entendimento da presença e função genômica de DNAs repetitivos em Parodontidae.

Palavras-chave: Citogenética, cromossomos sexuais, DNA satélite, elementos transponíveis, Teleostei.

Introdução

Sequências de DNA repetitivo estão presentes em grande quantidade nos genomas dos eucariotos (CHARLESWORTH et al., 1994). Estas sequências apresentam múltiplas cópias que aparecem em tandem: DNAs satélites, microssatélites e minissatélites; e também estão presentes como sequências dispersas, ou os denominados elementos transponíveis (TEs) (JURKA et al., 2007). Dentro dos TEs há aqueles que necessitam de um RNA intermediário para mover-se (Classe I) e aqueles que se movem diretamente no genoma (Classe II) (WIKER et al., 2007).

Os DNAs repetitivos são importantes para estrutura e função genômica (FESCHOTTE e PRITHAM, 2007; FESCHOTTE, 2008; HERPIN et al., 2010). Os DNAs satélites, por exemplo, atuam na segregação cromossômica no ciclo celular uma vez que compõem o centrômero dos cromossomos onde se ligam os microtúbulos (EKWALL et al., 1997), além disso, ambos os tipos de repetições podem atuar no controle da expressão gênica, no efeito de variação causado pelo DNA satélite (KURENOVA et al., 1998) e na exaptação molecular (FESHOTTE e PRITHAM, 2007). Na exaptação molecular há o recrutamento dos TEs para a execução de novas funções genômicas, onde estes elementos passam a desempenhar papel de sítios regulatórios (SINZELLEA et al., 2009).

Existem vários métodos utilizados para isolar sequências de DNAs repetitivos, dentre eles a digestão genômica por enzima de restrição é o mais utilizado e; atualmente a cinética de reassociação baseada no C_0t-1 DNA e a microdissecção de cromossomos submetidos ao bandamento C com subsequente amplificação de sequências heterocromáticas por *degenerated oligonucleotide primed – polymerase chain reaction* (DOP-PCR) também são utilizados (VICARI et al., 2010). A obtenção, caracterização e mapeamento físico destes DNAs tem auxiliado no entendimento dos aspectos evolutivos, organização e diversificação

genômica (ARTONI et al., 2006; SAITO et al., 2007; VICARI et al., 2008; KANTEK et al., 2009; MACHADO et al., 2011; SCHEMBERGER et al., 2011).

Entre os peixes da família Parodontidae, que é composta pelos gêneros *Parodon*, *Apareiodon* e *Saccodon* (PAVANELLI, 2003), duas sequências de DNAs repetitivos já foram isoladas e mapeadas: pPh2004, um DNA satélite obtido por enzima de restrição (VICENTE et al., 2003), e WAp obtido a partir da microdissecção do cromossomo W submetido ao bandamento C (SCHEMBERGER et al., 2011). O mapeamento destas sequências possibilitou esclarecer juntamente com dados de DNAr os aspectos relacionados à evolução e diversificação cariotípica e dos cromossomos sexuais de Parodontidae (BELLAFRONTTE et al., 2011; SCHEMBERGER et al., 2011).

Em relação a dados de citogenética clássica de Parodontidae, as espécies analisadas possuem número diploide conservado igual a 54 cromossomos, com espécies homomórficas em relação aos cromossomos sexuais ou heteromórficas com sistemas sexuais do tipo ZZ/ZW ou ZZ/ZW₁W₂ (SCHEMBERGER et al. 2011). Assim, este estudo objetivou construir uma biblioteca de DNA repetitivo obtidos pela cinética de reassociação C_ot-1 e mapeá-los citogeneticamente para um maior entendimento da dinâmica genômica destas sequências nos cariótipos das espécies de Parodontidae.

Material e Métodos

Espécies analisadas e preparações cromossômicas

Para este estudo sete espécies de dois gêneros de Parodontidae foram utilizadas: *Apareiodon piracicabae*, *A. hasemani*, *Apareiodon* sp., *A. affinis*, *Parodon pongoensis*, *P. nasus* e *P. hilarii*, (Tabela 1). Exemplos destas espécies foram depositados no Museu do Núcleo de Pesquisa em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura da Universidade Estadual de

Maringá (Brasil). As preparações cromossômicas foram obtidas das células do rim anterior usando o procedimento de “*air drying*” (BERTOLLO, 1978). Os procedimentos estão de acordo com o Comitê de Ética no Uso de Animais (Processo CEUA 07/2011) da Universidade Estadual de Ponta Grossa e legislação brasileira vigente.

Construção da biblioteca de DNA repetitivo por cinética de reassociação (C_{ot} -1)

O DNA genômico da espécie *Apareiodon* sp. (Rio Verde – PR) foi obtido pelo método CTAB segundo MURRAY e THOMPSON (1980). A biblioteca genômica contendo DNAs moderadamente e altamente repetitivos foi construída pela técnica da cinética de reassociação C_{ot} -1 DNA segundo ZWICK et al. (1997), com modificações (VICARI et al., 2010). Os fragmentos de DNA obtidos foram utilizados como sondas para hibridação *in situ* fluorescente (FISH) e inseridos no vetor pMOSblue *Blunt ended kit* (Amershan Bioscience®), e clonados nas células competentes DH5 α *E.coli*. Parte da cultura de bactérias foi homogeneizada com glicerol e armazenada a - 80 °C.

Sequenciamento e caracterização dos fragmentos obtidos

As sequências de DNA foram obtidas utilizando o sequenciador automático ABI-PRISM *Genetic Analyzer*. As sequências de nucleotídeos foram submetidas ao CENSOR online software (JURKA et al., 2005), RepeatMasker (<http://www.repeatmasker.org>) e BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para checagem de similaridades com as sequências de DNA depositadas nestes bancos de dados. As sequências também foram analisadas no programa localizador de repetição em tandem disponível em <http://tandem.bu.edu/trf/trf.html> para encontrar a unidade de repetição. As sequências serão depositadas no banco de dados do *Genetic Information Research Institute*

(<http://www.girinst.org/>) e do *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) por ocasião de submissão do artigo.

Hibridação in situ fluorescente (FISH)

A FISH nas espécies de Parodontidae foi realizada utilizando a sonda de todos os fragmentos obtidos pelo C_{ot} -1 (neste estudo denominada de sonda C_{ot} -1 total), as sondas de cada um dos clones da biblioteca C_{ot} -1 e também a sonda do DNA satélite pPh2004 (VICENTE, et al., 2003). A sonda do C_{ot} -total foi marcada por *nick translation* com digoxigenina 11-dUTP (Roche Applied Science) seguindo instruções do fabricante, e os clones da biblioteca C_{ot} -1 e o DNA satélite pPh2004 foram marcados como sonda por PCR utilizando digoxigenina 11-dUTP ou biotina 16-dUTP com os primers do vetor. A PCR foi realizada contendo 20 ng de molde, 1 x tampão da reação, 2 mM $MgCl_2$, 40 μ M dATP, dGTP e dCTP, 28 μ M dTTP, 12 μ M 11-dUTP-digoxigenina (Roche Applied Science), 0.3 μ M de cada primer e 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen). O programa da reação foi: desnaturação inicial por 5 min a 94 °C, 35 ciclos de 94 °C por 45 s, 56 °C por 45 s, e 72 °C por 1 min e 30 s e extensão final a 72 °C por 5 min. O procedimento geral da FISH sob alta condição de estringência (2,5 ng/ μ L sonda, 50 % formamida, 2 x SSC, 10 % sulfato dextrano, 37 °C por 16 h) seguiu o procedimento geral descrito por PINKEL et al. (1986). Para a detecção das sondas foram utilizados os anticorpos estreptavidina conjugada com *Alexa Fluor* 488 (Invitrogen) ou anti-digoxigenina conjugada com rodamina (Roche Applied Science). Os cromossomos foram contracolorados com DAPI (0,2 μ g/mL) em meio de montagem Vectashield (Vector), e analisados no microscópio de epifluorescência Olympus BX41 acoplado ao sistema de captura de Imagens DP 71 (Olympus). Os cromossomos foram organizados em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm) e subtlocêntricos (st), dependendo da razão de braços (LEVAN et al., 1964).

Resultados

DNA repetitivo por C_{ot} -1

Os fragmentos obtidos por C_{ot} -1 possuem tamanhos entre 40 e 400 pb (Figura 1). Para a checagem da qualidade e padrão de localização dos fragmentos obtidos por C_{ot} -1, foi utilizada a sonda C_{ot} -1 total para a hibridização na metáfase do cariótipo de *P. hilarii*. O C_{ot} -1 total foi localizado nas regiões terminais de vários cromossomos do cariótipo (pares 1, 3, 9, 10, 13-Z, 16, 23 26) na região terminal e proximal do braço curto do cromossomo Z e por quase todo braço longo do cromossomo W de *P. hilarii* (Figura 2 a, b).

Caracterização da biblioteca C_{ot} -1

Uma biblioteca com 40 clones foi construída e sequenciada. Os resultados do sequenciamento demonstraram que 21 clones continham inserto. O tamanho deste variou entre 40 pb a 209 pb (Tabela 2). A maioria das sequências obtidas foi de partes de elementos transponíveis Classe II (8 clones), 2 clones apresentaram retrotransposons, 5 eram compostos por DNA repetidos em tandem, 1 com rDNA 5S e 3 clones apresentaram transposons compostos com duas sequências cada. Seis clones não apresentaram similaridade com sequências depositadas em nenhum banco de dados utilizados neste estudo. Os elementos *Politron* e *Tc1-Mariner* estão representados em mais de um clone (Tabela 2).

Mapeamento físico das sequências repetitivas

Entre as sondas utilizadas para a localização cromossômica por FISH, o fragmento correspondente ao elemento transponível *Helitron* foi detectado na região terminal do braço longo do cromossomo W das espécies *A. ibitiensis* e *P. hilarii*, sendo que a primeira possui um bloco mais conspícuo (Figura 3a). Por sua vez, o cromossomo sexual Z de *P. hilarii*

apresentou sinais positivos para esta sonda na região terminal e proximal do braço curto (Figura 3b). A FISH com o clone correspondente ao rDNA 5S foi positivo na região proximal do braço curto do par autossômico 11 das espécies *A. ibitiensis* e *P. hilarii* (Figura 3c; d).

O clone 4 (DNA satélite) com 62 pb não possui similaridade com nenhuma sequência depositada nos bancos de dados genômicos. Entretanto a espécie *A. piracicabae* possui sítios mais evidentes deste DNA em região terminal nos cromossomos 1, 4, 5, 6, 9, 14, 18, 20, 23, 24 e 25. A espécie *P. pongoensis* possui sítios terminais em vários cromossomos do cariótipo sendo mais visíveis nos pares 3, 4, 6, 8, 11, 13 (proto cromossomo sexual), 24 e 27. *Parodon nasus* também possui sinais terminais (com exceção dos pares 3, 5 e 24). Em *A. hasemani* além dos sítios terminais (pares 2, 4, 5, 8, 12, 13-Z, 18, 20, 24, 26 e 27) foram detectados sinais na região terminal do braço curto do cromossomo W. O mapeamento físico desta sonda em *P. hilarii* foi na região intersticial no braço longo do cromossomo W e em regiões terminais (evidentes nos pares 1, 6, 9, 11, 13-Z e 24) (Figura 4b, c). Na espécie *A. affinis* este DNA repetitivo apresentou sinais na região proximal do braço curto do cromossomo Z (Figura 4 d) e nas regiões terminais dos cromossomos W_1 e W_2 e também de cromossomos autossômicos (exceção dos pares 2, 5, 15 e 23). A sonda pPh2004 foi utilizada somente para auxiliar a identificação correta dos cromossomos, uma vez que já foi descrita em outros estudos (VICENTE et al., 2003; BELLAFRONTI et al., 2011).

Discussão

A importância do DNA repetitivo como componente fundamental para estrutura cromossômica, assim como, a sua atuação em processos de expressão gênica têm sido amplamente estudadas (KURENOVA et al., 1998; O'CONNELL e WRIGTH, 1997; MONOD et al., 2002; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ et al., 2008; BUSSIEK et al., 2009).

Além disso, a literatura tem relatado sua participação em processos de rearranjos cromossômicos associados com eventos de diversificação cariotípica ou diferenciação de cromossomos sexuais (ARTONI et al., 2006; SAITO et al., 2007; VICARI et al., 2008; MACHADO et al., 2011; SCHEMBERGER et al., 2011). Os novos métodos de sequenciamento genômico, chamados de “*next generation*” tem gerado uma grande quantidade de informação propiciando um maior volume de dados de sequências de DNA dos organismos; entretanto há uma grande dificuldade em organizar a posição das sequências repetitivas (METZKER, 2009). Desta forma, inúmeros estudos de obtenção e mapeamento físico de sequências repetitivas têm sido realizados para auxiliar na organização de regiões cromossômicas ricas em DNAs repetitivos, especialmente nos cromossomos sexuais diferenciados (WANG et al., 2011; KAI et al., 2011).

A técnica de C_0t-1 DNA é uma ferramenta útil para obtenção de DNAs altamente e moderadamente repetitivos como relatado em estudos de FERREIRA e MARTINS (2008) e ZHANG et al. (2012). Neste estudo DNA repetitivos caracterizados como satélites, minissatélite, microssatélites, transposons de DNA e retrotransposons foram obtidos. O mapeamento físico da sonda do C_0t -total mostrou localização nas regiões terminais de vários autossomos, em região proximal do braço curto do cromossomo Z e por todo o braço longo do cromossomo W da espécie *P. hylarii*. Estes dados corroboram o estudo de SCHEMBERGER et al. (2011) que demonstraram o extensivo acúmulo de DNAs repetitivos nos cromossomos sexuais W de Parodontidae.

As sequências de DNAs repetitivos mais abundantes na biblioteca de C_0t-1 de Parodontidae foram as dos elementos transponíveis de DNA. Elementos de repetição dispersa, quando degenerados nos genomas, são conhecidos por fornecer co-opção molecular para o genoma hospedeiro, atuando como novos sítios regulatórios da expressão gênica, formar novos genes, gerar micro RNAs e proteínas envolvidas com a regulação pós-transcricional e,

como sítios para elementos insuladores (FESCHOTTE e PRITHAM, 2007; FESCHOTTE, 2008). Entre as sequências repetitivas obtidas neste estudo, os elementos *EnSpm1_SB*, *DadatlL_DR*, *Hat*, *MuDR*, *Tc1-Mariner* e *Politron* tiveram localização dispersa e pequeno acúmulo nos cromossomos de Parodontidae (dados não mostrados).

Em destaque, entre os TEs encontrados no presente estudo, o elemento *MuDr* de arroz é conhecido por dar origem a uma proteína TPase que funciona como regulador transcricional de sua própria expressão (RAIZADA et al., 2001; HUDSON et al., 2003). Já o BEAF-32 de *Drosophila* é uma proteína insuladora totalmente derivada de um elemento *Hat* o qual liga a *specialized chromatin structure* (scs) aos elementos adjacentes da cromatina e a conecta a matriz nuclear (PATHAK et al., 2007). Em outra via, MITES são frequentemente transcritos e estas miniaturas de transposons possuem sequências invertidas palíndromes (TIRs). Essas sequências MITES e TIRs produzem alças de RNA, que em princípio, poderiam ser processadas em siRNA (SIJEN et al., 2003). Deste modo, são inúmeras as vias que os TEs degenerados encontrados no presente estudo poderiam atuar na modificação da expressão gênica em Parodontidae.

As sequências parciais dos retrotransposons *Gypsy-12_BD-I* e *I-2_Deu* foram identificadas na biblioteca C_{ot} -1 DNA de Parodontidae, entretanto estas mostraram localização dispersa e em pequeno número na FISH (dados não mostrados). Esses elementos de Classe I movem-se no genoma por uma molécula de RNA intermediária, e também estão envolvidos no processo de diversificação genômica por terem essa capacidade de mobilização (JURKA et al., 2007). Por sua vez, a sequência do DNAr 5S evidenciou localização comparável ao descrito para as espécies de Parodontidae (BELLAFRONTTE, et al. 2011) e não está envolvida com a diferenciação dos cromossomos sexuais.

O elemento repetitivo composto pelo transposon *Helitron* evidenciou acúmulo de repetições nos cromossomos W e Z e pode estar envolvido como o processo de diferenciação dos cromossomos sexuais e degeneração gênica do W nesta família de peixes. O acúmulo de sequências de DNAs repetitivos dispersos já foi descrito em cromossomos sexuais de peixes. O elemento retrotransponível REX e o transposon *Tc1-Mariner* estiveram envolvidos com a diferenciação do cromossomo sexual no peixe *Chionodraco hamatus* (FERREIRA et al., 2011). Elementos LTRs (*long interspersed nuclear element*), SINEs (*short interspersed nuclear element*) e MITEs (pequenos elementos não autônomos derivados de transposons de DNA funcionais) também foram isolados nos cromossomos sexuais de *Xiphophorus maculatus* (SCHULTEIS et al., 2005). É importante destacar que o acúmulo do elemento *Helitron* no cromossomo W, além de promover sua degeneração gênica, poderia promover sítios de nucleação, insulação, gerar siRNAs, entre outros.

Análises de mapeamento físico do DNA repetitivo *WAp* por SCHEMBERGER, et al. (2011) em diversas espécies da família Parodontidae demonstraram uma possível origem dos cromossomos sexuais por um evento de inversão de sequências *WAp* presentes na região terminal para a região proximal do braço curto de um par metacêntrico, seguido de acúmulo destas sequências na origem do cromossomo W heteromórfico. A análise desta sequência em conjunto com o DNA satélite pPh2004 nos cromossomos de Parodontidae propiciou também aos autores inferir sobre a origem do sistema de cromossomos sexuais múltiplos ZZ/ZW_1W_2 de *A. affinis*. No presente estudo, quando analisado o padrão de hibridação cromossômica da sequência do clone 4 (DNA satélite) é possível inferir que este DNA repetitivo está envolvido na inversão paracêntrica no proto cromossomo sexual que deu origem a diferenciação do cromossomo W por acúmulo de sequências repetitivas, corroborando os dados de SCHEMBERGER et al. (2011).

Deste modo, no nosso estudo foi possível detectar diferentes classes e tipos de DNAs repetitivos, sendo que alguns estão envolvidos com a diferenciação dos cromossomos sexuais de Parodontidae. Além dos DNAs satélites e TEs aqui encontrados, outros DNAs repetitivos devem participar do evento de degeneração e erosão gênica do cromossomo W. Estes dados são importantes para a caracterização molecular do cromossomo W de Parodontidae e para estudos futuros de detecção, localização de sequências gênicas e co-opção molecular dos TEs em genomas de eucariotos.

Agradecimentos

Os autores são gratos ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA/MMA/SISBIO nº: 15117). Este trabalho teve apoio financeiro do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), SETI (Secretaria de Ciência e Tecnologia do Estado do Paraná), Fundação Araucária (Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná, Processo) e, FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo).

Referências

As referências encontram-se no final desta tese.

Tabela 1: Espécies de Parodontidae, localidade, bacia hidrográfica e número de espécies estudadas.

Espécie	Rio (Estado)	Bacia hidrográfica	Localização (GPS)	Nº ♂	Nº ♀
<i>A. piracicabae</i>	Rio Piumhi (MG)	São Francisco	-20°31'55" e -46°02'42"	5	3
<i>Apareiodon</i> sp.	Rio Verde (PR)	Alto Paraná	-25°04'35" e -50°04'03"	10	15
<i>A. hasemani</i>	Rio São Francisco (MG)	São Francisco	-17°21'17" e -44°57'18"	2	2
<i>A. affinis</i>	Rio Passa-Cinco (SP)	Alto Paraná	-22°25'26" e -47°41'56"	7	5
<i>P. pongoensis</i>	Rio Taquaralzinho (MT)	Araguaia	-15°53'28" e -52°14'56"	4	5
<i>P. nasus</i>	Rio Paraguai (MT)	Paraguai	-15°34'40" e -56°09'58"	6	3
<i>P. hilarii</i>	Córrego do Porta (MG)	São Francisco	-17°21'17" e -44°57'15"	9	12

Tabela 2: Caracterização e mapeamento cromossômico dos clones da biblioteca C_{ot} -1 de Parodontidae.

Clone	Tamanho (pb)	Caracterização	Similaridade Blast (%) e posição de cobertura **	Similaridade Censor (%) e posição de cobertura ***	Similaridade RepeatMasquer (%) e posição de cobertura ****	Mapeamento cromossômico (FISH)
1	98	Desconhecida	<i>Choristoneura fumiferana</i> defective nucleopolyhedrovirus complete genome (97%) gb AY327402.2 : 4-98 pb	-	-	Sem sinais detectados pelo FISH
2	127	Desconhecida	-	-	-	Sem sinais detectados pelo FISH
3	85	Minissatélite (unidade de repetição: 32 pb)*	-	-	-	Sinais fracos e dispersos
4	62	DNA satélite	-	-	-	Sítios terminais do W de <i>A. hasemani</i> , posição intersticial do braço longo do W de <i>P. hilarii</i> e em região proximal do cromossomo Z de <i>A. affinis</i> . Além de sítios terminais de vários cromossomos do cariótipo das espécies analisadas
5	58	Desconhecida	-	-	-	Sem sinais detectados pelo FISH
6	40	Microsatélite (unidade de repetição: 2 pb)*	Sequência do DNA de Zebrafish DNA do clone DKEYP-10C7 no grupo de ligação 5 emb BX571679.39 (100%) : 1-40 pb	-	Repetições simples (100%) <i>Danio rerio</i> : 1 - 40 pb,	Sem sinais detectados pelo FISH
7	119	Minissatélite (unidade de repetição: 16 pb)*	-	-	Repetições simples (79%) <i>Danio rerio</i> : 23 -102 pb.	Sem sinais detectados pelo FISH
8	101	Desconhecida	-	-	-	Sem sinais detectados pelo FISH
9	112	Elemento transponível Classe II	Sequência do DNA de Zebrafish do clone CH73-66D24 no grupo de ligação 25 emb FP102951.7 (88%): 40 - 112 pb	Elemento <i>Helitron</i> de <i>Danio rerio</i> (80%): 12-111 pb	Elemento <i>Helitron</i> de <i>Danio rerio</i> (80%): 12 -111 pb	Sítios terminais no braço longo do cromossomo W
10	59	DNAr 5S ou Elemento transponível Classe I	Sequência do clone TC-B-6 gene 5S ribossomal RNA <i>Chanodichthys ilishaformis</i> gb JQ317903.1 (98%): 1 -30	SINE3/5S de <i>Anolis carolinensis</i> (94.8%): 1-58 pb	rDNA 5S de <i>Danio rerio</i> (94.8%): 1-58 pb	Sítio no braço curto do par autossômico 11
11	209	Minissatélite (unidade de repetição 61 pb)*	-	-	-	Sem sinais detectados pelo FISH

12	99	Desconhecida	-	-	-	Sem sinais detectados pelo FISH
13	58	Desconhecida	-	-	-	Sem sinais detectados pelo FISH
14	196	Desconhecida	-	-	-	Sem sinais detectados pelo FISH
15	75	Elemento transponível Classe II	-	Elemento <i>MuDR</i> de <i>Arabidopsis lyrata</i> (70%): 7-40 pb	Repetições simples de <i>Danio rerio</i> (75.6%): 1-63 pb	Sinais fracos e dispersos
16	160	Elemento transponível Classe II	-	Elemento <i>Politron</i> de <i>Danio rerio</i> (77%): 7-48 pb; e elemento <i>Tc1-Mariner</i> de <i>Takifugu rubripes</i> (77%): 57-160 pb	Repetição simples de <i>Danio rerio</i> (85.3%): 1-30 pb; e <i>Tc1-Mariner</i> de <i>Danio rerio</i> (76%): 57-160 pb	Sinais fracos e dispersos
17	200	Elemento transponível Classe II	-	Elemento <i>Hat</i> de <i>Danio rerio</i> (70%): 80- 181 pb	Repetição simples de <i>Danio rerio</i> (86%): 11-59 pb; repetição simples de <i>Danio rerio</i> (72.3%): 81-181pb	Sinais fracos e dispersos
18	156	Elemento transponível Classe II	-	Elemento <i>Tc1-Mariner</i> de <i>Takifugu rubripes</i> (79%): 1-101 pb; e elemento <i>Dada-tL_DR</i> de <i>Danio rerio</i> (100%): 122-156 pb	Elemento <i>Tc1-Mariner</i> de <i>Danio rerio</i> (78.2): 1-101 pb; repetição simples de <i>Danio rerio</i> (100%): 122-154 pb	Sinais fracos e dispersos
19	80	Elemento transponível Classe II	-	<i>Politron</i> de <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> (76%): 1-80 pb	-	Sinais fracos e dispersos
20	146	Elemento transponível Classe I e II	-	Elemento <i>EnSpm1_SB</i> de <i>Sorghum bicolor</i> (84%): 1-43 pb; elemento <i>Gypsy-12_BD-I</i> de <i>Brachypodium distachyon</i> (76%): 79-146 pb	-	Sinais fracos e dispersos
21	67	Elemento transponível Classe I	-	<i>I-2_Deu</i> de <i>Drosophila eugracilis</i> (79%): 1-67pb	-	Sinais fracos e dispersos

* Sequências de DNAs satélites identificadas pelo programa localização de repetição em tandem disponível em <http://tandem.bu.edu/trf/trf.html>.

** Sequências com similaridade com elementos repetitivos presentes no banco de dados <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>

*** Sequências com similaridade com elementos repetitivos presentes no banco de dados <http://www.girinst.org/censor/index.php>.

**** Sequências com similaridade com elementos repetitivos presentes no banco de dados <http://www.repeatmasker.org/>

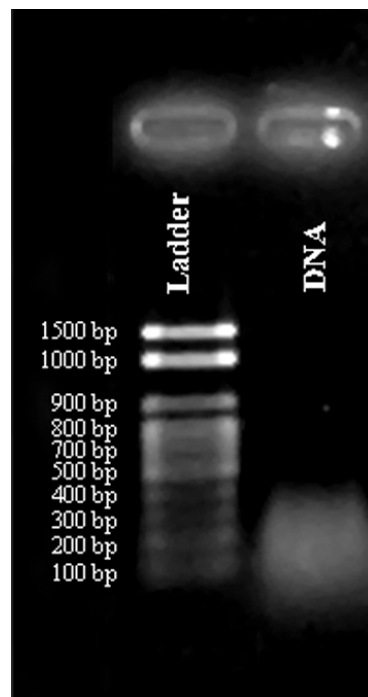


Figura 1 - Gel de agarose 1 % evidenciando DNA de *Apareiodon* sp. submetido à cinética de reassociação e digestão enzimática com S1 nuclease (C_0t-1 total). Os tamanhos dos fragmentos gerados foram de 40 pb a 400 pb.

