



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA
MOLECULAR**

**Estudos citogenéticos em espécies da família Paradontidae (Actinopterygii:
Characiformes), com enfoque no papel dos DNAs repetitivos na evolução
cariotípica do grupo.**

Kaline Ziemniczak

Orientador: Prof. Dr. Orlando Moreira Filho

Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari

**SÃO CARLOS
- 2016 -**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E
BIOLOGIA MOLECULAR**

**Estudos citogenéticos em espécies da família Paradontidae (Actinopterygii:
Characiformes), com enfoque no papel dos DNAs repetitivos na evolução
cariotípica do grupo.**

Kaline Ziemniczak

Tese de Doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutor em Ciências, área de concentração: Genética e Evolução, sob orientação do Prof. Dr. Orlando Moreira Filho e co-orientação do Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari.

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Z66e Ziemniczak, Kaline
Estudos citogenéticos em espécies da família
Parodontidae (Actinopterygii : Characiformes), com
ênfase no papel dos DNAs repetitivos na evolução
cariotípica do grupo. / Kaline Ziemniczak. -- São
Carlos : UFSCar, 2016.
139 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2016.

1. Cromossomos sexuais. 2. DNAs repetitivos. 3.
Hibridação in situ fluorescente. 4. Evolução
cariotípica. I. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Kaline Ziemniczak, realizada em 01/07/2016:

Prof. Dr. Orlando Moreira Filho
UFSCar

Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari
UEPG

Prof. Dr. Roberto Ferreira Artori
UEPG

Prof. Dr. Fábio Porto-Foresti
UNESP

Profa. Dra. Michelle Orane Schemberger
UEPG

Profa. Dra. Priscilla Cardim Scacchetti
UNESP

Dedico este trabalho aos meus pais Lenir Aires Toledo Ziemniczak e Sandro Luiz Ziemniczak, e ao meu avô Belmiro Ziemniczak, pelo incentivo e apoio aos meus estudos.

“É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar. É melhor tentar, ainda que em vão que sentar-se, fazendo nada até o final. Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias frios em casa me esconder. Prefiro ser feliz embora louco, que em conformidade viver.”

Martin Luther King

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Lenir Aires de Toledo Ziemniczak e Sandro Luiz Ziemniczak pelo constante incentivo e apoio aos meus estudos, pelo amor, compreensão, confiança.

Ao meu avô Belmiro Ziemniczak por todos os seus conselhos, ensinamentos, pelo apoio e exemplo de sabedoria e humildade.

A minha irmã Gabriele Ziemniczak pela amizade e confiança.

A todos os meus familiares, tios e primos, por todos os momentos de alegria, as festas, e pelo exemplo de família unida e respeito por todos.

Ao meu companheiro e amado Nilo Boschilia, pelo amor, carinho, compreensão, por sempre estar ao meu lado me apoiando e me ajudando durante mais essa etapa que se conclui na minha vida. Amo você.

Ao meu orientador Professor Dr. Orlando Moreira Filho. Obrigada pela oportunidade de desenvolver este trabalho, pela amizade, pelos conselhos, pelas inúmeras coletas, sempre auxiliando e ajudando com sua sabedoria.

Ao meu co-orientador Professor Dr. Marcelo Ricardo Vicari. Obrigada por me orientar e me aguentar também no doutorado, serei eternamente grata a ti por toda a sua ajuda, por me entender, pelo voto de confiança, por ter me acolhido, pelos ensinamentos, incentivo, paciência, por me fazer acreditar que é possível.

Aos professores Roberto Ferreira Artoni, Mara Cristina de Almeida Matiello, Viviane Nogaroto Vicari, Mateus Henrique Santos, pelo auxílio, conselhos e ensinamentos.

Aos amigos e colegas do laboratório que de alguma forma ajudaram e contribuíram para a realização deste trabalho, seja auxiliando na rotina do laboratório, pelas conversas, risadas, festas e momentos de descontração: Michelle Orane (Michelinha), Michele Andressa (Michelona), Alain, Thaís Sczepanski, Thais Duls,

Marcela, Patrícia, Eliza, Caroline, Jordana, Luiz, Jonathan, Ieda, Zelinda, Alceu, Mariana, Lucas, Cleberson.

Meus agradecimentos especiais a minha amiga Viviane, logo que entrou no laboratório fizemos amizade, sempre nos ajudando, contribuindo e apoiando o trabalho da outra. Obrigada pela sua amizade e contribuição, você me ensinou muitas coisas, e eu me inspiro muito no seu jeito de levar a vida.

A minha grande amiga Naieli Bonatto pelo companheirismo, conversas, por todos os momentos que passamos juntas, sua amizade é essencial. Sinto muitas saudades.

Ao técnico Miguel Airton Carvalho, pelas gargalhadas, pelas conversas, por toda a ajuda no laboratório e nas coletas.

Ao programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). E também ao programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), pelo investimento e apoio.

Ao Laboratório de Citogenética e Evolução da UEPG e ao Laboratório de Biodiversidade Molecular e Cromossômica de Peixes da UFSCar, que forneceram a infraestrutura, o suporte e auxílio necessário para a realização deste trabalho.

Agradeço a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro e ao IBAMA – Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, por conceder a licença para a coleta do material utilizado.

SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	i
Lista de tabelas	iv
Resumo.....	v
Abstract	vi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Aspectos gerais da ordem Characiformes	1
1.2. Aspectos gerais da família Parodontidae	2
1.3. Família Parodontidae como modelo de estudos citogenéticos, moleculares e de sequências repetitivas	4
1.4. DNAs repetitivos com ênfase em peixes	9
1.5. Referências	13
2. JUSTIFICATIVA	26
3. OBJETIVOS	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
4.1. Amostras coletadas	28
4.2. Metodologia Citogenética Clássica	28
4.2.1. Obtenção de cromossomos mitóticos	28
4.2.1.1. Tratamento “ <i>in vivo</i> ”	28
4.2.1.2. Tratamento “ <i>in vitro</i> ”	29
4.2.1.3. Tratamento em campo	29
4.3. Metodologia Citogenética Molecular	29
4.3.1. Isolamento de DNAs repetitivos	29
4.3.2. Marcação das sondas	30
4.3.3. Hibridização <i>in situ</i> Fluorescente (FISH).....	31
4.3.4. Análises cariotípicas.....	31
4.4. Metodologia Molecular.....	32
4.4.1. Extração de DNA	32
4.4.2. Sequenciamento Nucleotídico	32
4.4.3. Análise das sequências nucleotídicas	32

4.5. Referências	32
4.6. Figuras e Tabelas	35
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1. Capítulo 1	39
Resumo	40
Abstract	41
5.1.1. Introdução	42
5.1.2. Material e Métodos	44
5.1.3. Resultados	46
5.1.4. Discussão	47
5.1.5. Agradecimentos	52
5.1.6. Referências	52
5.1.7. Figuras e Tabelas	59
5.2. Capítulo 2	63
Resumo	64
Abstract	66
5.2.1. Introdução	68
5.2.2. Material e Métodos	69
5.2.3. Resultados	71
5.2.4. Discussão	72
5.2.5. Agradecimentos	76
5.2.6. Referências	76
5.2.7. Figuras e Tabelas	83
5.3. Capítulo 3	89
Resumo	90
Abstract	91
5.3.1. Introdução	92
5.3.2. Material e Métodos	93
5.3.3. Resultados	97
5.3.4. Discussão	98

5.3.5. Agradecimentos	101
5.3.6. Referências	102
5.3.7. Figuras e Tabelas	110
6. CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS	114
7. ANEXOS.....	115
Anexo 1. Licença permanente para coleta de material zoológico MMA/IBAMA/SISBIO	115
Anexo 2 . Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Ponta Grossa.	116
Anexo 3. Obtenção de cromossomos mitóticos – tratamento “ <i>in vivo</i> ”	117
Anexo 4. Obtenção de cromossomos mitóticos – tratamento “ <i>in vitro</i> ”	118
Anexo 5. Obtenção de cromossomos mitóticos – tratamento em campo.....	119
Anexo 6. Reação de mini preparação plasmidial (kit “Illustra PlasmidPrep Mini Spin” (GE Healthcare)	120
Anexo 7. Reação de amplificação das histonas	121
Anexo 8. Reação de amplificação da sequência (GATA) _n e DNA telomérico (TTAGGG) _n	122
Anexo 9. Marcação de sondas por nick translation, kit dig-nick translation mix (Roche Applied Science)	123
Anexo 10. Marcação de sondas por nick translation, kit biotin-nick translation mix (Roche Applied Science)	124
Anexo 11. Marcação de sondas por nick translation, kit BioNick™ Labeling System (Invitrogen)	125
Anexo 12. Marcação de sonda por PCR.....	126
Anexo 13. Hibridação <i>in situ</i> fluorescente (FISH).....	127
Anexo 14. Extração de DNA	130
Anexo 15 - Purificação do produto da PCR pelo kit da GE healthcare - illustraGFX PCR DNA	131
Anexo 16. Versão do artigo (capítulo 1), publicado na revista Cytogenetic and Genome Research.....	132

Lista de Figuras

MATERIAIS E MÉTODOS

- Figura 1.** Foto das espécies de Parodontidae analisadas no presente trabalho. Fonte: *Apareiodon* sp., *A. piracicabae*, *A. affinis*, *P. nasus* e *P. hilarii* (Arquivo pessoal); *A. ibitiensis* e *P. pongoensis* (Pavaneli C.S); *A. hasemani* (www.fishbase.org.).....35
- Figura 2.** Mapa hidrográfico do Brasil, mostrando a distribuição das espécies de Parodontidae. Em (1) rio São João – PR; (2) rio Laranjinha – PR; (3) rio Verde – PR; (4) rio Passa Cinco – SP; (5) rio Mogi Guaçu – SP; (6) rio São Francisco - MG; (7) rio Piracicaba - SP; (8) rio Araguaia – GO. Ao lado as espécies estudadas numeradas de acordo com a sua localização nas bacias. Fotos: (A, C, E, F, G) – Arquivo pessoal; (B, H) Pavaneli C.S.; (D) fonte: www.fishbase.org.....36

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Capítulo 1

- Figura 1.** Cariótipos de espécimes fêmeas de Parodontidae submetidos à FISH com a sonda (GATA)_n. Os sinais de (GATA)_n são mostrados com rodamina (vermelho) e os cromossomos contra corados com DAPI (azul). Em (a) *A