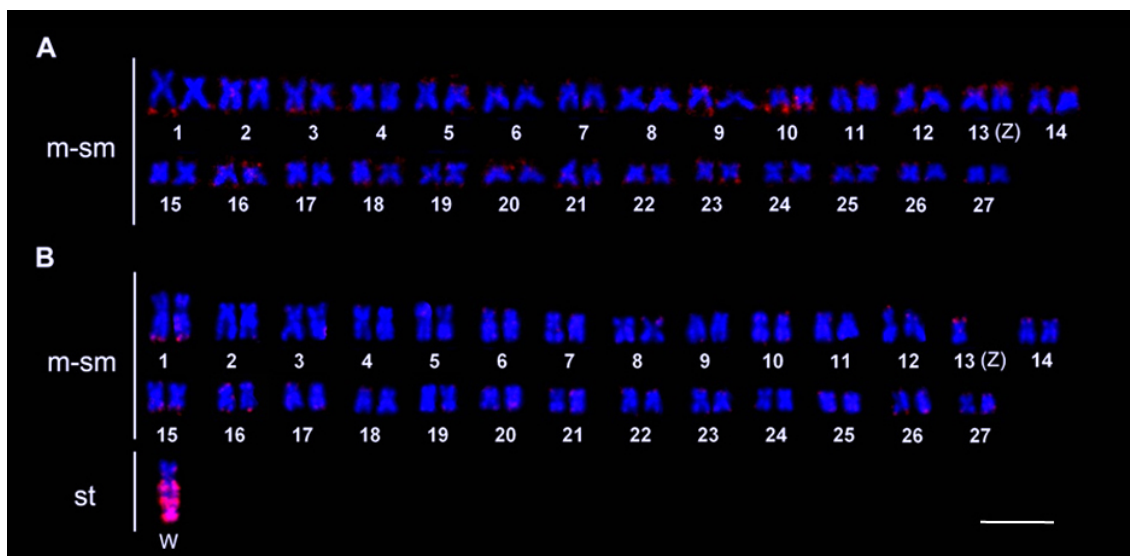


Figura 2 - Cariótipos de *P. hilarii* submetidos à FISH com a sonda C₀t-1 total. Em (A) cariótipo de macho de *P. hilarii* com sítios em regiões terminais de vários cromossomos e na região pericentromérica do braço curto do cromossomo Z; em (B) cariótipo de fêmea com sítios em regiões terminais de vários cromossomos e em quase todo braço longo do cromossomo W. Escala barra= 5μm.

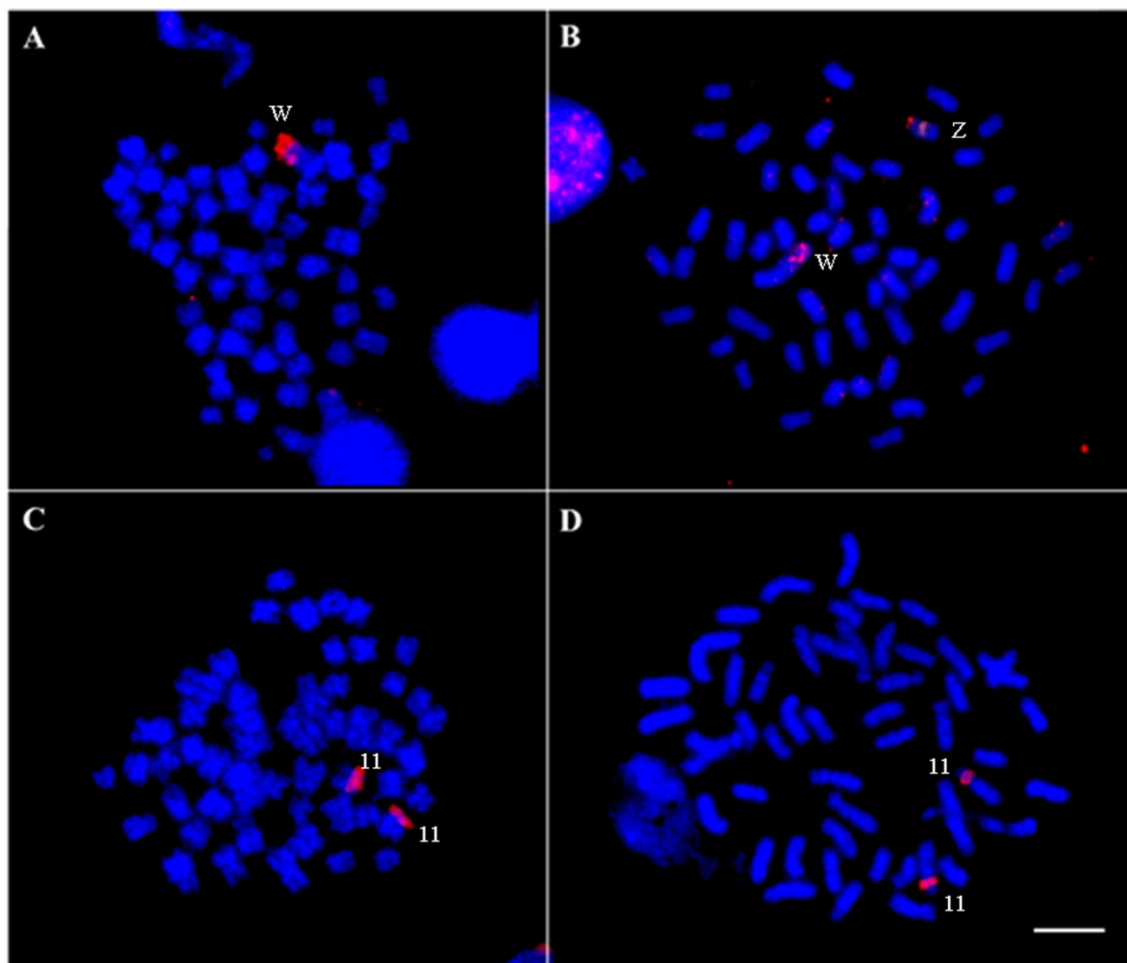


Figura 3 - Localização dos sítios do elemento tranponível *Helitron* - clone 9 (**A** e **B**) e rDNA 5S - clone 10 (**C** e **D**) por FISH em metáfases de fêmeas das espécies *Apareiodon* sp. (**A** e **C**) e *P. hilarii* (**B** e **D**). Foram evidenciados sítios terminais do *Helitron* no braço longo dos cromossomos Ws de ambas as espécies e marcação proximal e terminal no braço curto do cromossomo Z de *P. hilarii*. O rDNA 5S está presente na região pericentromérica do par 11 de ambas as espécies analisadas. Escala barra= 5 μ m.

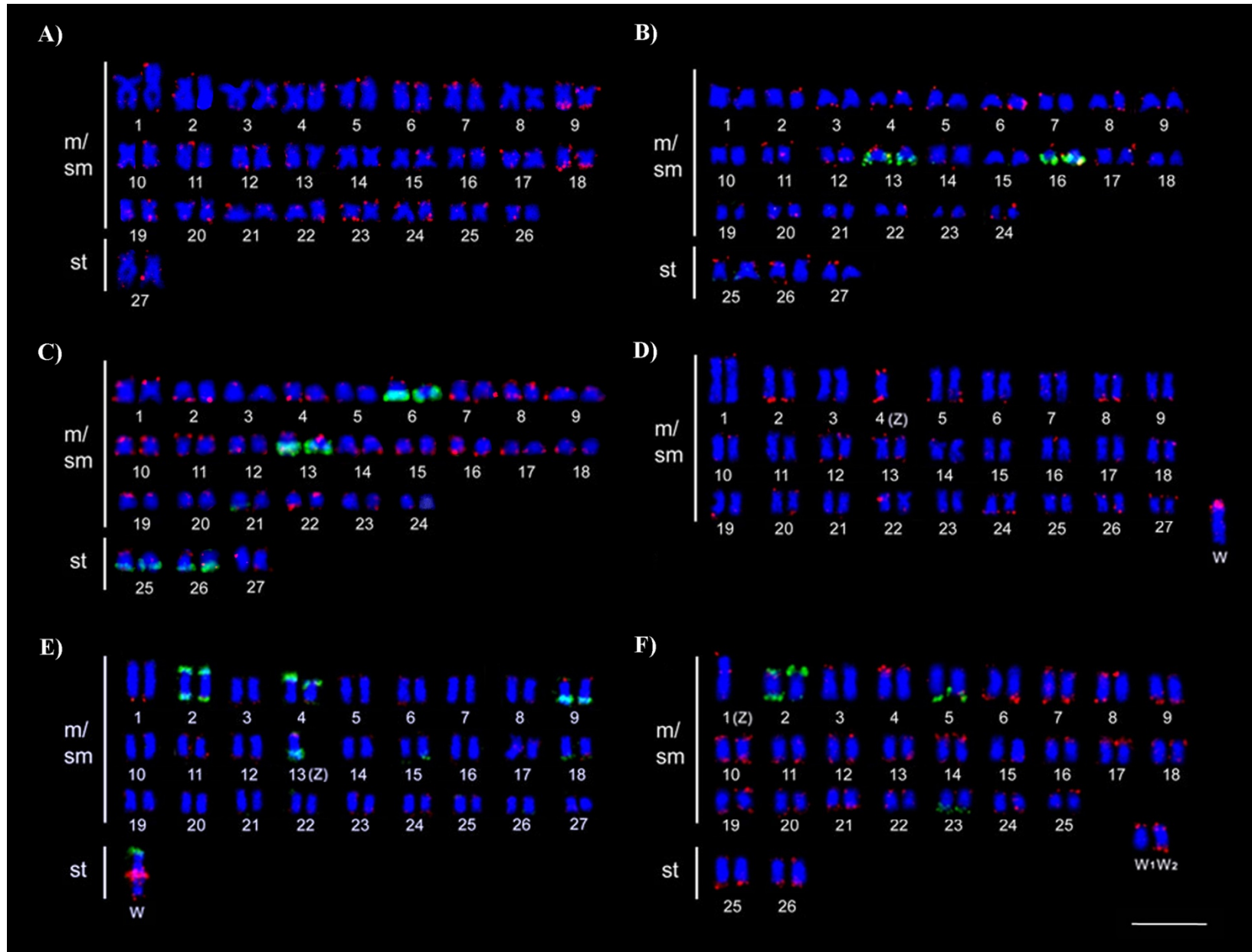


Figura 4 - Cariótipos submetidos à FISH utilizando a sonda do clone 4 (sinais em vermelho) e do DNA satélite pPh2004 (sinais em verde). Em **A** fêmea da espécie *A. piracicabae*; em **B** fêmea da espécie *P. pongoensis*; em **C** fêmea da espécie *P. nasus*; em **D** fêmea da espécie *A. hasemani*; em **E** fêmea de *P. hilarii*; **F** fêmea de *A. affinis*. Os sítios do clone 4 foram localizados em regiões terminais de vários cromossomos do cariótipo de todas as espécies analisadas, nos cromossomos W de *A. hasemani* e *P. hilarii* e no cromossomo Z de *A. affinis*. Escala barra= 5µm.

4.3 Capítulo III: Perda de identidade e exaptação molecular do elemento transponível Tc1-Mariner em genomas de peixes (Teleostei; Parodontidae)

Resumo

Os elementos transponíveis (TE) possuem a habilidade de mover-se de um local para outro no genoma de eucariotos, e fazem este processo via um RNA intermediário (retrotransposons) ou diretamente como DNA (elementos de DNA). Entretanto estas sequências são predispostas a altas taxas de mutação sendo que a maioria esta presente no genoma como cópia degradada, podendo assim sofrer processos de exaptação molecular onde passam a desempenhar novas funções no genoma. Assim, neste estudo foi realizada a caracterização molecular do Tc1-Mariner, seu mapeamento físico, análise de deterioração por divergência nucleotídica e verificação deste TE como possível fonte para a origem de sítios de regulação gênica nos genomas de peixes da família Parodontidae. O padrão de distribuição do elemento Tc1-Mariner nas espécies de Parodontidae foi em regiões eucromáticas, com pequenos acúmulos terminais em diferentes espécies de Parodontidae. Em relação à análise de expressão há atividade transcricional deste elemento nas gônadas de macho e fêmea. Os resultados também demonstraram alto índice de deterioração deste TE, e por análise de alinhamento verificou-se alta similaridade com alguns sítios regulatórios (TBPS) presentes no banco de dados do peixe *Danio rerio*. Esses dados indicam um provável recrutamento do Tc1-Mariner para desempenhar novas funções no processo de regulação gênica no genoma de Parodontidae.

Palavras-chave: citogenética, DNA repetitivo, domesticação molecular, sítios regulatórios, transposon.

Introdução

Os elementos transponíveis (TEs) são sequências de DNAs repetitivos dispersos capazes de se moverem no genoma e apresentam alto potencial mutagênico (KIDWELL et al., 2002). Estes elementos estão presentes em grande abundância nos eucariotos (KIDWELL et al., 2002; WIKER et al., 2007) por possuírem a habilidade de aumentar sua cópia na ausência de seleção. Como defesa de possíveis efeitos prejudiciais de TEs ativos, a evolução molecular do genoma hospedeiro resultou em mecanismos epigenéticos que suprimem sua atividade (SLOTKIN et al., 2007). Entretanto estudos têm relatado sua importância para evolução e função genômica (FESHOTTE e PRITHAM, 2007; FESCHOTTE, 2008).

Há uma grande diversidade dos TEs, os quais são classificados de acordo com seu mecanismo de transposição. Os TEs eucarióticos são classificados como elementos de Classe I: os retrotransposons que dependem de um RNA intermediário para se mover; e os de Classe II: os transposons de DNA que se movem diretamente no genoma (WIKER et al., 2007). Ambas as classes existem como elementos autônomos e não autônomos. As cópias autônomas codificam todas as enzimas necessárias para a transposição enquanto que as não autônomas não apresentam capacidade codificante e sua mobilização no genoma depende das enzimas produzidas pelos elementos autônomos (WIKER et al., 2007).

A grande maioria dos TEs nos genomas está presente como cópias não autônomas geradas como resultado de um processo de degradação, uma vez que quando inativados acumulam mutações perdendo sua identidade. Assim, o “ciclo de vida” de um TE consiste na invasão no genoma hospedeiro, aumento do seu número de cópias, sua inativação e eliminação (KIDWELL, 2001). Entretanto os TEs mutados podem comportar-se nos genomas como “sequências neutras” e passar por um processo evolutivo de “domesticação molecular” onde ele perde sua característica de TE e adquire novas funções genômicas a favor do

hospedeiro (SINZELLE et al., 2009). De fato, estudos tem demonstrado sua importância na regulação gênica tanto a nível transcricional, fornecendo novos sítios de ligação a fatores de transcrição, como a nível pós-transcricional editando RNAs ou atuando na tradução (FESCHOTTE, 2008; HERPIN et al., 2010). Além disso, eles podem também ser fontes de novas combinações para *splicing* (MARINO-RAMIREZ et al., 2005), e contribuírem para origem de novos genes e RNAs não codificantes (LONG et al., 2003; KAPUSTA et al., 2013).

Dentro dos elementos de Classe II, a superfamília do Tc1 – Mariner está presente em diversos táxons. Estes elementos são caracterizados por possuir um tamanho de cerca de 1000–5000 pb, com repetições terminais invertidas (TIRs), domínio catalítico composto por DDE (aspartato/aspartato/glutamato) ou DDD (aspartato/aspartato/aspartato) e domínio de ligação ao DNA (PLASTERK et al., 1999). Quando estes elementos sofrem degradação intensa eles passam a ser chamados de MITEs (elementos transponíveis miniatura não autônomos), que são pequenos elementos não autônomos com repetições invertidas, os quais estão presentes em grande número nos genomas (FERNÁNDEZ-MEDINA et al., 2012).

Os estudos com TEs são bastante promissores para o entendimento da funcionalidade genômica. Na família Parodontidae, que é um grupo de peixes neotropicais, há somente a descrição qualitativa no que se refere aos DNAs repetitivos relacionando-os com processos de evolução, diversificação cariotípica e origem do sistema de cromossomos sexuais (BELLAFRONTTE et al., 2011; SCHEMBERGERER al., 2011). Assim, o objetivo deste estudo foi realizar a caracterização molecular do Tc1-Mariner, localizá-lo *in situ* nos cariótipos de Parodontidae, analisar a deterioração deste TE e, verificar estas sequências como possíveis fontes para a origem de sítios de regulação gênica nos genomas de Parodontidae.

Material e Métodos

Espécies analisadas, preparações cromossômicas e extração de DNA.

Nove espécies de dois gêneros de Parodontidae foram utilizadas: *Apareiodon piracicabae*, *A. vittatus*, *Apareiodon sp.*, *A. vladii*, *A. affinis*, *A. hasemani*, *Parodon hilarii*, *P. pongoensis* e *P. nasus* (Tabela 1). As preparações cromossômicas foram obtidas das células do rim anterior usando o procedimento de “*air drying*” (BERTOLLO et al., 1978), e o DNA genômico de todas as espécies, sendo um exemplar de cada sexo (Tabela 1), foi obtido pelo método CTAB segundo MURRAY e THOMPSON (1980).

Reação da cadeia polimerase (PCR) e clonagem

A amplificação por PCR do elemento Tc1-Mariner foi realizada utilizando apenas um primer 5'CACTCACCGGCCACTTTATTA 3', o qual foi desenhado neste estudo a partir da região da TIR da sequência Tc1-Mariner, da espécie *Takifugu rubripes* (SMIT, 2002) (GenBank: AJ620741.1). A PCR foi realizada em uma reação de 50 µl contendo 0,4 µM de primer, 70 ng de DNA genômico, 0,16 mM de dNTPs, 1x tampão da reação, 2,5 mM de MgCl₂ e 1U de *Taq* polimerase (Biotools). O programa da reação foi: desnaturação inicial por 5 min a 94 °C, 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 64 °C por 1 min, e 72 °C por 1 min e 30 s e extensão final a 72 °C por 5 min. O produto de PCR foi visualizado em gel de agarose 1 %. O produto da PCR obtido do DNA genômico das nove espécies de Parodontidae foi purificado com ExoSAP (GE healthcare), inserido no vetor pTZ57R/T (Kit Fermentas) e clonado nas células competentes DH5α *E.coli*.

Sequenciamento e caracterização molecular do elemento Tc1-Mariner

Os clones positivos foram submetidos ao sequenciamento automático em equipamento ABI-PRISM Genetic Analyzer. As sequências de nucleotídeos foram submetidas ao CENSOR online software (JURKA et al., 2005), RepeatMasker (<http://www.repeatmasker.org>) e BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para confirmar a identidade com o elemento Tc1-Mariner e por ocasião de submissão do artigo serão depositadas no banco de dados do *Genetic Information Research Institute* (<http://www.girinst.org/>) e do *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Para o alinhamento de diferentes regiões destas sequências foi utilizado o algoritmo MUSCLE (EDGAR, 2004). A pesquisa de ORFs (*Open Reading Frames*) e tradução em proteína foram realizadas usando o software Geneious 4.8.5 (DRUMMOND et al., 2009). Para identificação dos domínios proteicos foi empregado o banco de dados Pfam (FINN et al., 2010). O programa MUST (<http://csbl1.bmb.uga.edu/ffzhou/MUST/>) foi utilizado para identificação de MITEs (CHEN et al., 2009).

Similaridade entre as sequências (Plotcon)

As sequências do Tc1-Mariner obtidas de todas as amostras foram analisadas pelo programa EMBOSS Plotcon (<http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/plotcon>), o qual fornece uma representação gráfica da similaridade ponto por ponto do alinhamento entre as sequências. Esta análise foi conduzida para diferentes regiões do elemento Tc1-Mariner. O valor de *Wsize* estipulado para este estudo foi igual a 5. A similaridade de cada posição é tomada como sendo a média de todos os possíveis *scores* aos pares das bases nessa posição. Os *scores* aos pares são retirados da matriz de similaridade especificada. A média da similaridade de posição dentro da janela é traçada contra as posições no alinhamento. A similaridade média é calculada:

$$\text{Av.Sim: } \frac{\text{sum}(M_{ij} * w_i + M_{ji} * w_j)}{(\text{Nseq} * \text{Wsize}) * ((\text{Nseq} - 1) * \text{Wsize})}$$

Onde, sum: sobre a coluna*tamanho da janela; w: ponderação da sequência; M: tabela de comparação da matriz; i, j: em relação ao resíduo i ou j; Nseq: número de sequências no alinhamento; Wsize: tamanho da janela.

Distância genética e estatística

Como complementação dos resultados do Plotcon, análises quantitativas do número de substituições de base por sítio entre as sequências foram calculadas usando o MEGA 5.0 (TAMURA et al., 2011). As análises foram conduzidas utilizando o modelo de Kimura 2-parâmetros para diferentes regiões do Tc1-Mariner. A taxa de variação entre os sítios foi modelada com a distribuição gamma configurado para parâmetro 1.

Os valores obtidos das distâncias foram então submetidos ao programa estatístico Sistema R (<http://www.Rproject.org>). Neste estudo foram utilizados testes não paramétricos Krustall-Wallis e ad-hoc Tukey para comparação entre diferentes amostras. As diferenças foram consideradas significativas a um valor de $p < 0.05$.

Cobertura dos TEs em regiões promotoras gênicas

O alinhamento dos TEs com sítios de ligação para fator de transcrição do banco de dados de *Danio rerio* foi determinada utilizando o MatInspector do portal Genomatix (<http://www.genomatix.de/>). Somente foram consideradas a sobreposição mínima de 10 pb e matriz de similaridade com valores igual ou maior que 0.95.

Extração de RNA e análise de expressão

O RNA total foi extraído de gônadas de macho e fêmea da espécie *Apareiodon sp.* utilizando o reagente TRIZOL (Invitrogen). O DNA complementar (cDNA) foi obtido pelo *First Strand cDNA Synthesis Kit* (GE healthcare), seguindo instruções do fabricante, utilizando primers randômicos. A PCR do elemento transponível Tc1-Mariner foi realizada utilizando os primers Forward 5' AGAGGTCGGAGGAGAATG 3' e Reverse 5' TTCGATGAGCTTGTGCAAAT 3' desenhados a partir da sequência de fêmea da espécie *A. piracicabae* obtida neste estudo. A reação foi realizada utilizando 10 ng de cDNA, 0.25 µM de cada primer, 0.2 mM dNTPs, 1.25 mM de MgCl₂ e 1U Taq (Biotools). O programa da reação foi: desnaturação inicial por 5 min a 94 °C, 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 55 °C por 50 s, e 72 °C por 1 min e 30 s e extensão final a 72 °C por 5 min. O produto de PCR foi visualizado em gel de agarose 1%.

Hibridação in situ fluorescente (FISH)

A FISH nas espécies *P. hilarii* e *A. affinis* foi realizado utilizando a sonda do clone Tc1-Mariner da espécie *Apareiodon sp.* (sequência 3c). A sonda do clone Tc1-Mariner foi marcada com digoxigenina 11-dUTP por PCR utilizando os primers do vetor. A PCR foi realizada contendo 20 ng de molde, 1 x tampão da reação, 2 mM MgCl₂, 40 µM dATP, dGTP e dCTP, 28 µM dTTP, 12 µM 11-dUTP-digoxigenina (Roche Applied Science), 0.3 µM de cada primer e 1 U de *Taq* polimerase (Invitrogen). O programa da reação foi: desnaturação inicial por 5 min a 94°C, 35 ciclos de 94°C por 45s, 51°C por 45s, e 72°C por 1 min e 30s e extensão final a 72°C por 5 min. O procedimento geral da FISH sob alta condição de estringência (2,5 ng/µL sonda, 50 % formamida, 2x SSC, 10% sulfato dextrano, 37 °C por 16 h) seguiu o procedimento geral descrito por PINKEL et al. (1986). A detecção do sinal foi realizada com o anticorpo avidina anti digoxigenina rodamina (Roche Applied Science). Os

cromossomos foram contracorados com DAPI (0,2 µg/ml) em meio de montagem Vectashield (Vector), e analisados no microscópio de epifluorescência Olympus BX41 acoplado ao sistema de captura de Imagens DP 71 (Olympus). Os cromossomos foram organizados em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm) e subtelocêntricos (st), dependendo da razão de braços (LEVAN et al., 1964).

Resultados

Caracterização molecular do elemento Tc1-Mariner

O produto da PCR gerado pela amplificação, utilizando o DNA genômico como molde, com primer do Tc1-Mariner resultou em 23 fragmentos de cerca de 1200 pb nas espécies analisadas, com exceção de *P. hillarii* e *P. pongoensis* em que os 6 fragmentos gerados foram menores que 600 pb (Tabela 1; Anexo VIII). Os resultados do sequenciamento demonstraram que a análise destas sequências pelo CENSOR e RepeatMasker revelaram alta similaridade de cerca de 93% e 91.5% com Tc1-Mariner não autônomo das espécies *Danio rerio* e *Takifugu rubripes* respectivamente, com exceção das sequências de *P. hillarii* e *P. pongoensis* que apresentaram valores menores de similaridade devido ao alto nível de degradação quando comparada com as demais espécies. A identificação dos domínios proteicos pelo Pfam confirmou que os TEs de todas as espécies estudadas são não autônomos com diferentes níveis de mutação (Figura 1).

As TIRs destes elementos são sequências curtas de 27 pb com espécies com tamanhos menores desta região (Figura 2). A maioria das sequências analisadas possuem os dinucleotídeos TA localizados no final de ambas as TIRs, além dos sítios adjacentes compostos por CA na TIR 5' ou TG na TIR 3'. As sequências com maior deterioração nesta região foram as das espécies *P. pongoensis* e *P. hillarii* (Figura 2).

A ORF que codifica a enzima transposase (cerca de 346 aminoácidos) contém três domínios: *homeodomain-like-domain* (HLD), *helix-turn-helix* (HTH) e DDE endonuclease sendo que ao menos um estava truncado em todas as sequências analisadas (Figuras 1 e 3). Os domínios HLD e HTH foram considerados íntegros pelo Pfam na maioria das sequências, apesar de muitos deles apresentarem alterações na matriz de leitura quando comparados com o consenso (Figura 3). O motif DDE detectado, sendo que a distância do segundo D e o E foi de 33 aminoácidos (Figura 3). Muitas sequências evidenciaram mais de uma ORF devido à presença de códons precoces de parada, entretanto o Pfam identificou domínios nestas ORFs sendo que na maioria das vezes uma ORF codificava HLD e HTH e outra o DDE endonuclease. É importante destacar que a primeira ORF das sequências 2b, 2e, 2f pode codificar uma proteína com ambos os domínios de ligação ao DNA íntegros.

Nas sequências das espécies *P. hilarii* e *P. pongoensis* não foram encontradas ORFs válidas, e quando submetidas ao MUST todas foram consideradas MITEs com exceção da sequência 3h, sendo os valores de similaridade maiores que 0.57.

Similaridade e Distância genética

Para estas análises o elemento Tc1-Mariner foi dividido nas seguintes regiões: A - TIR 5'; B - região interna sem as TIRs; C- TIR 3'; D- ORFs; E - domínio HLD; F - domínio HTH; G- domínio DDE endonuclease; H - todas as sequências completas. Além disso, foram também analisadas: I- amostra com as sequências completas com baixo nível de degradação, não incluídas as espécies *P. hilarii* e *P. pongoensis* e J- amostra contendo somente sequências com alto nível de degradação das espécies *P. hilarii* e *P. pongoensis*.

Os resultados de similaridade pelo Plotcon mostraram diversas regiões nas sequências de Tc1-Mariner com mutações pontuais do tipo inserções, substituições e deleções. Na TIR 5' e TIR 3' há uma maior divergência na região de reconhecimento pela

transposase (destacado em vermelho, Figura 4 a, c; Anexo IX). No gráfico das sequências de Tc1-Mariner completas, ou sem a região da TIR, há uma grande divergência na região entre 450 pb e 1150 pb ou 400 e 1100 respectivamente (destacado em vermelho), devido a deleções nesta região observadas nas sequências de *P. hilarii* e *P. pongoensis* (Figura 4 b, h e Figura 4; Anexo IX), as quais são MITEs com exceção da sequência 3h. O domínio que apresentou regiões (destacadas em vermelho) com elevado índice de divergência foi o DDE endonuclease (Figura 4 g; Anexo IX). As sequências com alto nível de degradação evidenciaram menor similaridade entre elas quando comparadas com as sequências menos degradadas (Figura 4 i, j; Anexo IX).

Análises em conjunto entre as sequências completas de Tc1-Mariner demonstraram uma ampla diferença da distância de Kimura 2-parâmetros (Figura 5 h). Entretanto comparações pontuais entre várias sequências de espécies diferentes analisadas duas a duas mostraram distância igual a zero. Quando retirada da amostra as sequências de *P. hilarii* e *P. pongoensis* com alto nível de degradação a diferença entre as distâncias diminuem consideravelmente com poucas variações em torno de zero (Figura 5 i). As distâncias com maiores amplitudes foram encontradas para a região interna (Figura 5 b). As sequências de *P. hilarii* e *P. pongoensis* apresentaram altos valores de distância como demonstrados no gráfico da figura 5 j, sendo a comparação entre as sequências com baixo nível de degeneração (figura 5i) com diferenças significativas ($p < 0.05$ pelo teste de Kruskal-Wallis e $p = 0$ pelo teste de Tukey). As TIRs 5' e 3' apresentaram pouca divergência entre si (Figura 5 a, 5c).

A região interna possui uma maior distância quando comparado com a TIR 5' e a TIR 3' (Figura 5a; 5b; 5c), resultado que foi significativo ($p < 0.05$ pelo teste de Kruskal-Wallis e $p = 0$ pelo teste de Tukey para ambas as comparações). Houve também diferença significativa ($p < 0.05$ pelo teste de Kruskal-Wallis e $p = 0$ pelo teste de Tukey) das análises entre a região interna e a ORF (Figura 5b; 5d), também com amplitude de distância maior

para a região interna. A amplitude da divergência entre as sequências correspondentes ao domínio HTH foi maior do que a do domínio HLD, apesar de ser somente significativo pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0.05$). Diferenças significativas ($p < 0.05$) para este mesmo teste foram obtidas entre comparações do domínio HTH e DDE endonuclease (Figura 5).

Tc1-Mariner como fonte de sítios regulatórios

A sobreposição das sequências de Tc1-Mariner com sítios regulatórios do banco de dados de *Danio rerio* (Matinspector) resultou em 63 *hits* com matriz de similaridade ≥ 0.95 de fragmentos com no mínimo 10 pb. Foram sobrepostos sítios de ligação para fator de transcrição (TFBS) de várias famílias presentes em diversos tecidos conforme descrito na tabela 2. É importante destacar que 9 TFBSs: *Brachyury gene*, *mesoderm developmental factor*; *C-abl DNA binding sites*; *Cart-1*; *EVII-myeloid transforming protein*; *Fork head domain factors*; *Myeloid zinc finger 1 factors*; *NKX homeodomain factors*; *Pleomorphic adenoma gene*; *TALE homeodomain class recognizing TG motifs* possuem score igual a 1 na matriz de similaridade em pelo menos uma das sequências do TE analisado (Figuras 6 e 7, Tabela 2).

Mapeamento físico e expressão do elemento tc1-Mariner

O padrão de distribuição do elemento Tc1-Mariner nas espécies *P. hylarii* e *A. affinis* foi em regiões eucromáticas, com pequenos acúmulos terminais em espécies de Parodontidae (Figura 8). Em relação à análise de expressão há atividade transcricional deste elemento, sendo que os fragmentos gerados pela PCR utilizando como molde RNAs sintetizados nas gônadas foi de cerca de 200 pb (Figura 9).

Discussão

Caracterização molecular do elemento Tc1-Mariner em Parodontidae

Parodontidae é uma família de peixes com distribuição Neotropical utilizada como modelo para estudo da diferenciação cariotípica por apresentar espécies sem cromossomos sexuais diferenciados, espécies com proto-cromossomos sexuais e espécies com sistemas de cromossomos sexuais ZZ/ZW e ZZ/ZW₁W₂ heteromórficos (SCHEMBERGER et al., 2011). Entretanto, estudos relacionados com a caracterização molecular de TEs ainda não foram realizados com o grupo de peixes.

Por muitos anos os TEs foram considerados parasitas genômicos. A mobilidade destes elementos nos genomas pode produzir uma variedade de efeitos danosos como inserções mutagênicas levando a inativação ou mudança no padrão de expressão gênica, além de translocações, inversões ou deleções cromossômicas (SINZELLE et al., 2009). A quebra do paradigma de TEs como sendo somente entidades egoístas ocorreu quando estudos demonstraram que alguns deles podem ser recrutados pelo genoma para executar novas funções celulares, o que é chamado de processo de “domesticação”, “co-opção” ou “exaptação” molecular. Exemplos destes processos foram relatados com os elementos de classe II como o *Transib*, envolvido com a origem da recombinação V[D]J para a diversidade de imunoglobulinas em vertebrados (KAPITONOV e JURKA, 2005), o Tc1-Mariner relacionado com a origem do gene STEMAR em primatas e também do sítio regulatório PAX6 em metazoários (FESCHOTTE, 2008) e, elementos Rex e Izanagi que invadiram o promotor do gene DMY (gene duplicado do Dmrt1) para a determinação sexual do peixe medaka (HERPIN et al., 2010).

O elemento Tc1-Mariner neste estudo foi caracterizado como não autônomo (Figura 1) por possuir na região terminal das TIRs o dinucleotídeo TA (Figura 2) na maioria das

sequências analisadas. Este sítio em posição terminal é reconhecido pela enzima transposase no processo de transposição (PLASTERK et al., 1999; MUÑOZ-LÓPEZ e GARCÍA-PÉREZ, 2010). Além disso, estudos relatam que as transposases parecem reconhecer algumas bases ao lado da sequência de TA por determinar a frequência com que a transposição em um TA particular ocorre (KETTING et al., 1997). No presente estudo foi encontrado com frequência os nucleotídeos CA na TIR 5' e TG na TIR 3', semelhante ao detectado na espécie de *Tetraodon nigroviridis*, que é taxonomicamente distante de Parodontidae. Por outro lado as sequências consideradas como MITEs não apresentaram estes nucleotídeos adjacentes, indicando que elas podem estar não ativas.

Os domínios HLD, HTH e o DDE endonuclease foram detectados pelo Pfam na ORF correspondente a transposase. Contudo, pelo menos um domínio está truncado nas sequências de Tc1-Mariner de Parodontidae, indicando que são transposons não autônomos, e alguns podem não estar ativos por possuírem mutações do tipo deleção, transição ou transversão no dinucleotídeo TA terminal (Figuras 1 e 2). Os domínios HLD e HTH são íntegros na maioria das sequências estudadas, com baixas taxas de mutações (gráfico Plotcon - Figura 4 e, f), ou devido à ocorrência de mutações sinônimas.

A literatura caracteriza a enzima transposase de Tc1-Mariner com a presença do domínio HTH necessário para o reconhecimento e ligação nas TIRs e o domínio DDD ou DDE catalítico que é responsável pela clivagem do DNA, sendo este último essencial para a atividade da transposase. A distância entre os dois primeiros Ds são variáveis, enquanto que a distância entre os dois últimos são constantes (SHAO e TU, 2001). Neste estudo o motif DDE foi detectado nas sequências que apresentaram uma ORF e os três domínios proteicos (Figura 3). Entretanto, a sequência 3e apresentou mutação no códon correspondente ao segundo D. A distância entre o segundo D e o E foi de 33 pb (Figura 3) que é conservada para este elemento (PLASTERK et al., 1999). Outros domínios da transposase são descritos na literatura, como o

HLD, o qual foi encontrado nas espécies de Parodontidae, e também está envolvido no processo de ligação ao DNA (PLASTERK et al., 1999).

No presente estudo a maioria das sequências Tc1-Mariner possuem um tamanho de 1200 pb, com exceção das sequências consideradas MITEs (Tabela 2). As TIRs tiveram tamanho de cerca 27 pb (Figura 2), e a transposase truncada apresentou 347 a.a. (Figuras 3). A superfamília dos TEs Tc1 – Mariner possui uma ampla distribuição nos eucariotos (FESCHOTTE PRITHAM, 2007), entretanto a maioria encontrada nos genomas analisados está inativa, inclusive no peixe *Danio rerio* (IZSVFIK et al., 1995). Somente foram encontrados cópias autônomas nas espécies *C. elegans*, *Drosophila hydei*, *D. mauritiana*, *Fusarium oxysporum*, *Oryza sativa*, *Fusarium oxysporum*, *Messor bouvieri* (MUÑOZ-LÓPEZ, 2010 para revisão) e *Anopheles gambiae* (Fernández-Medina et al., 2012). Em Parodontidae todas as cópias amplificadas foram de sequências mutadas (TEs não autônomos), que dependem de um TE autônomo para se mover no genoma.

Deterioração molecular do elemento Tc1-Mariner em Parodontidae

O ciclo de vida dos transposons é o processo de nascimento-morte destes elementos. Novos TEs podem se originar no genoma por transferência horizontal (OLIVEIRA et al., 2012) ou por eventos de mutação e recombinação de sequências no genoma (FINNEGAN, 1985). Após este evento há uma rápida propagação e aumento do número de cópias no genoma. No caso dos elementos de Classe II, estes aumentam seu número pela transposição durante a replicação cromossômica de uma posição que já tenha sido replicada a outra região onde ainda não tenha ocorrido este processo, alternativamente eles podem criar uma cópia extra no sítio doador durante o processo de reparo (WIKER et al., 2007). O passo seguinte é a deterioração, em que há redução crescente da mobilidade do elemento devido ao fato do acúmulo de cópias defectivas ou ao seu silenciamento epigenético causado pelo genoma

hospedeiro (SLOTKIN e MARTIENSSEN, 2007), até serem eliminados ou passarem por processos de exaptação.

Em Parodontidae as sequências de Tc1-Mariner possuem diferentes níveis de mutação, sendo a espécie *P. hilarii* que apresenta cromossomos sexuais heteromórficos, com extensivo acúmulo de DNAs repetitivos e *P. pongoensis* com os maiores índices de deterioração. Quando analisadas em conjunto, as espécies de Parodontidae evidenciaram estas sequências com uma ampla diversidade (Figura 5 h) devido ao fato de que os elementos de Classe II tendem a incorporar substituições nucleotídicas e supressões internas que estão relacionadas com a formação de MITEs (FERNÁNDES-MEDINA et al., 2012).

Este processo de deterioração onde os TEs divergem de sua sequencia original, tanto na sua estrutura como também na composição de nucleotídeos, é esperado dentro de um genoma. Os TEs de diferentes classes e ordens podem incorporar erros de diferentes maneiras de acordo com o seu mecanismo de transposição (FERNÁNDES-MEDINA et al., 2012), além disso, o processo de metilação do TEs como mecanismo de defesa do genoma hospedeiro acelera a sua degradação pelo aumento de taxas de mutação GC-TA (JOHNSON, 2007). O elemento Tc1-Mariner em Parodontidae parece acumular um maior número de mutações do tipo deleções na região entre 450 e 1050 pares de base (Figura 4 h), que é a região correspondente aos domínios HTH e DDE, sendo que o DDE contém regiões com maiores divergência quando comparado com os domínios HTH e HLD (Figura 4 g).

As comparações da distância pelo modelo Kimura 2-parâmetros realizadas entre diferentes regiões do elemento Tc1-Mariner indicou que a região interna possui uma maior tendência à degradação quando comparada com as regiões das TIRs, além disso, há uma maior amplitude de distância quando comparadas as região HTH com HLD e DDE, apesar de ser somente considerada significativa pelo teste de Kruskal-Wallis (Figura 5). As sequências

consideradas como MITEs diferiram entre si com valores altos de distância quando comparados com as sequências que estão menos mutadas (Figura 5 i, j).

Domesticação molecular

Como a grande maioria dos TEs nos genomas corresponde a cópias defeituosas isto favorece o recrutamento dos TEs para executar novas funções no genoma do hospedeiro. Apesar da inserção de TEs em regiões próximas ou dentro de regiões codificantes poderem causar efeitos deletérios, é esperado que alguns sofram o processo de “domesticação” pelo fato de eles constituírem uma grande proporção dentro de um genoma (ABRUSAN et al., 2013). Deste modo, a incorporação dos TEs é visualizada com uma forte influência na trajetória evolutiva dos genomas hospedeiros (FESCHOTTE e PRITHAM, 2007). Inúmeras vias tem demonstrado que os TEs podem influenciar a regulação da expressão gênica, tanto no nível transcricional com pós-transcricional (FESCHOTTE, 2008 – para uma revisão).

No presente estudo os resultados demonstraram a perda de identidade do Tc1-Mariner em Parodontidae e a ocorrência de sequências presentes em diferentes espécies com distância genética igual a 0 indica um alto nível de similaridade ou igualdade, mesmo sendo cópias de TEs não integras. A alta conservação destas sequências defeituosas indica que eles podem ter sofrido exaptação no genoma de Parodontidae. Também reforça esta proposta a ocorrência do mesmo tipo de mutação na região da TIR de reconhecimento da transposase entre algumas sequências. Assim, é provável que no início da diversificação dos Parodontidae alguns destes elementos originados por um processo de deterioração de TEs autônomos tivessem sido recrutados para novas funções genômicas. Reforça esta proposta o fato da localização cromossômica do Tc1-Mariner ser disperso pelas regiões eucromáticas, com pequenos acúmulos terminais em Parodontidae (Figura 8).

No que se refere ao processo de exaptação de proteínas dos TEs, tanto a sua atividade como seu domínio podem ser domesticados. No entanto, há evidências que as transposases são mais propensas a este processo, sendo fonte de novas ligações ao DNA (FESCHOTTE e PRITHAM, 2007). Mutações de ponto nas regiões responsáveis por codificar a transposase podem gerar alterações na matriz de leitura e por consequência novas estruturas proteicas. Entretanto estas podem carregar sítios que proporcionam a interação com outras proteínas ou com o DNA gerando alterações na resposta de um uma via regulatória ou metabólica. As ORFs que correspondem a transposases do Tc1-Mariner em Parodontidae possuem alta diversidade devido a mutações de ponto (Figura 3), indicando que elas podem estar produzindo proteínas truncadas sem utilidade para o genoma, ou estar participando de outras vias que não a da transposição. O domínio HLH identificado nas sequências de Tc1-Mariner deste estudo é comumente encontrado em fatores de transcrição (GEHRING, 1992; 1993), além disso, algumas sequências apresentaram uma ORF contendo somente os domínios HLD e HTH considerados íntegros pelo Pfam (Figura 1). Reforça esta hipótese o fato deste elemento ser expresso nos ensaios de expressão transcricional por PCR com tecido gonadal neste estudo. É importante destacar que existem muitas proteínas derivadas da transposase que parecem estar envolvidas no controle do ciclo celular, recombinação e outros aspectos relacionados à dinâmica cromossômica (FESCHOTTE e PRITHAM, 2007). Além da possibilidade de gerar proteínas de ligação ao DNA, a constatação da transcrição do elemento Tc1-Mariner em Parodontidae pode indicar que estes RNAs possam ser recrutados para gerar siRNAs, conforme já proposto em outros organismos (FESCHOTTE, 2008).

Em relação aos TEs como fontes de sítios de regulação, JORDAN et al. (2003) demonstraram que em humanos cerca de 25% de promotores são caracterizados por conter sequências de TEs derivadas, além disso, um quarto dos sítios hipersensíveis a DNase I identificado nas células T CD4⁺ possuem sobreposição com TEs, sugerindo que estes são

fontes de sequências cis-regulatórias (FESCHOTTE, 2008 para revisão). A alta similaridade das cópias não autônomas de Tc1-Mariner de Parodontidae com sítios de fator de transcrição indicam que eles são fontes ricas para regulação gênica dependendo do local onde estão inseridos, sendo que algumas sobreposições apresentaram alta matriz de similaridade com valor igual a 1 (Tabela 2). Além disso, sob o aspecto do banco de dados de *Danio rerio*, provavelmente muitos TFBSs podem ter sido originadas de TEs, por apresentarem similaridade total ou parcial com o Tc1-Mariner de Parodontidae. Como alguns destes elementos não são altamente conservados, a inserção destes elementos no DNA pode contribuir para o estabelecimento de diferentes rotas de expressão gênica. Assim, o acúmulo de TEs em decomposição fornece matéria prima de onde as sequências cis-regulatórias podem emergir como resultado de eventos evolutivos causados por mutações de ponto nestes elementos (ZHOU et al., 2002).

A distribuição destes sítios regulatórios ocorreu em grande abundância por todas as regiões das sequências de Tc1-Mariner de Parodontidae (Figuras 6 e 7). Há evidências de que os TEs tendem a se agrupar próximos a genes do desenvolvimento (LOWE et al., 2007). Neste estudo 15 dos 63 sítios de ligação para fatores de transposição que estão presentes em estruturas embrionárias tiveram alta similaridade com o Tc1-Mariner (Tabela 2), os quais foram: *Activator/repressor binding to transcription initiation site*; *Bicoid-like homeodomain transcription factors*; *Cart-1 (cartilage homeoprotein 1)*; *GATA binding factors*; *Grainyhead-like transcription factors*; *Homeobox transcription factors*; *HOX - PBX complexes*; *Human acute myelogenous leukemia factors*; *Krüppel like transcription factors*; *Microphthalmia transcription factor*; *Motif composed of binding sites for pluripotency or stem cell factors*; *Myoblast determining factors*; *NeuroD, Beta2, HLH domain*; *NKX homeodomain factors*; e *Nuclear factor 1*.

Em conclusão, a caracterização dos TEs é uma nova perspectiva para o entendimento da composição e diversificação de sítios de fatores de transcrição e de proteínas de ligação ao DNA em Parodontidae. É importante destacar que os genomas dos eucariotos são complexos no que diz respeito a redes regulatórias, assim os TEs são fundamentais para o entendimento da sua origem, evolução e funcionamento, uma vez que são entidades de grande abundância e com ampla diversidade genômica.

Agradecimentos

Os autores são gratos ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA/MMA/SISBIO nº: 15117). Este trabalho teve apoio financeiro do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico Processo:), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), SETI (Secretaria de Ciência e Tecnologia do Estado do Paraná), Fundação Araucária (Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná) e FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo).

Referências

As referências encontram-se no final desta tese.

Tabela 1: Espécies da família Parodontidae, localidade, bacia hidrográfica; nome da sequência Tc1-Mariner obtida de cada clone (a letra corresponde à espécie e os números são as sequências obtidas) e tamanho de cada sequência obtida por resultado de sequenciamento.

Espécie	Sexo	Nº de exemplares	Rio (Estado)	Bacia hidrográfica	Localização (GPS)	Nome sequência (Tc1-Mariner)	Tamanho (pb)
<i>A. piracicabae</i>	Macho	1	Rio Piumhi (MG)	São Francisco	-20°31'55" e -46°02'42"	1a	1218
<i>A. piracicabae</i>	Fêmea	1	Rio Piumhi (MG)	São Francisco	-20°31'55" e -46°02'42"	2a; 3a	1222; 1221
<i>A. vittatus</i>	Macho	1	Rio Jordão (PR)	Iguaçu	-25°42'31" e -51°53'53"	1b; 2b	1221, 1221
<i>A. vittatus</i>	Fêmea	1	Rio Jordão (PR)	Iguaçu	-25°42'31" e -51°53'53"	3b; 4b	1221; 1215
<i>Apareiodon</i> sp.	Macho	1	Rio Verde (PR)	Alto Paraná	-25°04'35" e -50°04'03"	1c; 2c	1218; 1221
<i>Apareiodon</i> sp.	Fêmea	1	Rio Verde (PR)	Alto Paraná	-25°04'35" e -50°04'03"	3c; 4c	1221; 1222
<i>A. vladii</i>	Fêmea	1	Rio Piquiri (PR)	Alto Paraná	-25°01'40" e -52°27'32"	1d; 2d	1218; 1233
<i>A. hasemani</i>	Macho	1	Rio São Francisco (MG)	São Francisco	-17°21'17" e -44°57'18"	1e; 2e	1221; 1221
<i>A. hasemani</i>	Fêmea	1	Rio São Francisco (MG)	São Francisco	-17°21'17" e -44°57'18"	3e	1221
<i>A. affinis</i>	Macho	1	Rio Passa-Cinco (SP)	Alto Paraná	-22°25'26" e -47°41'56"	1f; 2f	1229; 1221
<i>A. affinis</i>	Fêmea	1	Rio Passa-Cinco (SP)	Alto Paraná	-22°25'26" e -47°41'56"	3f	1221
<i>P. nasus</i>	Macho	1	Rio Paraguai (MT)	Paraguai	-15°34'40" e -56°09'58"	1g; 2g	1221; 1220
<i>P. nasus</i>	Fêmea	1	Rio Paraguai (MT)	Paraguai	-15°34'40" e -56°09'58"	3g; 4g	1221; 1221
<i>P. hilarii</i>	Macho	1	Córrego do Porta (MG)	São Francisco	-17°21'17" e -44°57'15"	1h; 2h	554; 476
<i>P. hilarii</i>	Fêmea	1	Córrego do Porta (MG)	São Francisco	-17°21'17" e -44°57'15"	3h; 4h	538; 233
<i>P. pongoensis</i>	Fêmea	1	Rio Taquaralzinho (MT)	Araguaia	-15°53'28" e -52°14'56"	1i; 2i	456; 456

Tabela2: Sítios de ligação de fator de transcrição (TFBS) sobrepostos nas sequencias de Tc1-Mariner de Parodontidae, sendo considerados valores de matriz de similaridade ≥ 0.95 e tamanho do TFBS ≥ 10 pb (dados obtidos pelo Matinspector).

	TFBS /Banco de dados <i>Danio rerio</i> – Matinspector	Tecido *	Tamanho do TFBS no TE		Sequencias dos TE com TFBS**
			(pb)	Matriz de similaridade	
1	Abdominal-B type homeodomain transcription factors	5; 27; 44; 12; 36; 41; 32; 31; 42	16	0.95-0.97	todas
2	Activator/repressor binding to transcription initiation site	12	22	0.95-0.99	menos 2h e 3h
3	AP1, Activating protein 1	4; 8; 10; 25; 35; 37; 38; 39	12	0.95-0.96	menos 1d; 2g; 1h-4h; 1i-2i
4	AP4 and related proteins	-	16	0.96	1h
5	Bicoid-like homeodomain transcription factors	8; 9; 10; 12; 16; 25; 26; 33; 35; 38; 39	16	0.96-0.97	menos seqs 1h; 4h; 1i; 2i
6	Brachyury gene, mesoderm developmental factor***	7; 9; 8; 12; 16; 23; 27; 33; 35; 37; 39	22	1.00	2i
7	C245; zinc finger transcription factors 6	7; 15; 18; 19; 37	12	0.95	2h e 3h
8	C-abl DNA binding sites***	7; 11; 36; 37	10	1.00	2h e 3h
9	Calcium-response elements	-	10	0.96	menos 1h-4h e 1i-2i
10	Calsenilin, presenilin binding protein, EF hand transcription factor	1; 8; 9; 21; 23; 25; 33; 39; 38; 42	10	0.95	1h-3h
11	cAMP-responsive element binding proteins	1; 8; 10; 35; 38; 39; 42	20	0.95-0.96	menos 1h-4h e 1i-2i
12	Cart-1 (cartilage homeoprotein 1)***	8; 12; 27; 33; 34; 35; 39; 41; 44	20	1.00	1i-2i
13	CCAAT binding factors	46	14	0.96-0.99	menos 4h
14	Ccaat/Enhancer Binding Protein	2; 5; 13; 14; 34; 36; 37; 43; 44	14	0.95-0.97	menos 1h; 3h; 4h
15	Cell cycle regulators: Cell cycle homology element	-	12	0.98	menos 1h-4h; 1i-2i
16	Cellular and viral myb-like transcriptional regulators	5; 7; 18; 19; 36; 37	14	0.95-0.99	menos 4h
17	CLOX and CLOX homology (CDP) factors	-	18	0.95-0.97	menos 4h
18	E-box binding factors	46	16	0.98-0.99	2h e 3h
19	EVII-myleoid transforming protein***	5; 7; 8; 12; 15; 18; 19; 25; 36; 37; 38; 39; 43; 44	16	0.99-1.00	menos 1h-4h; 1i-2i
20	Fork head domain factors***	14; 15; 17; 18; 19; 20; 23; 26; 28; 29; 31; 34; 35; 37; 38; 39; 42; 45	16	1.00	menos 6; 4h; 1i-2i
21	GATA binding factors	5; 7; 11; 12; 18; 19; 21; 23; 27; 33; 36; 37; 44	12	0.95-0.98	menos 1h; 4h
22	Grainyhead-like transcription factors	12	12	0.95	menos 2c; 3e ; 1h-4h; 1i-2i
23	Heat shock factors	46	24	0.96	menos 1h-4h; 1i-2i
24	Homeobox transcription factors	8; 12; 20; 23; 25; 26; 33; 34; 38; 39	18	0.95	menos 4b; 4h; 1h-2i
25	HOX - PBX complexes	5; 8; 12; 15; 27; 32; 36; 37; 38; 40; 39; 42; 44	16	0.96-0.98	2h; 1i-2i
26	Human acute myelogenous leukemia factors	3; 5; 12; 27; 36; 44	14	0.95	menos 1h-4h
27	Human and murine ETS1 factors	1; 2; 5; 6; 7; 13; 18; 19; 20; 22; 31; 35; 36; 37; 38; 39; 40; 42; 45	20	0.96-0.98	menos 1h-4h; 1i-2i
28	Hypoxia inducible factor, bHLH/PAS protein family	8; 10; 33; 35; 38; 39	16	0.95-0.98	menos 3f; 1h; 4h; 1i-2i
29	Ikaros zinc finger Family	5; 6; 7; 15; 18; 19; 36; 37	12	0.98-0.99	3c; 2d; 2h; 3h
30	Krüppel like transcription factors	5; 7; 11; 12; 14; 34; 36	16	0.95-0.98	menos 1h-4h; 1i-2i
31	LEF1/TCF	17; 29; 34; 35; 43; 44	16	0.96-0.97	menos 2h-4h; 1i-2i
32	MAF and AP1 related factors	5; 6; 7; 14; 17; 25; 26; 29; 30; 34; 35; 36; 37; 38	20	0.97-0.99	menos 1h; 4h
33	Microphthalmia transcription fator	2; 6; 12; 26; 32; 37; 41; 42	14	0.95-0.96	3c; 2d; 1h; 2h; 1i-2i
34	Motif composed of binding sites for pluripotency or stem cell factors	2; 6; 12; 32; 41; 42	18	0.97	3a; 2e
35	Mouse Krüppel like fator	-	20	0.98-0.99	menos 1h-4h; 1i-2i
36	Myc-interacting Zn finger protein 1	-	10	0.99	1i-2i
37	Myeloid zinc finger 1 factors***	2; 5; 7; 18; 36; 37	10	0.99-1.00	menos 1h-4h
38	Myoblast determining factors	1; 6; 7; 12; 15; 18; 19; 23; 37; 42	16	0.96-0.97	menos 2h-4h; 1i-2i
39	MYT1 C25C zinc finger protein	24; 25; 38; 39	12	1.00	4h
40	NeuroD, Beta2, HLH domain	6; 7; 8; 12; 15; 17; 18; 19; 20; 24; 25; 26; 29; 34; 35; 37; 38; 39; 40	12	0.95-0.98	menos 2h; 3h; 1i-2i
41	NKX homeodomain factors***	12; 17; 20; 21; 23; 27; 29; 31; 33; 34; 35; 38; 39; 40; 42; 44	18	0.97-1.00	menos 3h

42	Nuclear factor 1	8; 12; 14; 34; 38; 39	20	0.96-0.98	menos 1h-4h; 1i-2i
43	Nuclear factor kappa B/c-rel	2; 5; 7; 13; 18; 36; 37	14	0.95	2h; 3h
44	Nuclear factor of activated T-cells	2; 7; 9; 18; 19; 33; 37	18	0.98	2h
45	PAX-2/5/8 binding sites	5; 6; 7; 12; 18; 19; 32; 35; 36; 37; 42	28	0.96	1i-2i
46	PAX-3 binding sites	12; 23	18	0.99	menos 1h-4h; 1i-2i
47	Pleomorphic adenoma gene***	8; 25; 12; 34; 35; 38; 39	22	1.00	menos 2c; 1h-4h; 1i-2i
48	Retinoblastoma-binding proteins with demethylase activity	-	10	0.97	menos 1h-4h; 1i-2i
49	Signal transducer and activator of transcription	5; 7; 13; 18; 19; 36; 37	18	0.95	3h
50	Sine oculis (SIX) homeodomain factors	8; 12; 16; 23; 26; 32; 35; 38; 39; 42	14	0.95-0.98	menos 2h-4h; 1i-2i
51	SOX/SRY-sex/testis determinig and related HMG box factors	3; 12; 17; 24; 27; 29; 34; 35; 38; 42; 44; 45	24	0.97-0.99	menos 2e; 2h-4h
45;	Sterol regulatory element binding proteins	14; 34; 43; 44	14	0.96	3h
46	SWI/SNF related nucleophosphoproteins	-	10	0.97-0.98	3a; 2e; 2h; 1i-2i
54	TALE homeodomain class recognizing TG motifs***	2; 5; 8; 12; 25; 36; 38; 39	16	1.00	menos 2a; 2h-4h
55	TEA/ATTS DNA binding domain factors	12; 21; 23; 33; 42	12	0.97-0.99	menos 1h; 1i-2i
56	Twist subfamily of class B bHLH transcription factors	5; 6; 7; 12; 15; 18; 19; 21; 23; 27; 33; 36; 37; 41; 44	20	0.95-0.99	menos 4h; 1i-2i
57	Vertebrate caudal related homeodomain protein	12; 34	18	0.98-0.99	1h-3h; 1i-2i
58	Vertebrate homologues of enhancer of split complex	9; 12; 23; 33; 39	14	0.96-0.97	2h; 3h
59	Vertebrate SMAD family of transcription factors	12	10	0.99	menos 2f; 1h; 3h; 4h; 1i-2i
60	Vertebrate steroidogenic fator	8; 16; 28; 35; 38; 39; 42; 45	14	0.95-0.96	1a; 4b; 1e; 1f; 4h
61	Winged helix binding sites	7; 12; 15; 18; 19; 25; 26; 37; 38; 41	10	0.95-0.97	menos 1h-4h; 1i-2i
62	Y-box binding transcription factors	1; 14; 34; 35; 42; 45	12	0.95	4b; 4h; 1i-2i
63	Zinc finger protein ZNF35	-	12	0.98	menos 2a; 2b; 1h -4h; 1i-2i

* Números correspondentes aos tecidos onde estão presentes os sítios de fatores de transcrição: 1- células germinativas; 2- células mielóides; 3- cartilagem; 4- células apresentadoras de antígenos; 5- células da medula óssea; 6- células produtoras de anticorpos; 7- células sanguíneas; 8- cérebro; 9- coração; 10- epífise; 11- eritrócitos; 12- estruturas embrionárias; 13- fagócitos; 14- fígado; 15- glândula timo; 16- hipófise; 17- ilhotas de Langerhans; 18- leucócitos; 19- linfócitos; 20- medula espinhal; 21- miocárdio; 22- monócitos; 23- músculos; 24- neuroglia; 25- neurônios; 26- olhos; 27- ossos; 28- ovário; 29- pâncreas; 30- plaquetas; 31- próstata; 32- rim; 33- sistema cardiovascular; 34- sistema digestivo; 35- sistema endócrino; 36- sistema hematopoiético; 37- sistema imune; 38- sistema nervoso; 39- sistema nervoso central; 40- sistema respiratório; 41- sistema tegumentar; 42- sistema urogenital; 43- tecido adiposo; 44- tecido conjuntivo; 45- testículo; 46- todos tecidos.

** Nome de sequências de Tc1-Mariner de Parodontidae conforme tabela 1

*** TFBSs com matriz de similaridade igual a 1.

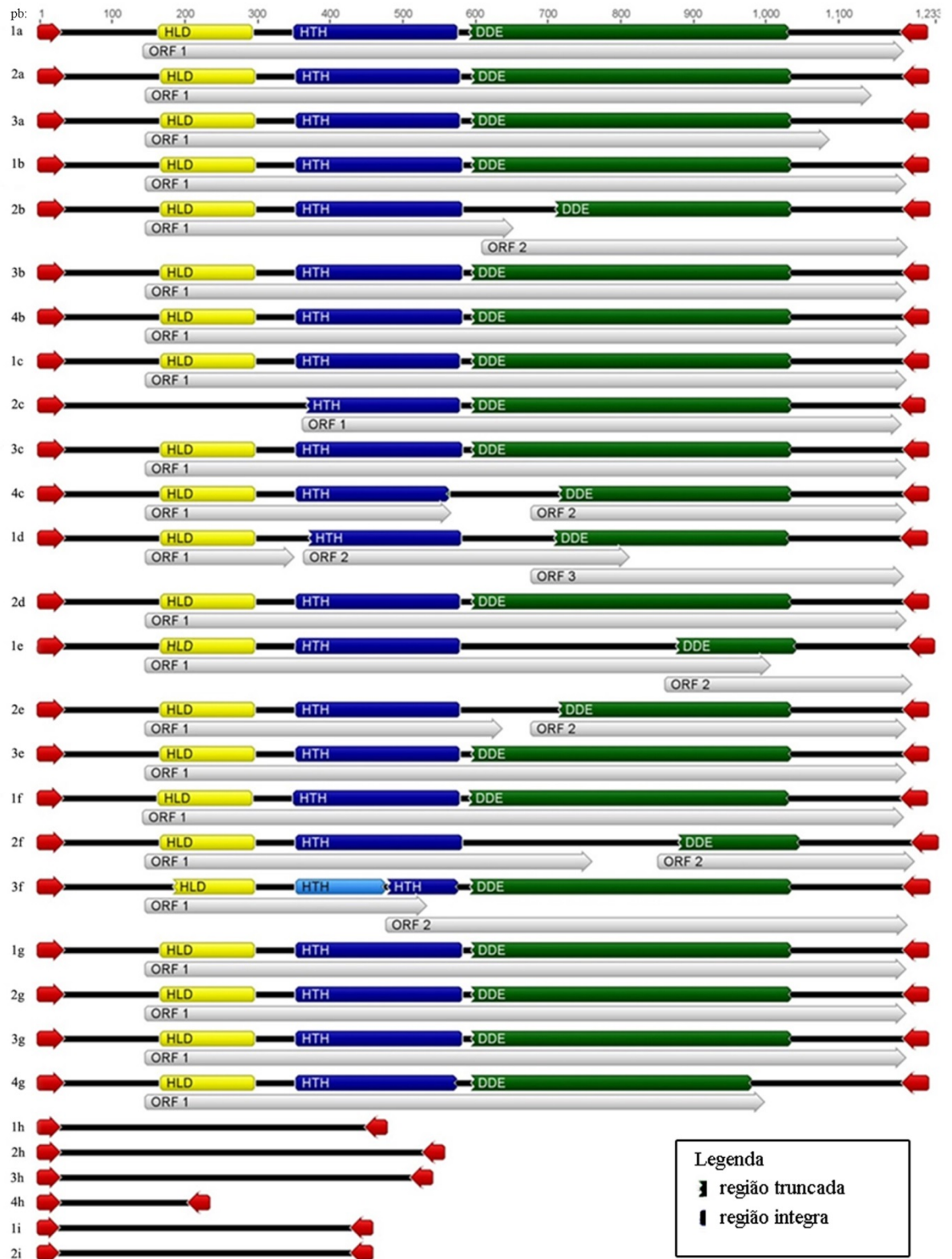


Figura 1 - Caracterização molecular das seqüências do elemento Tc1-Mariner das espécies de Parodontidae. As setas em vermelho são as regiões das TIRs; em amarelo o domínio *homeiodomain-like-domain* (HLD); em azul domínio *helix-turn-helix* (HTH); em verde DDE endonuclease (DDE). As seqüências foram traduzidas em proteínas e as análises de similaridade foram realizadas utilizando o banco de dados do Pfam que identifica domínios proteicos e os caracteriza como íntegro ou truncado. Os resultados demonstraram que pelo menos um domínio está truncado nas seqüências obtidas, sendo que as seqüências 1h- 4 e 1i-2i não apresentam domínios. Figura gerada pelo software Geneious 4.8.5 (DRUMMOND et al., 2009).

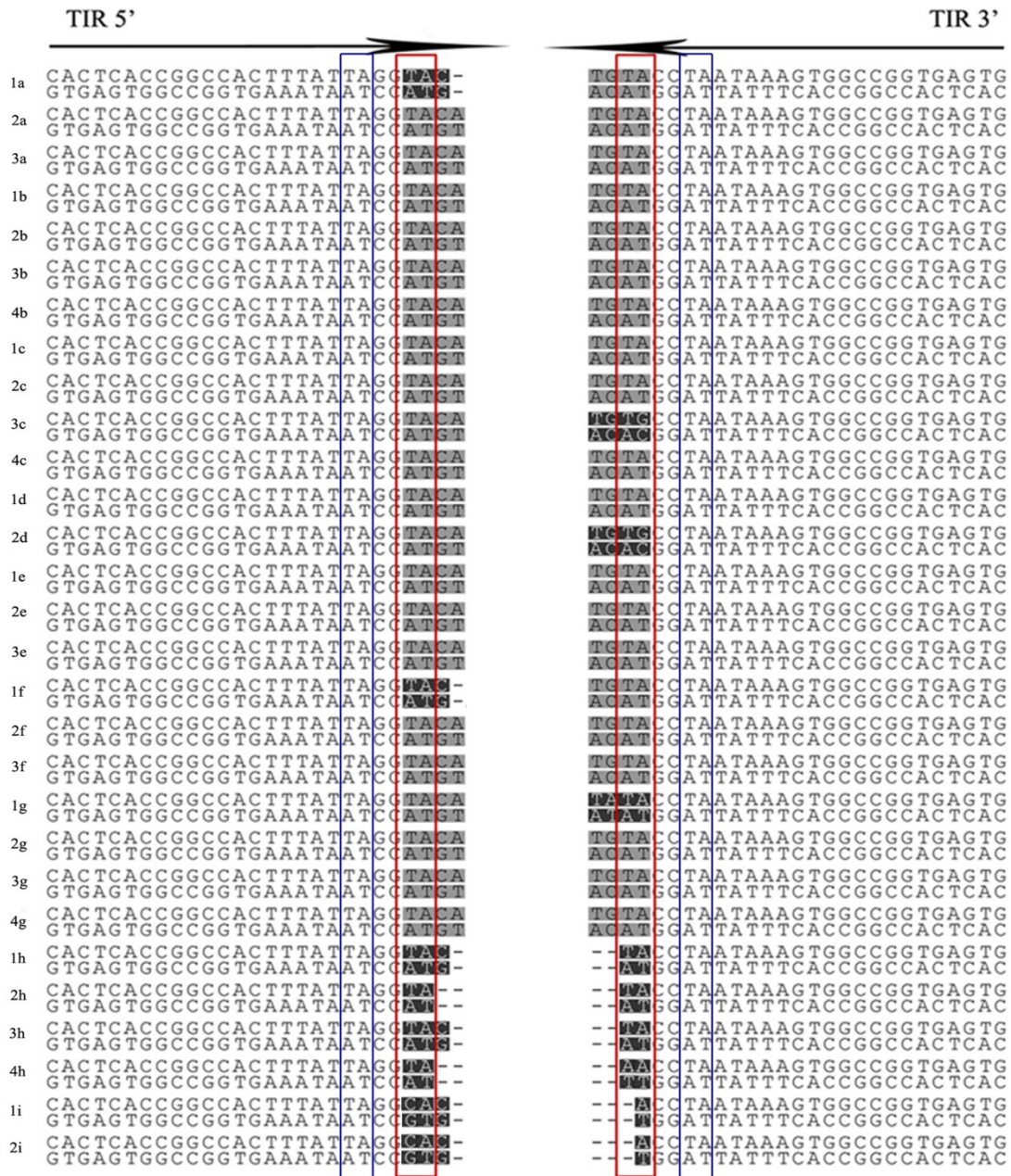
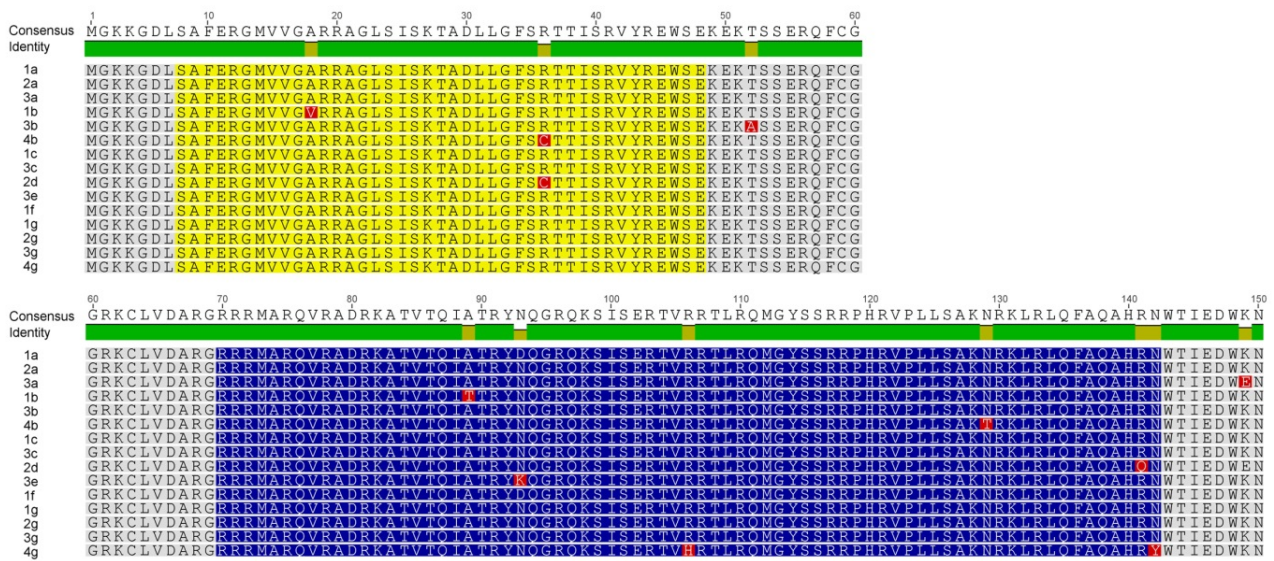


Figura 2 - Região da TIR 5' e TIR 3' identificados nas seqüências Tc1-Mariner de Parodontidae. Em cinza destacando a região do dinucleotídeo TA com a maioria das seqüências apresentando CA (TIR 5') ou TG (TIR 3') adjacentes. Em preto destacando mutações nesta região. Em vermelho destacando o TA na região final das TIRs, e em azul indicando região TA mais interna. As seqüências 3c e 2d possuem o mesmo tipo de mutação para esta região e todas as seqüências 1h-4h e 1i-2i possuem mutações nos nucleotídeos adjacentes ao TA.

A) Ligação ao DNA



B) Catalise

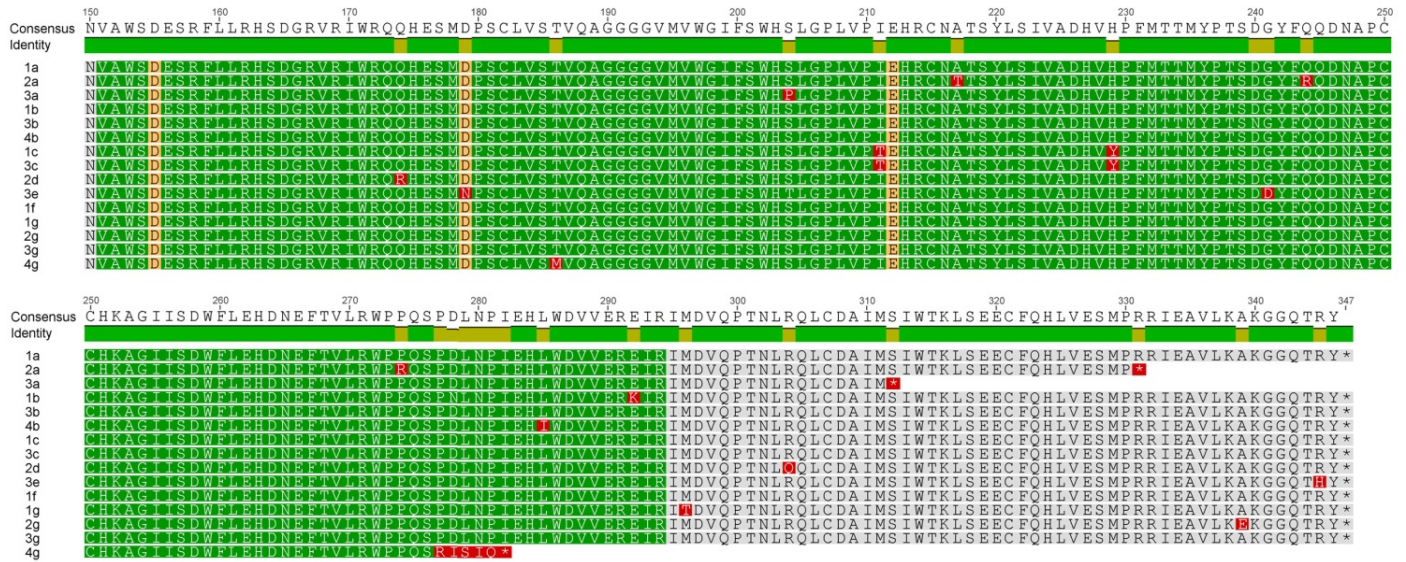


Figura 3 - Alinhamento das seqüências de aminoácidos correspondente a ORF da enzima transposase (somente as seqüências contendo uma ORF e os três domínios foram consideradas). Em amarelo o domínio *homeiodomain-like-domain* (HLD), em azul *helix-turn-helix* (HTH) e em verde o DDE da superfamília da endonuclease. Os domínios HLD (8-48 aminoácido) e HTH (70-142 aminoácido) são responsáveis por se ligar ao DNA e o DDE endonuclease (151-294 aminoácido) é o domínio catalítico. Os aminoácidos destacados em vermelho são aqueles que diferem da seqüência consenso para o elemento Tc1-Mariner não autônomo em Parodontidae; e em laranja esta destacado o *motif* DDE. A seqüência 3e foi a única que apresentou N(asparagina) no local do segundo D(Aspartato) no domínio DDE.

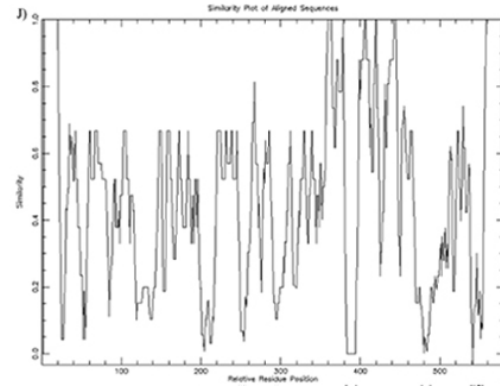
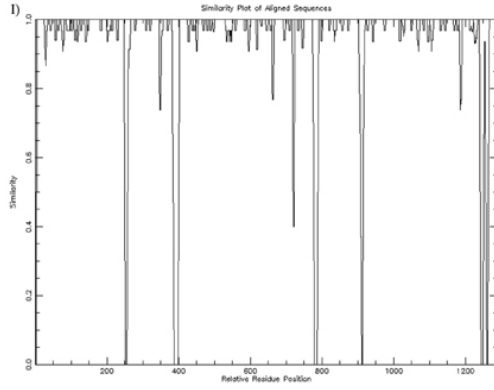
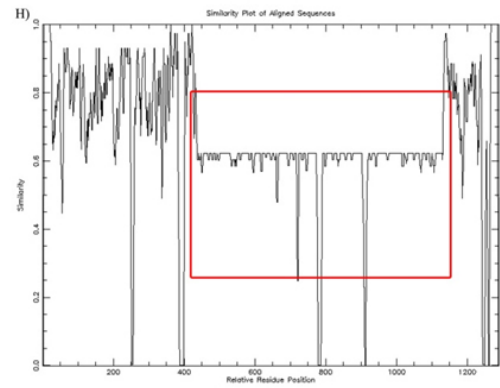
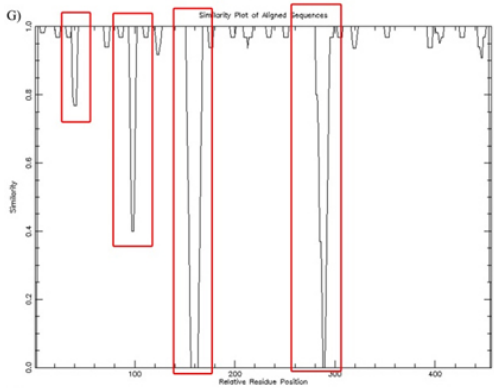
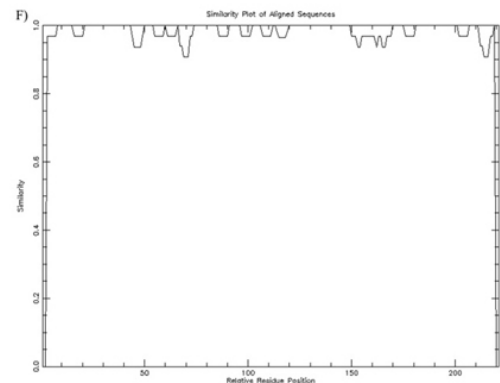
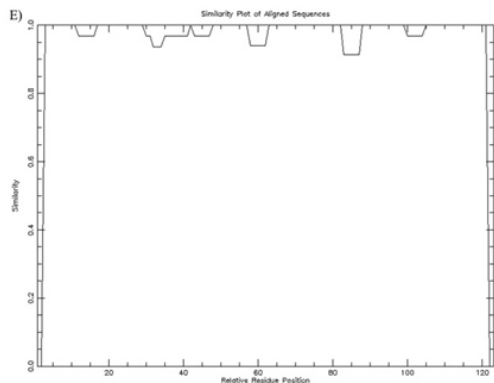
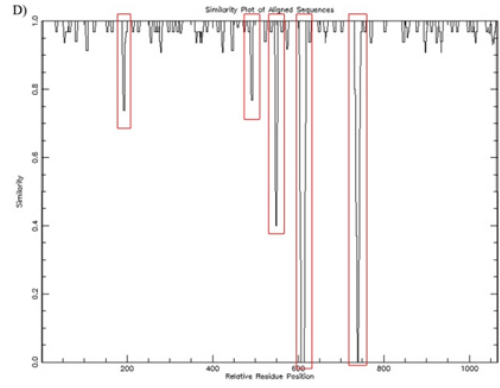
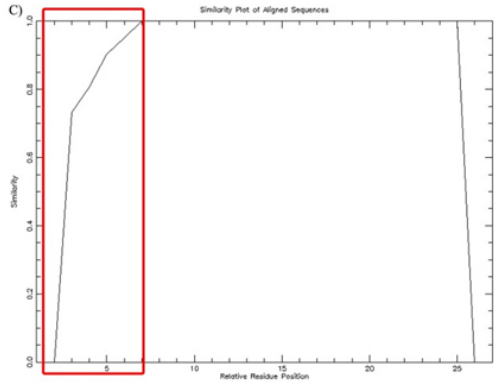
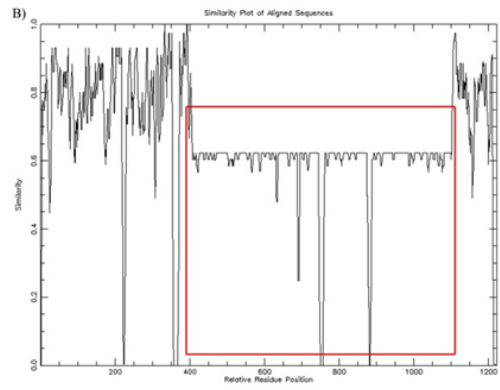
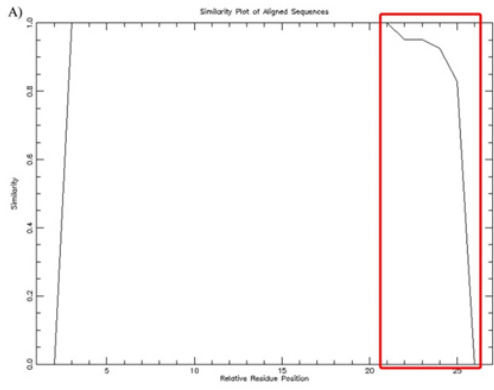


Figura 4 - Representação gráfica da divergência das sequências do elemento Tc1-Mariner em Parodontidae. Os gráficos foram gerados utilizando o Plotcon (<http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/plotcon>) que representa a similaridade das sequências entre o alinhamento entre diferentes regiões do Tc1-Mariner, além do alinhamento com amostras com baixo nível de deterioração e de amostras com alto nível de deterioração. **A**- corresponde ao gráfico da região da TIR 5'; **B**- região interna; **C**- região TIR 3'; **D**- ORFs, **E**- domínio HLD; **F**- domínio HTH; **G**- domínio DDE endonuclease; **H**- sequências completas do Tc1-Mariner. Em **I**- amostra contendo as sequências completas do Tc1-Mariner com exceção das espécies *P. hilarii* e *P. pongoensis*; **J**- amostra contendo somente as sequências completas de *P. hilarii* e *P. pongoensis*. Nos retângulos vermelhos estão destacados regiões com maiores índices de divergência. De A-C e H foram incluídas todas as sequências; de D-G e I somente não foram incluídas as sequências de *P. hilarii* e *P. pongoensis*), e J somente foram incluídas as sequências de *P. hilarii* e *P. pongoensis*.

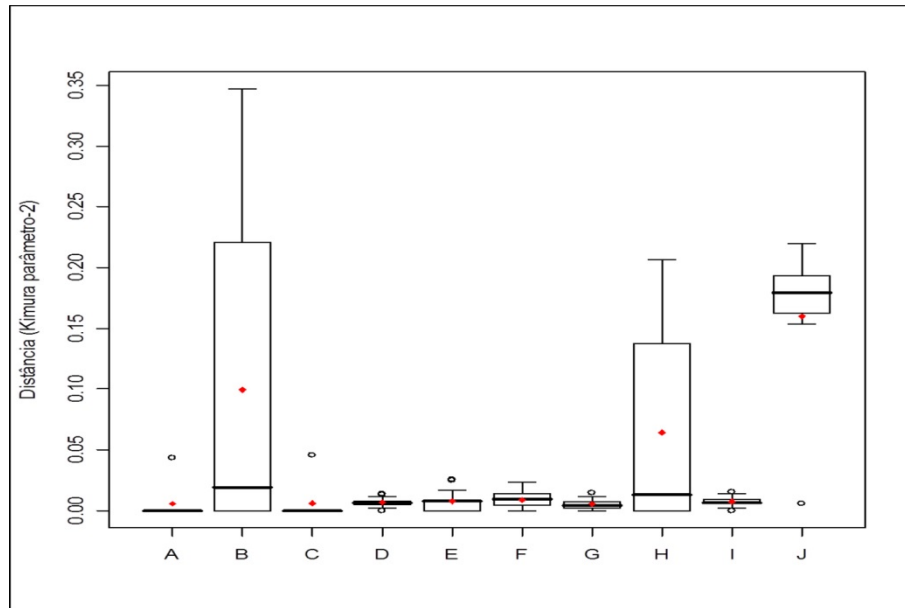


Figura 5 - Número de substituições de nucleotídeos por sítio (distância genética) entre sequências da superfamília Tc1-Mariner em Parodontidae. As análises foram conduzidas utilizando o modelo de Kimura 2-parâmetros. A taxa de variação entre os sítios foi modelada com a distribuição gamma (parâmetro=1). Em **A** TIR 5' (teste de Kruskal-Wallis Ad hoc teste de Tukey: comparações significativas com valor de $p < 0.05$ para A-B; A-H; A-J); em **B** TIR 3' (teste de Kruskal-Wallis Ad hoc teste de Tukey: comparações significativas com valor de $p < 0.05$ para B-A; B-C; B-D; B-E; B-G); em **C** região interna sem as TIRs (teste de Kruskal-Wallis Ad hoc teste de Tukey: comparações significativas com valor de $p < 0.05$ para C-B; C-H; C-J); em **D** ORFs válidas (teste de Kruskal-Wallis Ad hoc teste de Tukey: comparações significativas com valor de $p < 0.05$ para D-B; D-H; D-J); **E** o domínio HLD (teste de Kruskal-Wallis Ad hoc teste de Tukey: comparações significativas com valor de $p < 0.05$ para E-B; E-H; E-J/ diferenças significativas $p < 0.05$ somente para o teste de Kruskal-Wallis foram encontradas para E-F); **F** o domínio HTH (teste de Kruskal-Wallis Ad hoc teste de Tukey: comparações significativas com valor de $p < 0.05$ para F-J/ diferenças significativas $p < 0.05$ somente para o teste de Kruskal-Wallis foram encontradas para F-E e F-G); **G** o domínio DDE endonuclease teste de Kruskal-Wallis Ad hoc teste de Tukey: comparações significativas com valor de $p < 0.05$ para G-B; G-H; G-J/ diferenças significativas $p < 0.05$ somente para o teste de Kruskal-Wallis foram encontradas para G-F); **H** todas as sequências completas teste de Kruskal-Wallis Ad hoc teste de Tukey: comparações significativas com valor de $p < 0.05$ para H-A; H-C; H-D; H-G); **I** amostra com as sequências completas com baixo nível de degradação, não incluídas as espécies *P. hilarii* e *P. pongoensis* teste de Kruskal-Wallis Ad hoc teste de Tukey: comparações significativas com valor de $p < 0.05$ para I-J); e **J** amostra contendo somente sequências Tc1-Mariner com alto nível de degradação das espécies *P. hilarii* e *P. pongoensis* teste de Kruskal-Wallis Ad hoc teste de Tukey: comparações significativas com valor de $p < 0.05$ para J-A; J-C; J-D; J-E; J-F; J-G; J-I).

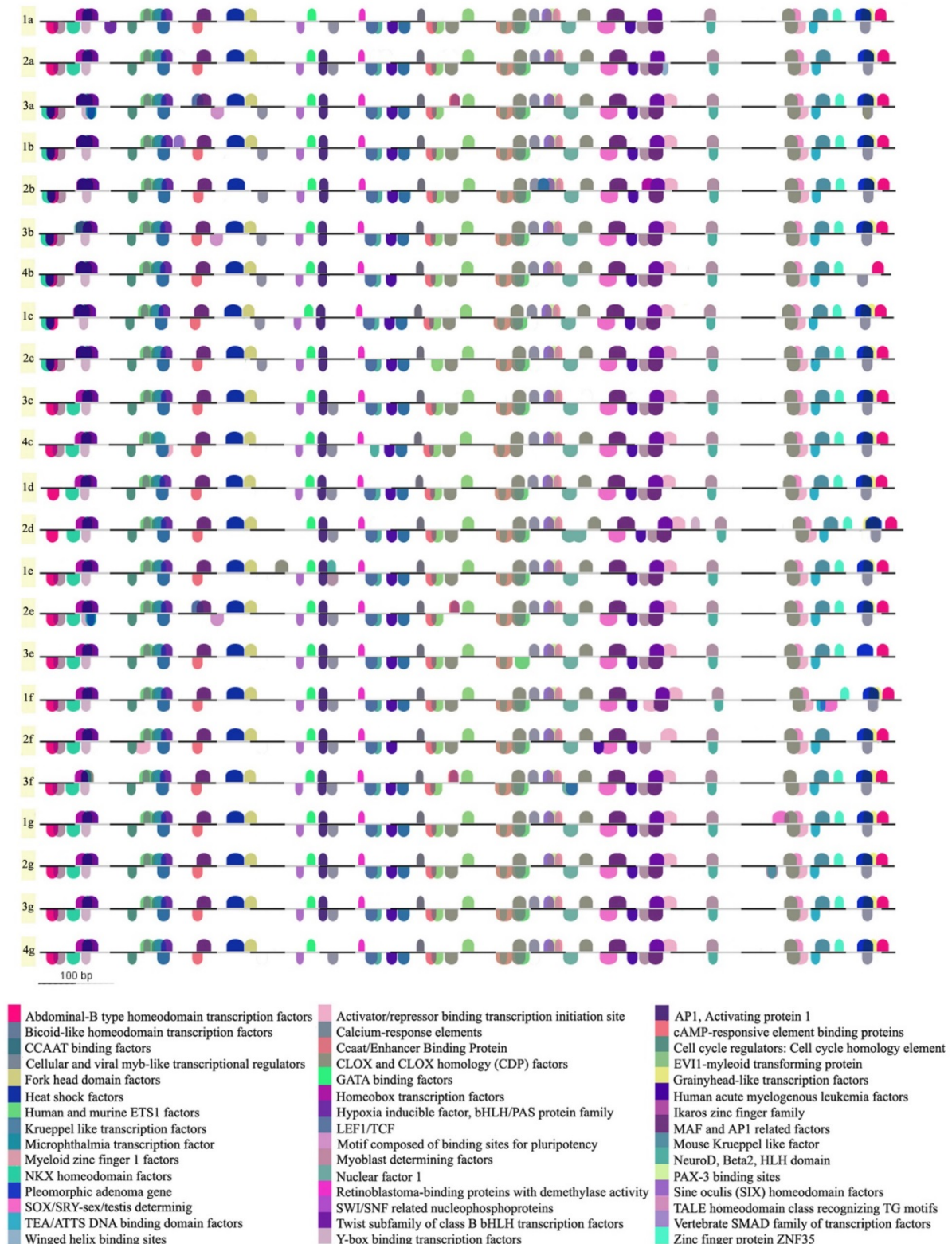


Figura 6 - Posição dos sítios regulatórios (figura em relevo colorido) nas sequências de Tc1-Mariner (barra) menos degradadas de Parodontidae. Sendo considerados valores de matriz de similaridade ≥ 0.95 e tamanho do TFBS ≥ 10 pb (dados obtidos pelo MatInspector). Acima da barra a orientação da sequência esta no sentido 5'-3', e abaixo da barra a sequência esta orientada no sentido 3'-5'.

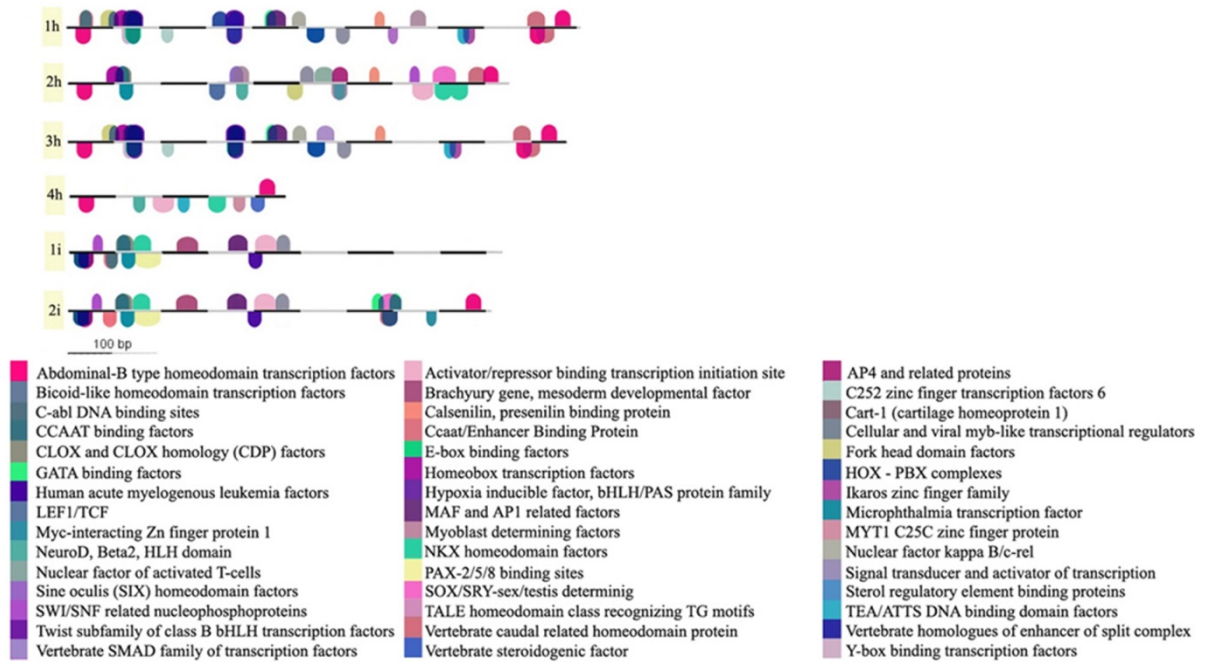


Figura 7 - Posição dos sítios regulatórios (figura em relevo colorido) nas sequências de Tc1-Mariner (barra) com maior índice de degradação de Parodontidae. Sendo considerados valores de matriz de similaridade ≥ 0.95 e tamanho do TFBS ≥ 10 pb (dados obtidos pelo MatInspector). Acima da barra a orientação da sequência esta no sentido 5'-3', e abaixo da barra a sequência esta orientada no sentido 3'-5'.

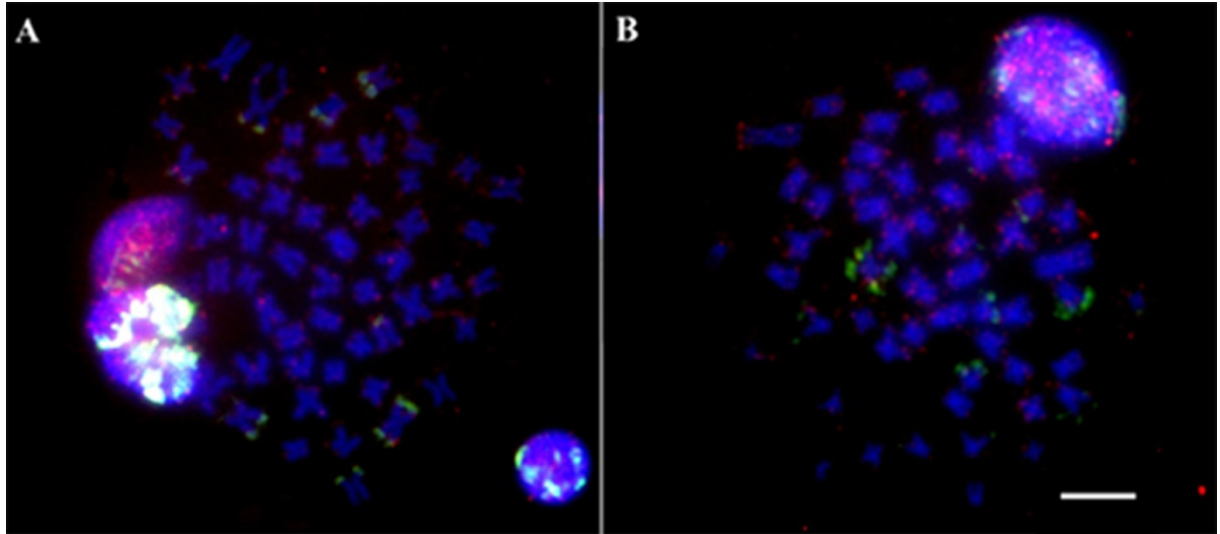


Figura 8 - Metáfases de *P. hilarii* (A) e *A. affinis* (B) submetidos à FISH com a sonda do clone de *A. ibitiensis* (sequência 3c) Tc1-Mariner (vermelho). A sonda pPh2004 (verde) foi utilizada neste estudo somente com o intuito de identificação cromossômica. Escala barra= 5 μ m.

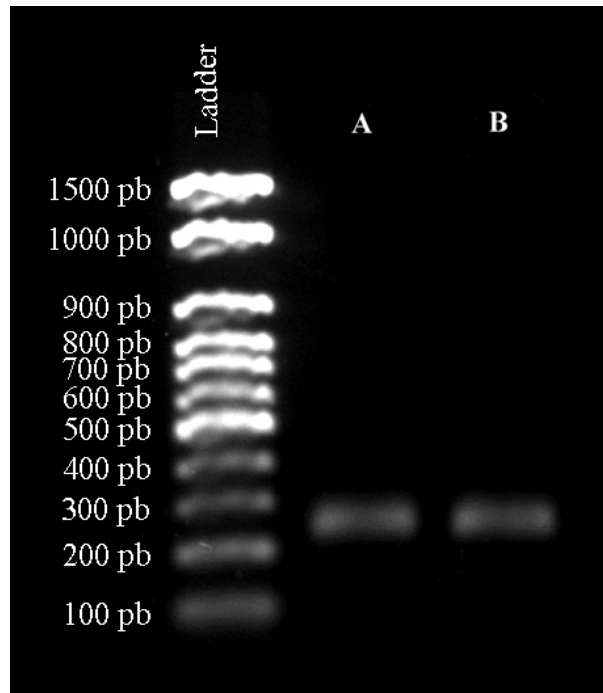


Figura 9 - Gel de agarose 1% evidenciando o produto de PCR do elemento Tc1-Mariner utilizando RNA (extraído das gônadas) como molde da espécie *Apareiodon* sp. Em A macho e em B fêmea. Este resultado indica que o elemento Tc1-Mariner está tendo atividade transcricional.

5. CONCLUSÃO

A espécie *Apareiodon hasemani* possui pouco acúmulo da sequência repetitiva WAp no cromossomo sexual W quando comparado com os demais Parodontidae com sistema ZZ/ZW. Além disso, ela não apresenta o DNA satélite pPh2004; e há sítio de rDNA 5S simples e de rDNA 18S múltiplos.

A biblioteca da cinética de reassociação C₀t-1 resultou na prospecção de diferentes DNAs repetitivos, dentre eles foram identificados vários micro e minisatélites, sequências parciais de elementos transponíveis da Classe I: *Gypsy* e *I-2_Deu de Drosophila eugracilis*; e de elementos transponíveis da classe II: *Helitron*, *MuDR*, *Tc1-Mariner*, *Dada-tL_DR*, *Politron*, *elemento EnSpm1_SB*, além do rDNA 5S.

A FISH com a sonda C₀t-1 total evidenciou intenso acúmulo de DNAs repetitivos no cromossomo sexual W de Parodontidae.

Entre os clones da biblioteca C₀t-1, dois DNAs repetitivos, um de DNA satélite e o elemento *Helitron*, foram mapeados nos cromossomos sexuais de espécies de Parodontidae. O DNA satélite parece estar envolvido no processo de origem dos cromossomos sexuais. Adicionalmente o elemento transponível *Helitron* atuou na diferenciação do cromossomo W por estar presente com grande acúmulo na região terminal. É provável que estes DNAs repetitivos atuaram nos processos de erosão e silenciamento gênico do cromossomo W de Parodontidae.

Neste estudo, foi caracterizado o elemento repetitivo Tc1-Mariner presente no genoma de Parodontidae. Estudos relacionados à caracterização molecular, mapeamento físico, análise de expressão, degradação e similaridade com sítios promotores também foram realizados com este elemento transponível. Na família Parodontidae o elemento Tc1-Mariner

é não autônomo e possui alta identidade com o Tc1-Mariner das espécies *Danio rerio* e *Takifugu rubripes*.

A análise de similaridade mostrou degradação molecular deste TE no genoma de Parodontidae, com algumas espécies apresentando somente este elemento na forma de miniatura de transposon (MITE).

Análises de expressão mostraram que o elemento não autônomo Tc1-Mariner é expresso no tecido gonadal de Parodontidae, indicando que estes RNAs possam ter uma co-opção molecular no genoma.

No genoma de Parodontidae, a alta taxa de degradação do elemento transponível Tc1-Mariner estudado mostraram que algumas das sequências derivadas do processo de mutação podem ter sofrido processo de exaptação molecular.

Análises da presença de sítios TBPS nas cópias de Tc1-Mariner evidenciaram que inúmeras regiões possuem alta similaridade com sítios regulatórios de *Danio rerio*, mais uma vez indicando exaptação molecular.

Os resultados obtidos neste estudo foram importantes para uma maior compreensão do papel dos DNAs repetitivos, sendo que o mapeamento de sequências repetitivas são essenciais para a genômica integrativa e podem auxiliar estudos futuros relacionados ao sequenciamento genômico de Parodontidae. O estudo molecular do elemento Tc1-Mariner possibilitou um maior entendimento da função deste, uma vez que estão presentes em grande quantidade no genoma. É importante destacar que redes regulatórias são bastante complexas e a compreensão da origem de sítios regulatórios devido a processo de domesticação de elementos transponíveis são bastante promissores.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRUSAN, G.; SZILAGYI, A.; ZHANG, Y.; PAPP, B. Turning gold into 'junk': transposable elements utilize central proteins of cellular networks. *Nucleic Acids Research* v. 41(5), p. 3190–3200, 2013. doi:10.1093/nar/gkt011

ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; FORESTI, F. Morphologically differentiated sex chromosomes in neotropical fish. *Genetica*, v. 111, p. 91-100, 2001.

ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; FORESTI, F.; DANIEL, M.F.Z.; TOLEDO-FILHO, S.A. Sex chromosome evolution in fish: the formation of the neo-Y chromosome in *Eigenmannia* (Gymnotiformes). *Chromosoma*, v. 109, p. 197-200, 2000.

ARTONI, R.F.; BERTOLLO, L.A. C. Evolutionary aspects of the ZZ/ZW sex chromosome system in the Characidae fish, genus *Triportheus*. A monophyletic state and NOR. *Heredity*, v. 89, p. 15-19, 2002.

ARTONI, R.F.; VICARI, M.R.; ENDLER, A.L.; CAVALLARO, Z.I.; JESUS, C.M.; ALMEIDA, M. C.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L.A.C. Banding pattern of A and B chromosomes of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae), with comments on B chromosomes evolution. *Genetica*, v. 127, p. 277-284, 2006.

BELLAFRONTE, E.; MARGARIDO, V. P.; MOREIRA-FILHO, O. Cytotaxonomy of *Parodon nasus* and *Parodon tortuosus* (Pisces, Characiformes). A case of synonymy confirmed by cytogenetic analyses. *Genetics and Molecular Biology*, v. 28, p. 710-716, 2005.

BELLAFRONTE, E.; MARIGUELA, T.C.; PEREIRA, L H.G.; OLIVEIRA, C.; MOREIRA-FILHO, O. DNA barcode of Parodontidae species from the La Plata river basin-applying new data to clarify taxonomic problems. *Neotropical Ichthyology*, v.11(3), p. 497-506, 2013.

BELLAFRONTE, E.; SCHEMBERGER, M.O., MOREIRA-FILHO, O.; ALMEIDA, M.C.; ARTONI, R.F.; MARGARIDO, V.P.; VICARI, M.R. Chromosomal markers in Parodontidae: an analysis of new and reviewed data with phylogenetic inferences. *Rev Fish Biol Fisheries*, v.21, p.559-570, 2011.

BELLAFRONTE, E.; VICARI, M.R.; ARTONI, R.F.; MARGARIDO, V.P.; MOREIRA-FILHO, O. Differentiated ZZ/ZW sex chromosomes in *Apareiodon ibitiensis* (Teleostei, Parodontidae): cytotaxonomy and biogeography. *Journal of fish biology*, v.75, p. 2313-2325, 2009.

BERIDZE, T. Satellite DNA. Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1986. 149p.

BERTOLLO, L.A.C.; TAKAHASHI, C.S.; MOREIRA-FILHO, O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Rev. Bras. Genet.*, v. 1(2), p. 103-120, 1978.

BIÉMONT, C.; VIEIRA, C.; HOOGLAND, C.; CIZERON, G.; LÈVENBRUCK, C.; ARNAULT, C.; CARANTE, J. P. Maintenance of transposable element copy number in natural populations of *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*. *Genetica*, v. 100(1-3), p. 161-166, 1997.

BÖHLKE, J.E.; WEITZMANN, S.H.; MENEZES, N.A. Estado atual da sistemática dos peixes de água-doce da América do Sul. *Acta Amazônica*, v.8, n. 4, p. 657-677, 1978.

BORN G.G.; BERTOLLO, L.A. Comparative cytogenetics among allopatric populations of the fish, *Hoplias malabaricus*. Cytotypes with $2n=42$ chromosomes. *Genetica*, v. 110(1), p.1-9, 2000.

BRITTEN, R.J.; KOHNE, D.E. Nucleotide sequence repetition in DNA. *Carnegie Inst Wash Year Book*, v. 65, p. 78-106, 1966.

BRITTEN, R.J.; KOHNE, D.E. Repeat sequences in DNA. *Science*, v. 161, p. 529-540, 1968.

BUCKUP, P.A. Relationships of the Characidiinae and phylogeny of characiform fishes (Teleostei: Ostariophysi), p. 123-144. In: *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. MALABARBA, L. R.; REIS, R. E.; VARI, R. P.; LUCENA, Z. M.; LUCENA, C. A. S. (eds). Edipucrs, Porto Alegre, Brasil, 1998.

BUREAU, T.E; WESSLER, S.R. Mobile inverted-repeat elements of the Tourist family are associated with the genes of many cereal grasses. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 91: 1411-1415, 1994.

BUSSIEK, M.; HOISCHEN, C.; DIEKMANN, S.; BENNINK, M.L. Sequence-specific physical properties of African green monkey alpha-satellite DNA contribute to centromeric heterochromatin formation. *J. Struct. Biol.*, 2009.

CENTOFANTE, L.; BERTOLLO, L.A.C.; MOREIRA-FILHO, O. ZZ/ZW sex chromosome system in new species of the genus *Parodon* (Pisces, Parodontidae). *Caryologia*, v. 54, p. 139-150, 2002.

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

CHARLESWORTH, D.; CHARLESWORTH, B.; MARAIAS G. Steps in the evolution of heteromorphic sex chromosomes. *Heredity*, v.95, p. 118-128, 2005.

CHARLESWORTH, B.; CHARLESWORTH, D. The degeneration of Y chromosomes. *Philos Trans R Soc Lond Ser B*, v. 355, p. 1563-1572, 2000.

CHEN, Y.; ZHOU F.; LI, G.; XU, Y. MUST: A system for identification of miniature inverted-repeat transposable elements and applications to *Anabaena variabilis* and *Haloquadratum walsbyi*. *Gene*, v. 436, p. 1-7, 2009.

CLARK, M.S.; WALL, W.J. *Chromosomes: The complex code*. Champan & Hall: London. 1996. 341p.

DE LA HERRÁN, R.; FONTANA, F.; LANFREDI, M.; CONGIU, L.; LEIS, M.; ROSSI, R.; RUIZ REJÓN, C.; RUIZ REJÓN, M.; GARRIDO-RAMOS, M. A. Slow rates of evolution and sequence homogenization in an ancient satellite DNA family of sturgeons. *Molecular Biology of Evolution*, v. 18, p. 432-436, 2001.

DEVLIN, R.H.; BIAGI, C.A.; SMAILUS, D.E. Genetic mapping of Y-chromosomal DNA markers in Pacific salmon. *Genetica*, v.111(1-3), p. 43-58, 2001.

DEVLIN, R.H.; McNEIL, B.K.; DONALDSON, E. M. Isolation of a Y-chromosomal DNA probe capable of determining sex in chinook salmon. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, v.48, p. 1606-1612, 1991.

DEVLIN, R.H.; STONE, G.W.; SMAILUS, D.E. Extensive Direct-Tandem Organization of a Long Repeat DNA Sequence on the Y Chromosome of Chinook Salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Journal of Molecular Evolution*, v. 46, p. 277–287, 1998.

DOOLITTLE, W.F., SAPIENZA, C. Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution. *Nature*, v. 284, n. 5757, p. 601-3, 1980.

DOVER, G.A. Molecular drive in multigene families: how biological novelties arise, spread and are assimilated. *Trends Genet*, v. 2, p. 159–165, 1986.

DRUMMOND, A.J.; ASHTON, B.; CHEUNG, M.; HELED, J.; KEARSE, M.; MOIR, R. et al. *Geneious v 4.8.5*, Available from. <http://www.geneious.com>, 2009.

ESCHMEYER, W.N.; FONG, J.D. Species of Fishes by family/subfamily. Disponível em: <<http://research.calacademy.org/redirect?url=http://researcharchive.calacademy.org/research/Ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>>. Acesso em: 06 ago. 2013

EDGAR, R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* v.32, p. 1792–1797, 2004.

EKWALL, K.; OLSSON, T; TURNER, B. M.; CRANSTON, G.; & ALLSHIRE, R. C. Transient inhibition of histone deacetylation alters the structural and functional imprint at fission yeast centromeres. *Cell*, v.91(7), p.1021-1032, 1997.

EZAZ, M.T.; MYERS, J.M.; POWELL, S.F.; MCANDREW, B.J.; PENMAN, D.J. Sex ratios in the progeny of androgenetic and gynogenetic YY male Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, v. 232, p. 205–214, 2004.

FALCÃO, J.N.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L.A.C. An additional chromosome in two fish species. *Brazil J Genet*, v.1, p. 109-118, 1984.

FERNÁNDEZ-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*, v. 13, p. 272, 2012.

FERNANDINO, J.I.; GUILGUR, L.G.; SOMOZA, G.M. Dmrt1 expression analysis during spermatogenesis in perjerrey, *Odontesthes bonariensis*. *Fish Physiol Biochem*, v. 32, p. 231-240, 2006.

- 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*, v. 39, n. 4, p. 411-418, 2008.
- FERREIRA, D.C.; PORTO-FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Transposable elements as a potential source for understanding the fish genome. *Mobile genetic elements*, v.1(2), p. 112-117, 2011.
- FESCHOTTE, C. The contribution of transposable elements to the evolution of regulatory networks. *Nat Rev Genet*, v. 9(5), p. 397–405, 2008. doi:10.1038/nrg2337.
- FESCHOTTE, C.; PRITHAM, E.J. DNA Transposons and the Evolution of Eukaryotic Genomes. *Annu Rev Genet*, v. 41, p. 331–368, 2007.
- FINN, R.D.; MISTRY, J.; TATE, J.; COGGILL, P.; HEGER, A.; POLLINGTON, J.E. et al. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res*, v. 38, Database issue D211–D222, 2010.
- FINNEGAN, D.J. Transposable elements in eukaryotes. *Int Rev Cytol*, v. 93, p. 281-326, 1985.
- GALETTI, P.M. Jr; CESAR A.C.G.; VENERE P.C. Heterochromatin and NORs variability in Leporinus fish (Anostomidae, Characiformes). *Caryologia*, v.44, p.287–292, 1991.
- GEHRING, W.J. Exploring the homeobox. *Gene*, v. 135(1-2), p. 215–21, 1993. doi:10.1016/0378-1119(93)90068-E.
- GEHRING, W.J. The homeobox in perspective. *Trends Biochem Sci*, v. 17 (8), p. 277–80, 1992. doi:10.1016/0968-0004(92)90434-B
- HARVEY, S.C.; MASABANDA, J.; CARRASCO, L.A.P.; BROMAGE, N.R.; PENMAN, D.J.; GRIFFIN, D.K. Molecular-cytogenetic analysis reveals sequence differences between the sex chromosomes of *Oreochromis niloticus*: evidence for an early stage of sex-chromosome differentiation. *Cytogenet. Gen. Res.*, v. 97, p. 76-80, 2002.
- 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*, v. 122, p. 239-244, 2004.
- HAVECKER, E.R.; GAO, X.; VOYTAS, D.F. The diversity of LTR retrotransposons. *Genome Biology*, v.5(6), p. 225-225, 2004.
- HEIKKINEN, E.; LAUNONEN, V.; MÜLLER, E.; BACHMANN, L. The pvB370 BamHI satellite DNA family of the *Drosophila virilis* group and its evolutionary relation to mobile dispersed genetic pDv elements. *J. Mol Evol.*, v. 41(5), p. 604-614, 1995.
- HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, A.; RINCÓN-ARANO, H.; RECILLAS-TARGA, F.; ORTIZ, R., VALDES-QUEZADA, C.; ECHEVERRÍA, O. M.; BENAVENTE, R.; VÁZQUEZ-NIN, G. H. Differential distribution and association of repeat DNA sequences in

the lateral element of the synaptonemal complex in rat spermatocytes. *Chromosoma*, v. 117(1), p. 77-87, 2008.

HERPIN, A.; BRAASCH, I.; KRAEUSSLING, M.; SCHMIDT, C.; THOMA, E.C.; NAKAMURA, S.; TANAKA M.; SCHAT, M. Transcriptional Rewiring of the Sex Determining *dmrt1* Gene Duplicate by Transposable Elements. *PLoS Genetics*, v.6, p. 2, 2010.

HUDSON, M.E.; LISCH, D.R.; QUAIL, P.H. The *FHY3* and *FAR1* genes encode transposase-related proteins involved in regulation of gene expression by the phytochrome A-signaling pathway. *The Plant Journal*, v. 34, n. 4, p. 453-471, 2003.

HURST, G.D.; WERREN, J.H. The role of selfish genetic elements in eukaryotic evolution. *Nature Reviews Genetics*, v. 2(8), p.597-606, 2001.

INGENITO, L.F.S. Análise filogenética da família Parodontidae (Teleostei, Characiformes). Tese de doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, 2008.

INGENITO, L.F.S.; BUCKUP, P.A. A new species of *Parodon* from the Serra da Mantiqueira, Brazil (Teleostei: Characiformes: Parodontidae). *Copeia*, p. 765-771, 2005.

IZSVFIK, Z.; IVICS, Z.; HACKETT, P.B. Characterization of a Tc1-like transposable element in zebrafish (*Danio rerio*). *Mol Gen Genet*, v. 247, p.312-322, 1995.

JESUS, C. M.; BERTOLLO, L.A.C.; MOREIRA-FILHO, O. Comparative cytogenetics in *Apareiodon affinis* (Pisces, Characiformes) and considerations regarding diversification of the group. *Genetica*, v. 105, p. 63-67, 1999.

JESUS, C.M.; GALETTI, Jr. P.M.; VALENTINI, S.R.; MOREIRA-FILHO, O. Molecular characterization and chromosomal location of two families of satellite DNA in *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae), a species with B chromosomes. *Genetica*, v. 118, p. 25-32, 2003.

JESUS, C.M.; MOREIRA-FILHO, O. Cytogenetic studies in some *Apareiodon* species (Pisces, Parodontidae). *Cytologia*, v. 65, p. 397-402, 2000a.

JESUS, C.M.; MOREIRA-FILHO, O. Karyotypes of three species of *Parodon* (Teleostei, Parodontidae). *Ichthyological Exploration Freshwaters*, v. 11, 75-80, 2000b.

JOHNSON, L.J. The genome strikes back: The evolutionary importance of defence against mobile elements. *Evol Biol*, v. 34, p. 121-129, 2007.

JORDAN, I.K.; ROGOZIN, I.B.; GLAZKO, G.V.; KOONIN, E.V. Origin of a substantial fraction of human regulatory sequences from transposable elements. *Trends in Genetics*, v. 19(2), p. 68-72, 2003.

JORGE, L.C.; MOREIRA-FILHO, O. Cytogenetic studies on *Apareiodon affinis* (Pisces, Characiformes) from Paraná river basin: Sex chromosomes and polymorfism. *Genetica*, v. 109, p. 267-273, 2000.

- JORGE, L.C.; MOREIRA-FILHO, O. Nucleolar organizer regions as markers of chromosomal polymorphism in *Apareiodon affinis* (Pisces, Parodontidae). *Caryologia*, v. 57, p. 203-207, 2004.
- 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*, v. 8, p. 241–259, 2007.
- JURKA, J.; KAPITONOV, V.V.; PAVLICEK, A.; KLONOWSKI, P.; KOHANY, O.; WALICHIEWICZ, J. Repbase update, a database of eukaryotic repetitive elements. *Cytogenet Genome Res*, v. 110, p.462–467, 2005.
- KAI, W.; KIKUCHI, K.; TOHARI, S.; CHEW, A. K.; TAY, A.; FUJIWARA, A.; VENKATESH, B. Integration of the genetic map and genome assembly of fugu facilitates insights into distinct features of genome evolution in teleosts and mammals. *Genome biology and evolution*, v. 3, p.424-442, 2011.
- KANTEK, D. L.; CESTARI, M. M.; BERTOLLO, L. A.; MOREIRA-FILHO, O. M. Characterization of the constitutive heterochromatin of *Astyanax* sp. (Characiformes: Characidae) from the Upper Iguaçú River (PR). *Folia. Biol.*, v. 57(1-2), p. 37-41, 2009.
- KAPITONOV, V.V.; JURKA, J. RAG1 Core and V(D)J Recombination signal sequences were derived from Transib transposons. *PLoS Biol* 3(6): e181, 2005.
- KAPUSTA, A.; KRONENBERG Z.; LYNCH V.J.; ZHUO, X.; RAMSAY, L.; BOURQUE, G.; YANDELL, M.; FESCHOTTE, C. Transposable Elements Are Major Contributors to the Origin, Diversification, and Regulation of Vertebrate Long Noncoding RNAs. *Plos genetics* 9: 4, 2013.
- KETTING, R.F. Target choice determinants of the Tc1 transposon of *Caenorhabditis elegans*. *Nucleic Acids Res*, v. 25, p. 4041–4047, 1997.
- KIDWELL, M.G. Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. *Genetica*, v. 115, p.49–63, 2002.
- KIDWELL, M.G.; LISCH D.R. Perspective: Transposable elements, parasitic DNA, and genome evolution. *Evolution*, v. 55, p. 1–24, 2001.
- KURENOVA, E.; CHAMPION, L.; BIESSMANN, H.; MASON, J.M. Directional gene silencing induced by a complex subtelomeric satellite from *Drosophila*. *Chromosoma*, v. 107(5), p. 311-20, 1998.
- LAHN, B.T.; PEARSON, N.M.; JEGALIAN, K. The human Y chromosome, in the light of evolution. *Nat Rev Gen.* v.2, p.207-216, 2001.
- LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANDBERG, A.A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, v. 52, p.201–220, 1964.
- LONG, E.O.; DAVID, I.D. Repeated genes in eucakiotes. *Annual Review of Biochemistry*, v. 49, p.727-764, 1980.

- LONG, M.; BETRÁN, E.; THORNTON, K.; WANG, W. The origin of new genes: glimpses from the young and old. *Nature Reviews Genetics*, v. 4(11), p. 865-875, 2003.
- LOWE, C.B.; BEJERANO, G.; HAUSSLER, D. Thousands of human mobile element fragments undergo strong purifying selection near developmental genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 104, p. 8005–8010, 2007.
- LOWE-MCCONNELL, R.H. *Estudos ecológicos em comunidades de peixes tropicais*. 1. ed. São Paulo: EDUSP, 1999. 534 p.
- LUFALLA, G.; CROLLIUS, H.R.; BRUNET, F.G.; LAUDET, V.; ROBINSON-RECHAVI, M. Inventing a sex-specific gene: a conserved role of *Dmrt1* in teleost fishes a recent duplication in medaka *Oryzias latipes* resulted in *Dmy*. *J Mol Evol*, v.57, p. 148-153, 2003.
- MACHADO, T.C.; PANSONATO-ALVES, J.C.; PUCCI, M.B.; NOGAROTO, V.; ALMEIDA, M.C.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F.; BERTOLLO, L.A.C.; MOREIRA-FILHO, O.; ARTONI, R.F.; VICARI, M.R. Chromosomal painting and ZW sex chromosomes differentiation in *Characidium* (Characiformes, Crenuchidae). *BMC Genet*, v.12, p. 65, 2011.
- MANTOVANI, M.; ABEL, L. D. S.; MESTRINER, C. A.; MOREIRA-FILHO, O. Evidence of the differentiated structural arrangement of constitutive heterochromatin between two populations of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Genetic and Molecular Biology*, v. 27, p. 536-542, 2004.
- MARGERON, R.; REINBERG, D. Chromatin structure and the inheritance of epigenetic information. *Nature*, v.11, p. 285-296, 2010.
- MARIAS, G.; GALTIER, N. Sex chromosomes: how X-Y recombination stops. *Curr Biol*, v. 13, p. R641-R643, 2003.
- MARIÑO-RAMÍREZ, L.; JORDAN, I. Transposable element derived DNaseI-hypersensitive sites in the human genome. *Biology direct*, v. 1, n. 1, p. 20, 2006.
- MARINO-RAMIREZ, L.; LEWIS, K.C.; LANDSMAN, D.; JORDAN, I.K. Transposable elements donate lineage-specific regulatory sequences to host genomes. *Cytogenet Genome Res*, v. 110, p.33–341, 2005.
- MARTINS, C.; GALETTI, Jr. P. M. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* Fish (Anostomidae, Characiformes). *Chromosom. Res.*, v. 7, p. 363-367, 1999.
- MATSUBARA, K.; TARUI, H.; TORIBA, M.; YAMADA, K.; NISHIDA-UMEHARA, C.; AGATA, K.; MATSUDA, Y. Evidence for different origin of sex chromosomes in snakes, birds, and mammals and step-wise differentiation of snake sex chromosomes. *PNAS.*, v. 103 p. 18190-18195, 2006.
- MATSUDA, M.; NAGAHAMA, Y.; SHINOMIYA, A.; SATO, T.; MATSUDA, C.; KOBAYASHI, T.; MORREY, C.; SHIBATA, N.; ASAKAWA, S.; SHIMIZU, N.; HORI, H.; HAMAGUCHI, S.; SAKAIZUMI, M. *Dmy* is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature*, v.417, p.559-563, 2002.

- HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, A.; RINCÓN-ARANO, H.; RECILLAS-TARGA, F.; ORTIZ, R., VALDES-QUEZADA, C.; ECHEVERRÍA, O. M.; BENAVENTE, R.; VÁZQUEZ-NIN, G. H. Differential distribution and association of repeat DNA sequences in the lateral element of the synaptonemal complex in rat spermatocytes. *Chromosoma*, v. 117(1), p. 77-87, 2008.
- 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 characidae fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome. *Heredity*, v. 85, p.1-9, 2000.
- METZKER, M. L. Sequencing technologies—the next generation. *Nature Reviews Genetics*, v. 11(1), p. 31-46, 2009.
- MILLER, W.J.; MCDONALD, J.F.; PINSKER, W. Molecular domestication of mobile elements. *Genetica*, v. 100, p. 261–270, 1997.
- MONOD, C.; AULNER, N.; CUVIER, O.; KÄS, E. Modification of position-effect variegation by competition for binding to *Drosophila satellites*. *EMBO*, v. 3(8), p. 747-52, 2002.
- MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L.A.C.; GALETTI, Jr. P.M. Evidences for a multiple sex chromosome system with female heterogamety in *Apareiodon affinis* (Pisces, Parodontidae). *Caryologia*, v. 33, p. 83-91, 1980.
- MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L.A.C.; GALETTI, Jr. P.M. Karyotypic study of some species of family Parodontidae (Pisces-Cypriniformes) *Caryologia*, v. 38, p. 47-55, 1985.
- MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L.A.C.; GALETTI, Jr. P.M. Structure and variability of nucleolar organizer regions in Parodontidae fish. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, v. 26, p. 564-568, 1984.
- MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L.A.C.; GALETTI, Jr.P.M. Distribution of sex chromosome mechanisms in Neotropical fish and description of a ZZ/ZW system in *Parodon hilarii* (Parodontidae). *Caryologia*, v. 46, p. 115-125, 1993.
- MÜLLER, H.J. Some genetic aspects of sex. *Am. Nat.*, v. 66, p. 118–138, 1932.
- MUÑOZ-LÓPEZ, M.; GARCÍA-PÉREZ, J.L. DNA Transposons: Nature and Applications in Genomics. *Current Genomics*, v. 11, p. 115-128, 2010.
- MURRAY, M.G.; THOMPSON, W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, v.8, p. 4321-4326, 1980.
- NAKAYAMA, I.; FORESTI, F.; TEWARI, R.; SCHARTL, M.; CHOURROUT, D. Sex chromosome polymorphism and heterogametic males revealed by two cloned DNA probes in the ZW/ZZ fish *Leporinus elongatus*. *Chromosoma*, v.103, p. 31-39, 1994.

NANDA, I.W.; FEICHTINGER; SCHMID, M.; SCHORÖDER, J.H.; EPPELEN, J.T. Simple repetitive sequences are associated with differentiation of the sex chromosomes in the guppy fish. *J. Mol. Evol.*, v. 30, p. 456-462, 1990.

NANDA, I., VOLFF, J.N.; WEIS, S.; KÖRTING, C.; FROSCHAUER, A. et al. Amplification of a long terminal repeat-like element on the Y chromosome of the platyfish, *Xiphophorus maculatus*. *Chromosome*, v. 109, p. 173-180, 2000.

NANDA, I.; SHAN, Z.; SCHARTL, M.; BURT, D. W.; KOEHELER, M.; NOTHWANG, G.; GRÜTZNER, F.; PATON, I.R.; WINDSOR, D.; DUNN, I.; ENGEL, W.; STAEHELI, P.; MIZUNO, S.; HAAF, T.; SCHMID, M. 300 million years of conserved synteny between chicken Z and human chromosome 9. *Nat genet*, v.21, p.258-259, 1999.

NEI, M. Linkage modification and sex difference in recombination. *Genetics*, v.63, p. 681 – 699, 1969.

NELSON, J.S. *Fishes of the world*. 4th ed. Hoboken, John Wiley & Sons, 2006. 624p.

O'CONNEL, M.; WRIGTH, J. Microsatellite DNA in fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, v. 7, p. 331-363, 1997.

NOWAK, R.B. Mining treasures from 'junk DNA'. *Science*, v. 263, n. 5147, p. 608-610, 1994.

O'CONNEL, M.; WRIGTH, J. Microsatellite DNA in fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, v. 7, p. 331-363, 1997.

OLIVEIRA, S.G.; BAO, W.; MARTINS, C.; JURKA, J. Horizontal transfers of Mariner transposons between mammals and insects. *Mobile DNA*, v. 3, p. 14, 2012.

ORGEL, L.E.; CRICK, F.H. Selfish DNA: the ultimate parasite. *Nature*, v. 284, n. 5757, p. 604-607, 1980.

OSTERTAG, E.M.; KAZAZIAN, H.H. Twin priming: a proposed mechanism for the creation of inversions in L1 retrotransposition. *Genome research*, v.11, p. 2059-2065, 2001.

PATHAK, R.U. et al. Boundary element-associated factor 32B connects chromatin domains to the nuclear matrix. *Molecular and cellular biology*, v. 27, n. 13, p. 4796-4806, 2007.

PAVANELLI, C.S. Família Parodontidae In: Buckup A B, Menezes N A, Ghazzi M S (Eds) *Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil*. Museu Nacional do Rio de Janeiro, 2007.

PAVANELLI, C.S. Family Parodontidae. Pp. 46-50. In: REIS, R. E., S. O. KULLANDER; & C. J. FERRARIS (Eds.). *Check list of the freshwater fishes of South and Central America*. Porto Alegre, EDIPUCRS , 742p., 2003.

PAVANELLI, C.S. New species of *Apareiodon* (Teleostei: Characiformes: Parodontidae) from the Rio Piquiri, upper Rio Paraná basin, Brazil. *Copeia*, p.89- 95, 2006.

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

PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J.W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.83, p. 2934-2938, 1986.

PLASTERK, RHA; IZSVÁK, Z; IVICS, ZOLTÁN. Resident aliens: the Tc1/mariner superfamily of transposable elements. *Trends in genetics*, v.15(8), p. 26-332, 1999.

PLOHL, M.; BORSTNIK, B.; LUCIJNIČJUSTVI, A.; UGARKOVDI, N.D. Evidence for random distribution of sequence variants in *Tenebrio molitor* satellite DNA. *Genet. Res.*, v. 60, p. 7-13, 1992.

PLOHL, M.; LUCHETTI, A.; MEŠTROVIC, N.; MANTOVANI, B. Satellite DNAs between selfishness and functionality: Structure, genomics and evolution of tandem repeats in centromeric (hetero)chromatin. *Gene*, v. 409, p. 72-82, 2008.

PONS, J.; GILLESPIE, R.G. Common origin of the satellite DNAs of the Hawaiian spiders of the genus *Tetragnatha*: evolutionary constraints on the length and nucleotide composition of the repeats. *Gene*, v. 313, p. 169-177, 2003.

PONS, J.; JUAN, C.; PETITPIERRE, E. Higher-order organization and compartmentalization of satellite DNA PIM357 in species of the coleopteran genus *Pimelia*. *Chromosome Research*, v.10(7), p. 597-606, 2002.

PUCCI, M.B.; BARBOSA, P.; NOGAROTO, V.; ALMEIDA, M.C.; ARTONI, R.F.; PANSONATO-ALVES, J.C.; FORESTI, F.; MOREIRA-FILHO, O.; VICARI M.R. Population differentiation and speciation in the genus *Characidium* (Characiformes: Crenuchidae): Effects of reproductive and chromosomal barriers. *Biological Journal of the Linnean Society* (in press), 2013.

R: A Language and Environment for Statistical Computing. (<http://www.Rproject.org>).

RAIZADA, M.N.; BREWER, K.V.; WALBOT, V. A maize MuDR transposon promoter shows limited autoregulation. *Molecular Genetics and Genomics*, v. 265, n. 1, p. 82-94, 2001.

ROBERTS, T.R. Osteology and classification of the neotropical characoid fishes of the families Hemiodontidae (Including Anodontidae and Parodontidae). *Bull. Mus. Comp. Zool.*, v.146, p. 411-472, 1974.

ROSA, R.; BELLAFRONTE, E.; MOREIRA-FILHO, O.; MARGARIDO, V.P. Description of the ZZ/ZW sex chromosome system and localization of 5S and 18S rDNA genes in *Apareiodon* sp. (Pisces, Characiformes, Parodontidae). *Genetica*, v. 128, p. 159-166, 2006.

SAITO, Y.; EDPALINA, R.R.; ABE, S. Isolation and characterization of salmonid telomeric and centromeric satellite DNA sequences. *Genetica*, v. 131, p. 157-166, 2007.

SCHEMBERGER, M.O. Citogenética molecular em espécies da família Parodontidae. (PISCES; CHARACIFORMES). Dissertação de Mestrado (Programa de Pós Graduação em Biologia Evolutiva). Universidade Estadual de Ponta Grossa. 2009.

SCHEMBERGER, M.O.; BELLAFRONTE, E.; NOGAROTO, V.; ALMEIDA, M.C.; SCHÜHLI, S.G.; ARTONI, R.F.; MOREIRA-FILHO, O.; VICARI, M.R. Differentiation of repetitive DNA sites and sex chromosome systems reveal closely related group in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes). *Genetica* v.139, p.1499–1508, 2011.

SCHNEIDER, M.C.; ALMEIDA M.C.; ROSA S.P.; COSTA C.; CELLA D.M. Evolutionary chromosomal differentiation among four species of *Conoderus* Eschscholtz, 1829 (Coleoptera, Elateridae, Agrypninae, Conoderini) detected by standard staining, C-banding, silver nitrate impregnation, and CMA3/DA/DAPI staining. *Genetica*, v.28, p.333-346, 2006.

SCHULTHEIS, C., ZHOU, Q., FROSCHAUER, A., NANDA, I., SELZ, Y., SCHMIDT, C., VOLFF, J. N. Molecular analysis of the sex-determining region of the platyfish *Xiphophorus maculatus*. *Zebrafish*, v. 3(3), p. 299-309, 2006.

SCHWEIZER D.; LOID L.J.; HAMILTON B. Heterochromatin and the phenomenon of chromosome banding. *Results Probl Cell Differ*, v. 14, p.235–254, 1987.

SHAO, H.; TU, Z. Expanding the Diversity of the IS630-Tc1-mariner Superfamily: Discovery of a Unique DD37E Transposon and Reclassification of the DD37D and DD39D Transposons. *Genetics*, v.159, p. 1103–1115, 2001.

SIJEN, T.; PLASTERK, R.H.A. Transposon silencing in the *Caenorhabditis elegans* germ line by natural RNAi. *Nature*, v. 426, n. 6964, p. 310-314, 2003.

SINZELLEA, L.; IZSVKA, Z.; IVICSA, Z. Molecular domestication of transposable elements: From detrimental parasites to useful host genes *Cell Mol Life Sci* v.66, p. 1073 – 1093, 2009.

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

SMIT, A.F.A. Initial survey of interspersed repeats in *Takifugu rubripes*. *Repbase Reports*, v. 2 (1), p. 54, 2002.

SMITH, G.P. Unequal crossover and evolution of multigene families. *Quant. Biol.*, v. 38, p. 507-513, 1974.

SMITH, S.G.; VIRKKI N. Coleoptera, p.59-70. In B. John (ed.), *Animal cytogenetics*. Berlin, Germany, Gebrüder Borntraeger, 1978. 366p.

STEIN, J.; PHILLIPS, R.B.; DEVLIN, R.H. Identification of the Y chromosome in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Cytogenet Cell Genet*, v. 92, p. 108-110, 2001.

STEIN, J.; REED, K.M.; WILSON, C.C.; PHILLIPS, R. A sex-linked microsatellite locus isolated from the Y chromosome of lake charr, *Salvelinus namaycush*. *Environmental Biol. of Fishes*, v. 64, p. 211-216, 2002.

- SUMNER, A.T. Chromosomes: organization and function. Malden, Blackwell Publishing, 2003.
- TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M; KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.*, v. 28(10), p. 2731–2739, 2011.
- TIMBERLAKE, E. Low repetitive DNA content in *Aspergillus nidulans*. *Science*, v. 202, n. 4371, p. 973-975, 1978.
- TRAVASSOS, H. Ictiofana de Pirassununga. I- Subfamília Parodontidae Eigenmann, 1916 (Actinopterygii-Cypriniformes). *Bol. Mus. Nac. (N. Sér. Zool.)*, v. 129, p. 1-31, 1955.
- UGARKOVIC, D.; PLOHL, M. Variation in satellite DNA profiles causes and effects. *The EMBO journal*, v. 21(22), p. 5955-5959, 2002.
- 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 janaeirensis*. *Cytogenet. Genome Res.*, v. 122, p. 67–72, 2008.
- VICARI, M.R.; MOREIRA-FILHO, O.; ARTONI, R. F.; BERTOLLO, L.A.C. ZZ/ZW sex chromosome system in an undescribed species of the genus *Apareiodon* (Characiformes, Parodontidae). *Cytogenet. Genome Res.*, v.114, p. 163-168, 2006.
- 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 in Neotropical fishes: Methods, applications and perspectives. *Journal of Fish Biology*, v.76, p.1094-1116, 2010.
- VICENTE, V.E.; BERTOLLO, L.A.C.; VALENTINI, S. R.; MOREIRA-FILHO, O. Origin and differentiation of sex chromosome system in *Parodon hilarii* (Pisces, Parodontidae). Satellite DNA, G and C-banding. *Genetica*, v. 119, p. 115-120, 2003.
- VICENTE, V.E.; JESUS, C.M.; MOREIRA-FILHO, O. Chromosomal localization of 5S and 18S rDNA genes in three *Parodon* species (Pisces, Parodontidae). *Caryologia*, v. 54, p. 365-369, 2001.
- WANG, C.; DEAKIN, J.; RENS, W.; ZENGER, K.; BELOV, K.; GRAVES, J.M.; NICHOLAS, F. A first-generation integrated tammar wallaby map and its use in creating a tammar wallaby first-generation virtual genome map. *BMC genomics*, v.12(1), p. 422, 2011.
- WHITE, M.J.D. *Animal Cytology and Evolution*. 3rd edition. Columbia Univ Press, NY, 1973. 468p.
- WICKER, T; SABOT, F; HUA-VAN, A; et al A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nat Rev Genet*, v.8, p.973–982, 2007.

YUNIS, J.J.; YASMINEH, W.G. Heterochromatin, satellite DNA, and cell Function. *Science*, v. 174, p. 1200-1209, 1971.

ZHANG, L.; XU, C.; YU, W. Cloning and characterization of chromosomal markers from a Cot-1 library of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Cytogenetic and Genome Research*, v. 137, n. 1, p. 31-41, 2012.

ZHOU, Y.H.; ZHENG, J.B.; GU, X.; SAUNDERS G.F.; YUNG W.K. Novel PAX6 binding sites in the human genome and the role of repetitive elements in the evolution of gene regulation. *Genome Res*, v. 12, p. 1716–1722, 2002.

ZIEGLER, C.G.; LAMTSCH, D.K.; STEINLEIN, C.; ENGEL, W.; SCHARTL, M.; SCHMID, M. The giant B chromosome of the cyprinid fish *Alburnus alburnus* harbours a retrotransposon-derived repetitive DNA sequence. *Chromosom. Res.*, v. 11, p. 23-35, 2003.

ZWICK, M.S.; HANSON, R.E.; MCKNIGHT, T.D.; NURUL-ISLAM-FARIDI, M.; STELLY, D.M. A rapid procedure for the isolation of Cot-1 DNA from plants. *Genome* 40, 138–142, 1997.

ANEXOS

Anexo I: Obtenção de Cromossomos Mitóticos (BERTOLLO et al., 1978)

Para obtenção de cromossomos mitóticos foi injetado intra-abdominalmente no animal uma solução aquosa de colchicina 0,025 %, na proporção de 1 ml/100 g de peso. O peixe foi então mantido em aquário bem aerado durante 50 - 60 minutos. Depois o exemplar foi anestesiado colocando-o em um recipiente contendo benzocaína diluída a 0.01 %, sacrificando-o em seguida. Foi retirada uma pequena porção do rim anterior, transferindo-a para cerca de 10 ml de solução hipotônica (KCl 0.075 M), dissociado as células com uma seringa desprovida de agulha. A incubação é realizada em estufa a 37 °C durante 25-30 minutos. O material foi ressuscitado com o auxílio de uma pipeta Pasteur, colocando-o em um tubo de centrífuga, descartando os fragmentos de tecidos não desfeitos. Depois foi acrescentado algumas gotas de fixador (3 partes de metanol para 1 de ácido acético glacial), recém preparado, re-suscitando o material repetidas vezes. O material foi centrifugado durante 10 minutos, a 900 rpm. O sobrenadante foi descartado com uma pipeta Pasteur. Foi então adicionado 5-7 ml do mesmo fixador, o material foi ressuscitado e centrifugado por mais 10 minutos, a 900 rpm. O último passo foi repetido. O material sobrenadante foi descartado e adicionado uma quantidade suficiente de metanol para que se tenha uma suspensão celular moderadamente concentrada (geralmente de 0,5 a 1,0 ml) e o material ressuscitado. O material foi armazenado em freezer, para posterior utilização.

Anexo II: Hibridação *in situ* fluorescente (FISH) (PINKEL et al., 1986)

A. Preparações das sondas

Para este estudo foram utilizadas as seguintes sondas nos cromossomos metafásicos de espécies da família Parodontidae: a) uma sonda de DNA satélite obtida a partir de digestão enzimática de *Parodon hilarii* denominada pPh2004 (VICENTE et al., 2003), b) uma sonda obtida por microdissecção da fração heterocromática do cromossomo W de *Apareiodon* sp. (*WAp*) (SCHEMBERGER et al., 2011), c) rDNA 18S (HATANAKA e GALETTI Jr, 2004), d) rDNA 5S (MARTINS e GALETTI Jr, 1999), e) sondas de DNA repetitivo obtidas por $C_{\alpha}t-1$, f) sondas de clones com fragmentos do elemento transponível Tc1-Mariner.

B. 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 $\mu\text{g/ml}$) 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 / MgCl_2 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 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.

C. 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 e, em seguida, lavadas com 0,1xSSC a 60 °C, por 15 minutos. Em seguida foram lavadas em Tween 20, por 5 minutos, incubação em 90 µl de tampão NFDM a 5 %, por 15 minutos em câmara úmida e duas lavagens com Tween 20, cinco minutos cada. Para a detecção da sonda, foram colocados sobre as lâminas 90 µl do anticorpo anti-estreptavidina conjugada com *Alexa Fluor* 488 (Invitrogen®) ou o anticorpo anti-digoxigenina conjugada com rodamina (Roche Applied Science®) em uma concentração de 0,25 µg/µl, permanecendo por 30 minutos 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 então contra corados com DAPI (0,2 µg/ml) diluído em uma solução “*antifade*” (Fluka®).

Anexo III: Marcação de sondas por nick translation e via PCR

As sondas foram marcadas pela técnica de *nick translation*, utilizando os compostos biotina 14 - dATP (Bionick Labeling System – Invitrogen[®]) ou digoxigenina 11- dUTP (Dig Nick Translation, Roche) e também por PCR/DOP-PCR utilizando concentrações adequadas de dNTPs e um dNTP acoplado a uma molécula repórter (biotina 16 dUTP - ou digoxigenina 11 dUTP - Roche[®]). O produto desta reação é precipitado com acetato de potássio e etanol *overnight* a -20 °C. Posteriormente, o material é centrifugado por 15 minutos a 13000 rpm, é descartado o sobrenadante, deixando o DNA marcado secar completamente em estufa a 37°C.

Anexo IV: Extração de DNA método CTAB (MURRAY e THOMPSON, 1980)

Foi adicionado em um tubo 0,2 gramas de fígado juntamente com 600 µl de tampão CTAB (concentração final: 2 % de CTAB; 1 M de NaCl; 0,1 M EDTA; 0,1 M Tris-HCl pH8), 13 µl de proteinase K (100mg/ml) e 5 µl de β-mercaptoetanol. Incubar a 60 °C por 10h ou até o tecido ser totalmente digerido. Depois foram adicionados 10 µl de RNase (10mg/ml) e o material é submetido a uma temperatura de 37 °C por 3h. Foram adicionados 600 µl de clorofórmio e *vortexado* suavemente durante 5 min. O material foi então submetido a uma centrifugação por 15 min. a 8000 rpm. O sobrenadante foi retirado e transferido para um novo tubo, 600 µL de etanol absoluto é adicionado sobre o material e deixado a -20 °C por 2h ou *overnight*. O material foi centrifugado a 14000 rpm por 15 min. e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi lavado com 500 µl de etanol 70 % e centrifugado novamente a 14000 rpm por 15 min. O sobrenadante foi retirado, e o tubo com o DNA foi deixado secando na estufa a 37 °C e depois ressuspendido em 50 µl de TE.

Anexo V: Cinética de reassociação Cot-1 (ZWICK et al., 1997)

O DNA genômico foi diluído a 100-500 ng/ μ l em 0,3 M de NaCl. Então foi colocado 500 μ l de DNA em um tubo e autoclavado por 3 a 5 min. a 1 atm/120 °C. Foi então aplicado 3 μ l de DNA em gel de agarose 1% para verificar os fragmentos em gel (fragmentos entre 100 e 1000 pb). Três alíquotas (0, 1 e 5) de 50 μ l de DNA autoclavado foram desnaturadas em banho a 95°C por 10 min. Os tubos foram passados para o gelo por 10s: então tratado imediatamente o tubo 0 com S1 nuclease e colocado os tubos 1 e 5 em banho a 65 °C para renaturação. Após 1 min. foi retirado o tubo 1 e tratado com S1 nuclease e após 5 min. retirado o tubo 5 é tratado com S1 nuclease. Para o tratamento com S1 nuclease é utilizado 1U da enzima para 1 μ g de DNA e 5,5 μ l de tampão 10X para o volume final de 50 μ l. Depois o material foi incubado a 37 °C por 8 min e congelado imediatamente em nitrogênio líquido. Foi então adicionado igual volume de fenol/clorofórmio (1:1) e depois centrifugado por 5 min. a 13000 rpm. A fase aquosa foi coletada e passada para um tubo novo. O DNA foi precipitado com 2,5 volumes de etanol absoluto gelado e deixado a -75 °C por 30 min. Depois foi centrifugado por 15 min. a 18,75x1011g a 4 °C, secado e ressuspendido em 50 μ l de água milliQ autoclavada.

Anexo VI: Obtenção do elemento Tc1-Mariner

A amplificação por PCR do elemento Tc1-Mariner foi realizada utilizando apenas um primer 5'CACTCACCGGCCACTTTATTA 3', que foi desenhado neste estudo da sequência da TIR da espécie *Takifugu rubripes* (SMIT, 2002). A PCR foi realizada em uma reação de 50 µl contendo 0,4 µM de primer, 70 ng de DNA genômico, 0,16 mM de dNTPs, 1x tampão da reação, 2,5 mM de MgCl₂ e 1U de *Taq* polimerase (Biotools®). O programa da reação foi: desnaturação inicial por 5 min a 94 °C, 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 64 °C por 1 min, e 72 °C por 1 min e 30 s e extensão final a 72 °C por 5 min. O produto de PCR foi visualizado em gel de agarose 1%. O produto da PCR obtido do DNA genômico das nove espécies de Parodontidae foi purificado com ExoSAP (GE healthcare®) seguindo instruções do fabricante.

Anexo VII: Clonagem

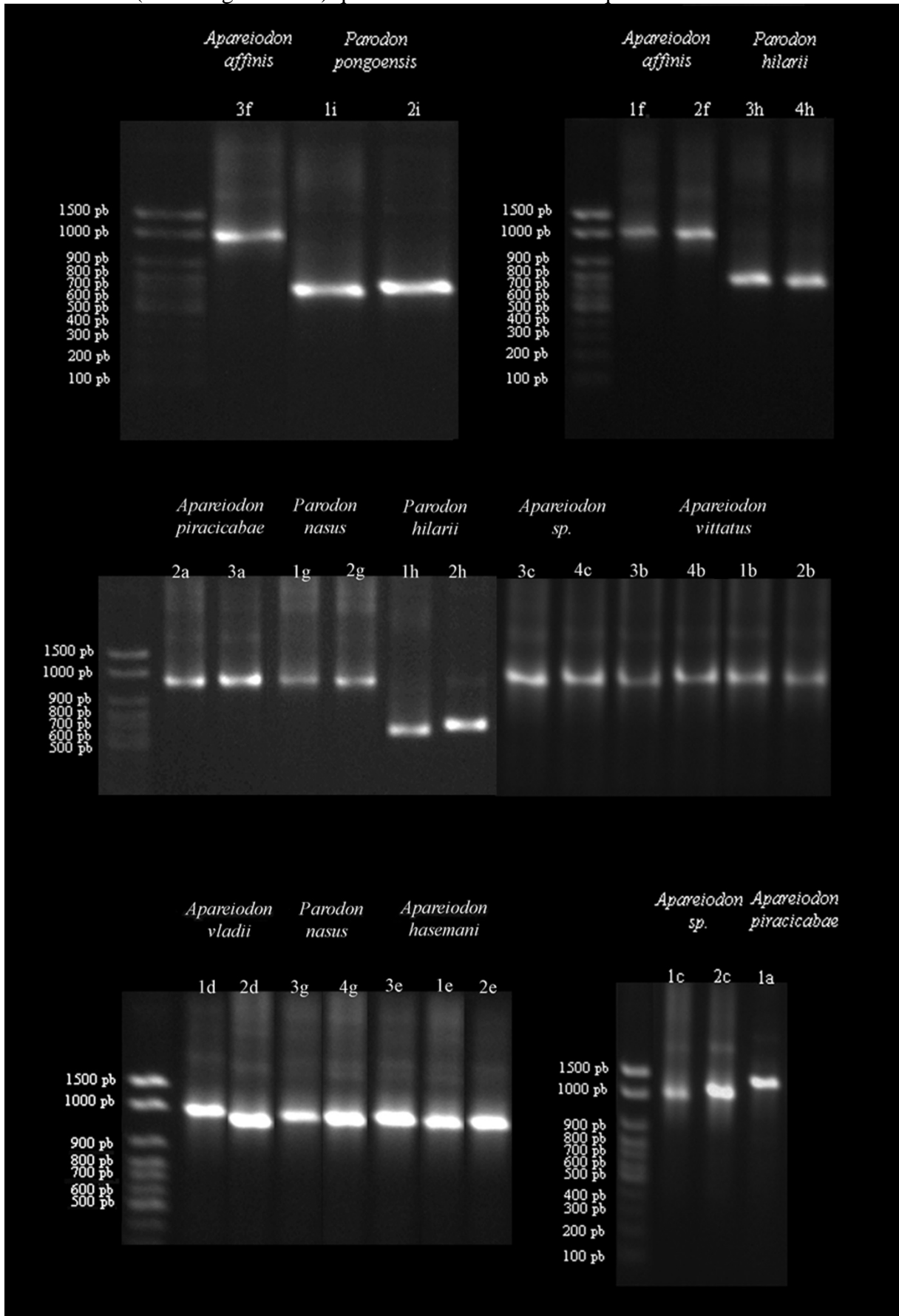
A. Inserção do fragmento de interesse no vetor e seleção de colônias.

As amostras de DNA provenientes da técnica de C_0t-1 foram ligadas ao vetor pMOSblue Blunt ended kit (Amersham Bioscience[®]) seguindo instruções de fabricante, e os fragmentos do elemento Tc1-Mariner obtidos pela PCR foram ligadas ao vetor pTZ57R/T (Fermentas[®]) seguindo instruções do fabricante) e clonados nas células competentes DH5 α *E.coli*. As colônias bacterianas recombinantes (brancas) foram transferidas para tubos de 15 ml contendo 4 ml de meio LB líquido acrescidos de ampicilina (100 mg/ml). As bactérias foram deixadas *overnight* sob agitação de 200 rpm a 37 °C. Os plasmídeos bacterianos foram extraídos por meio de mini-preparação plasmidial e parte da cultura de bactérias foi homogeneizada com glicerol e armazenada a -80 °C.

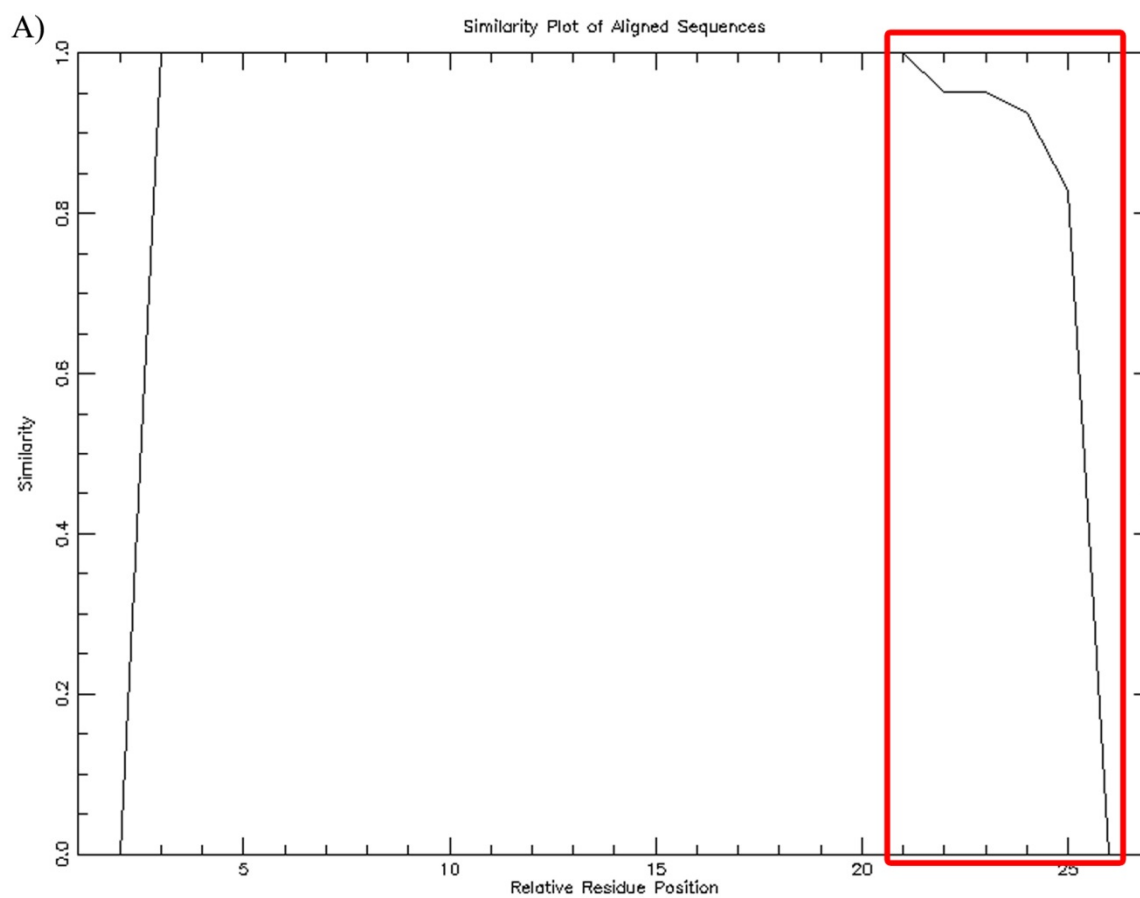
B. Seleção de clones de interesse

Os clones de interesse foram identificados através de reações de amplificação utilizando *primers* específicos para o plasmídeo. A reação é feita num volume total de 50 μ l (50 pmol de cada primer): M13F e M13R ou T7 e U19, tampão de reação 1x (KCl 50 mM; MgCl₂ 1,5 mM; Tris-HCl 10 mM), 2 mM de cada dNTP e 0,5 U de *Taq* DNA polimerase (Amersham Biosciences[®]). As reações de amplificação foram realizadas num termociclador, de acordo com as seguintes condições: um ciclo de 3 minutos a 95 °C seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 1 minuto a 51-55 °C, 2 minutos a 72 °C e um ciclo final de 5 minutos a 72 °C. Para verificar a efetividade da reação e a amplificação de fragmentos dentro do tamanho esperado é checado o produto de PCR em gel de agarose 1%.

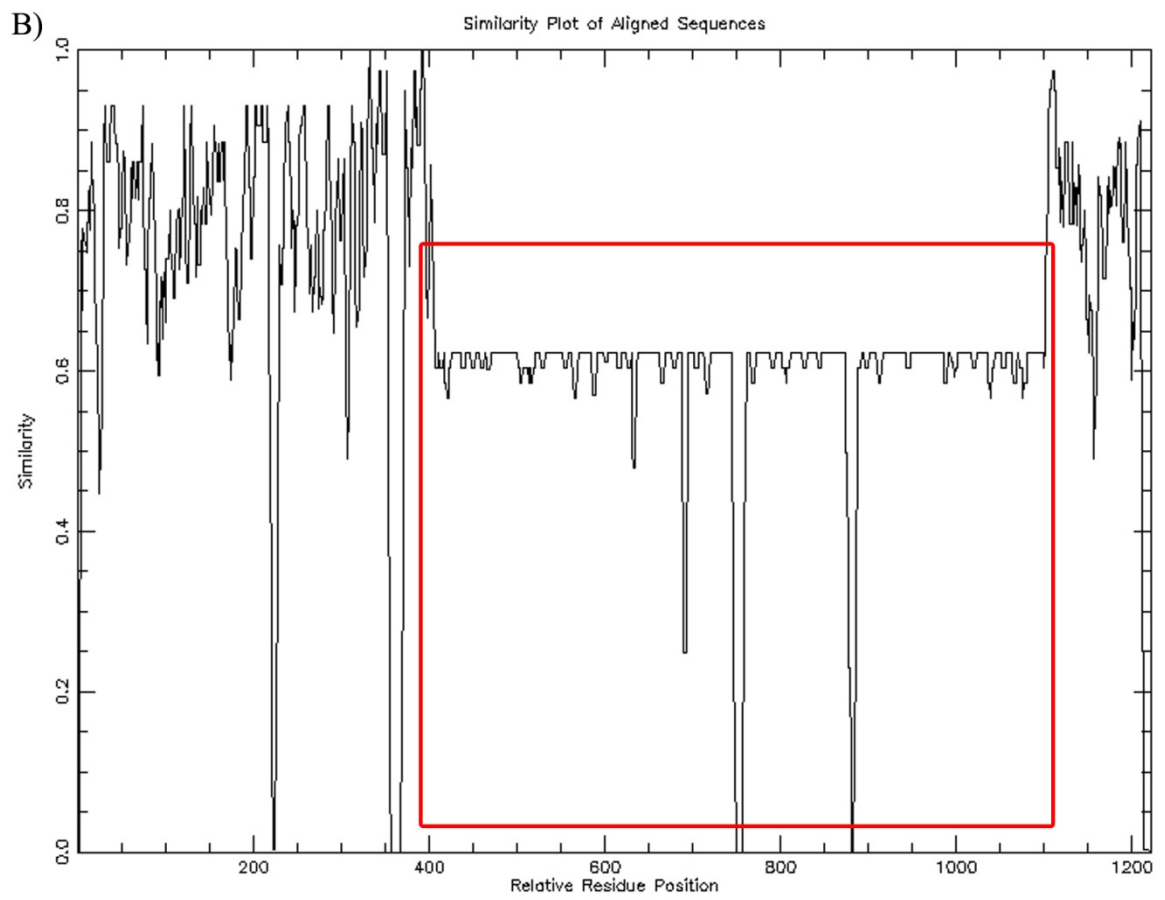
Anexo VIII: Clones contendo os fragmentos do elemento Tc1-Mariner das espécies de Parodontidae (Gel de agarose 1%) que foram submetidos ao sequenciamento.



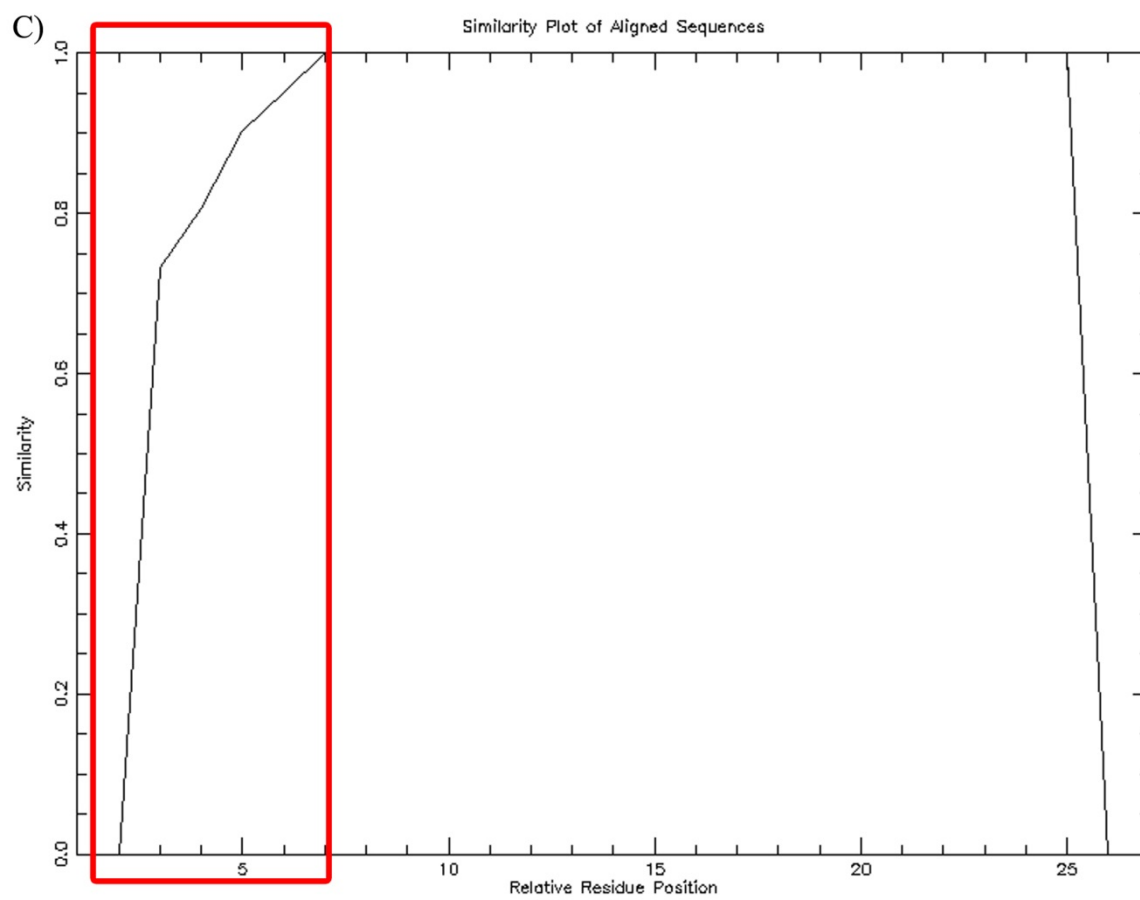
Anexo IX: Gráficos Plotcon (De A-C e H foram incluídas todas as sequências; de D-G e I não foram incluídas as sequências de *P. hilarii* e *P. pongoensis*; J somente foram incluídas as sequências de *P. hilarii* e *P. pongoensis*).



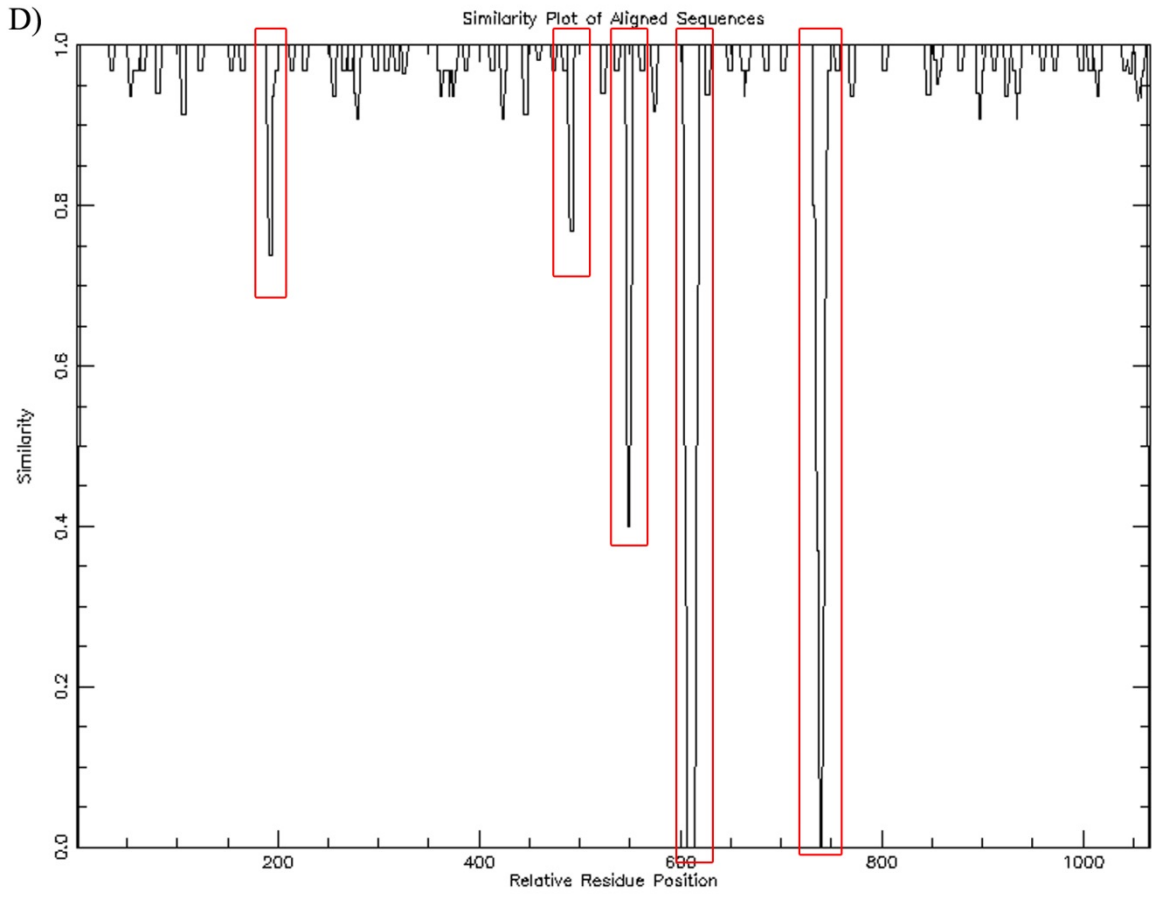
A- Região da TIR 5'.



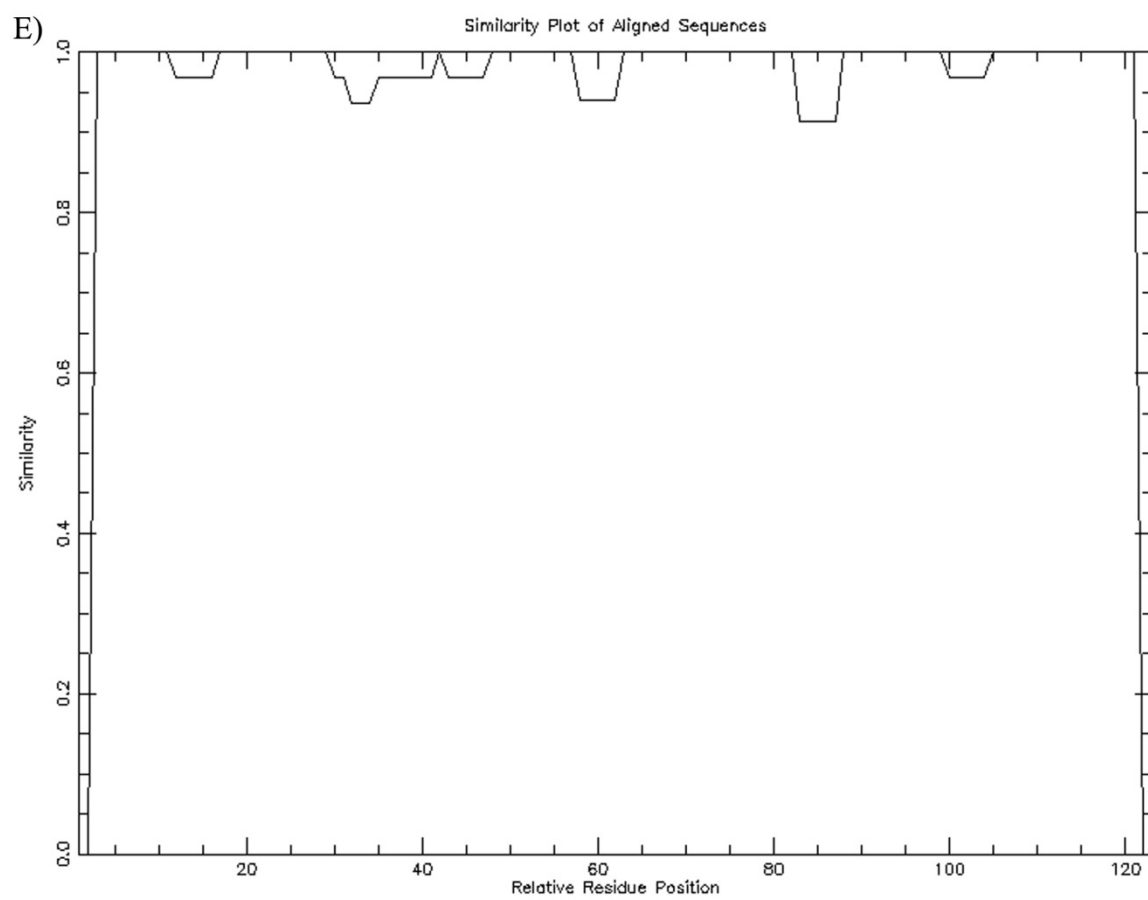
B- região interna.



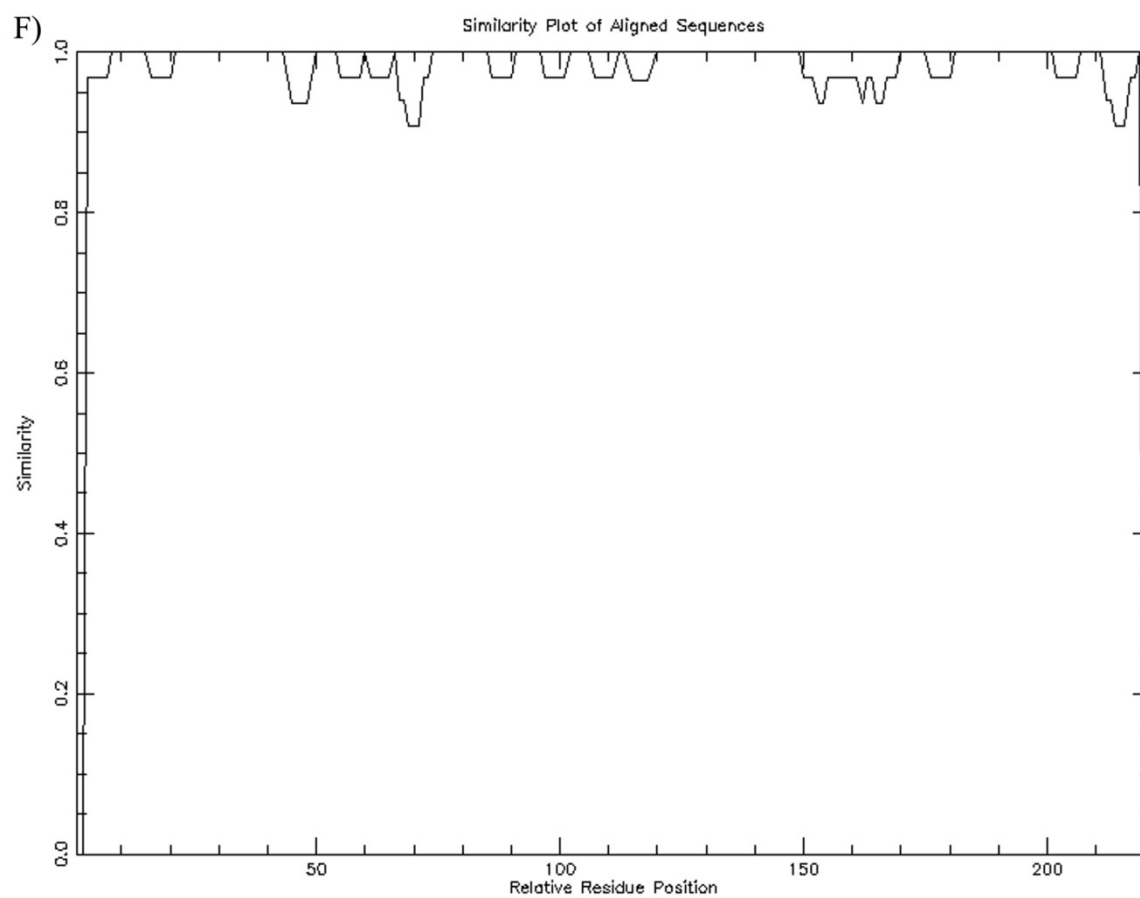
C- região TIR 3'.



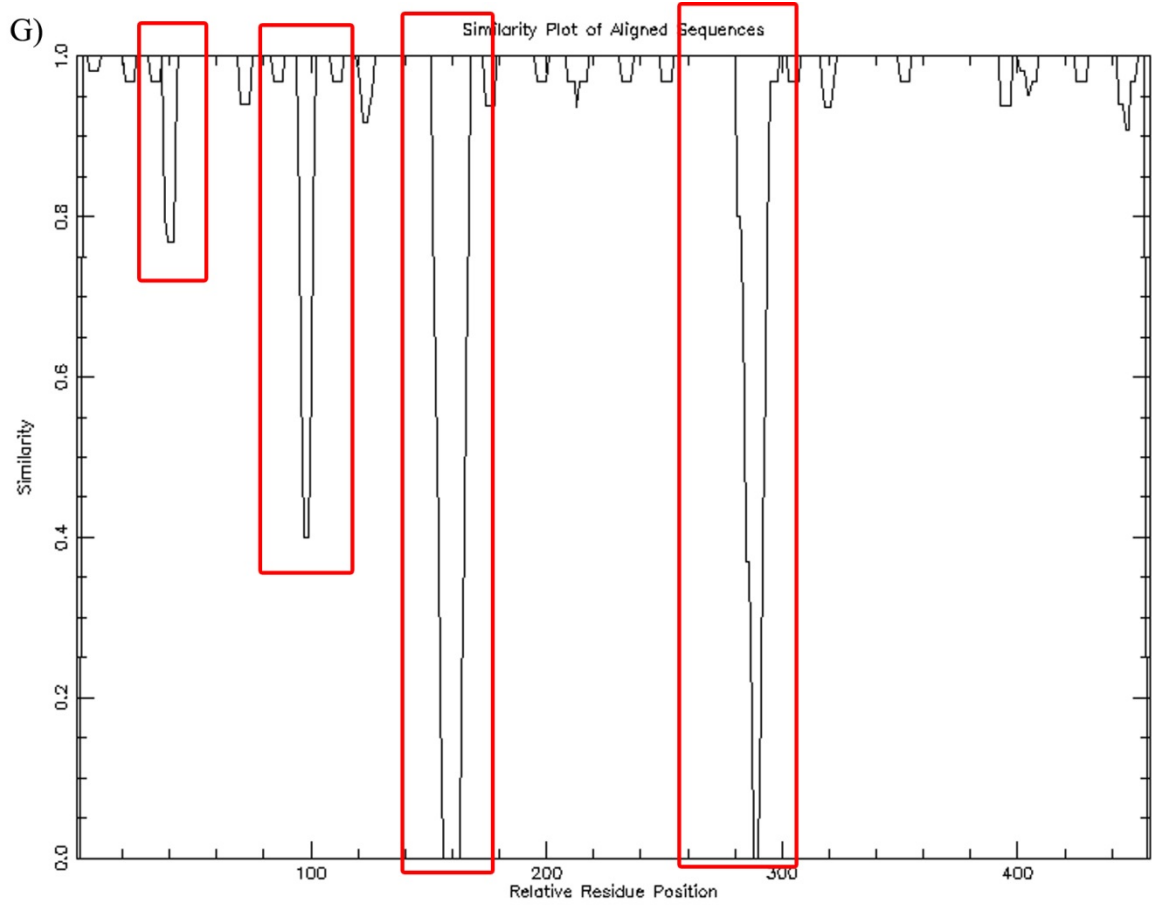
D- ORFs.



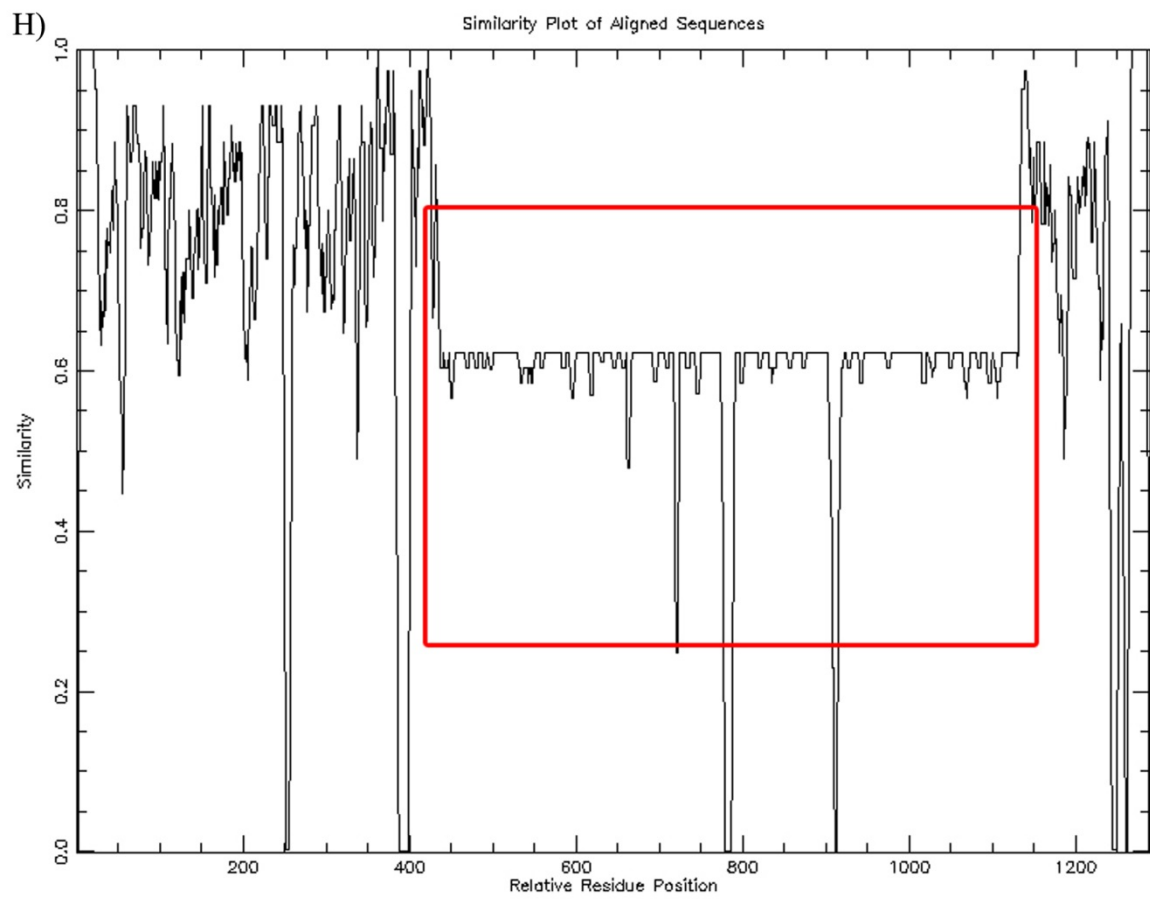
E- domínio HLD.



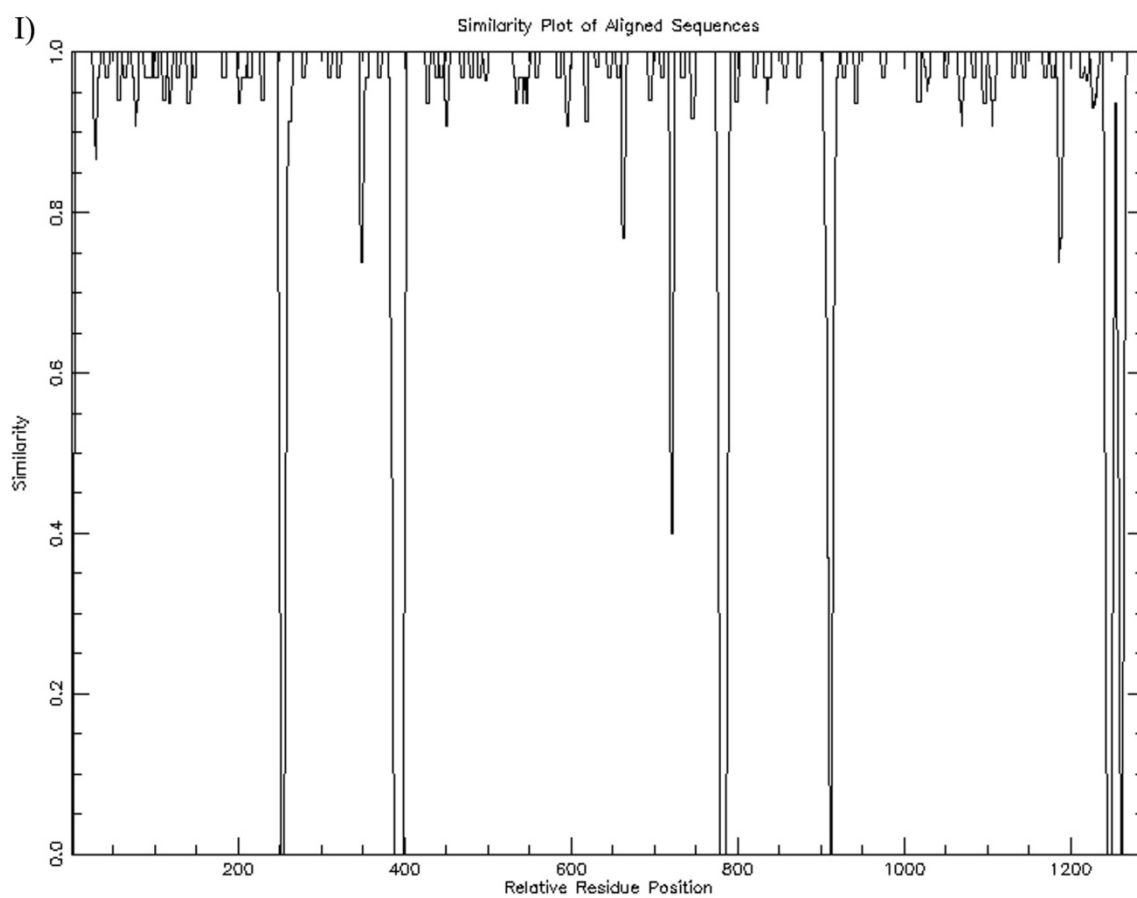
F- domínio HTH.



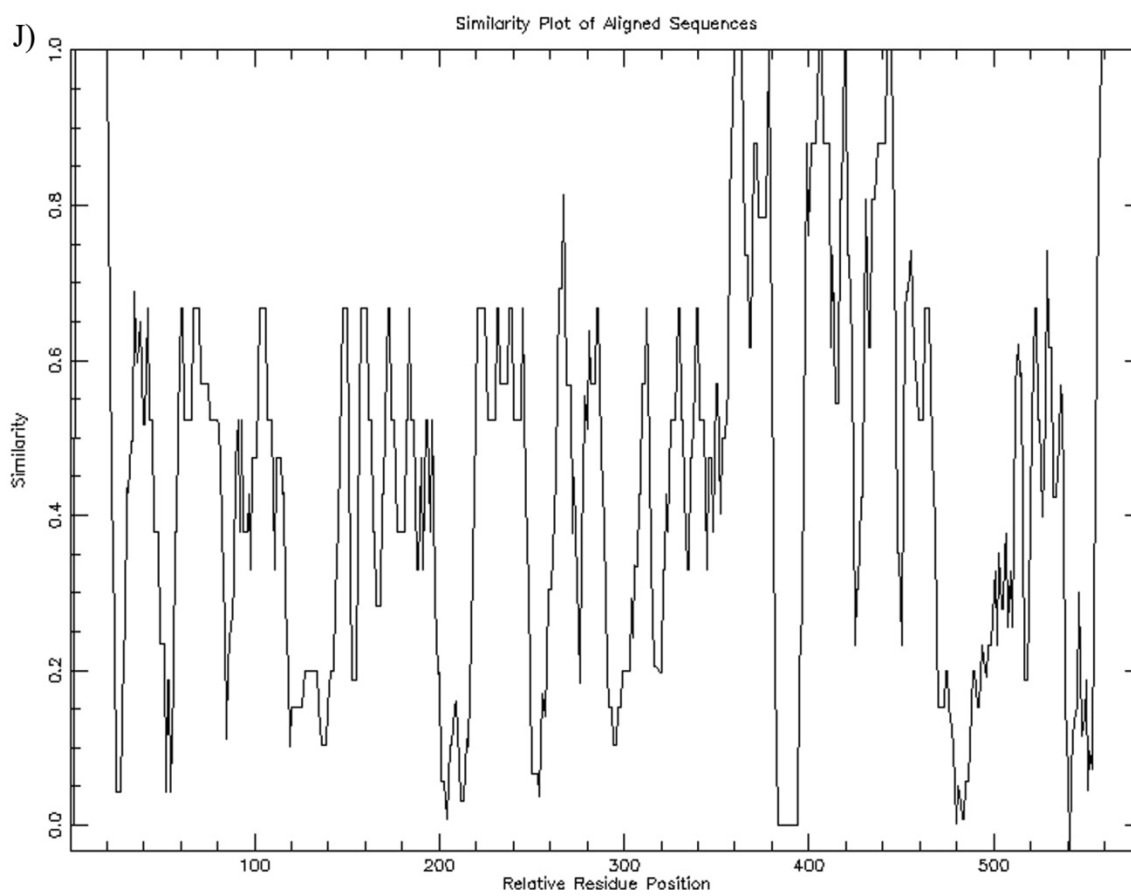
G- domínio DDE endonuclease.



H- sequências completas do Tc1-Mariner.



I- amostra contendo as sequências completas do Tc1-Mariner com exceção das espécies *P. hilarii* e *P. pongensis*.



J- amostra contendo somente as seqüências de *P. hilarii* e *P. pongoensis*.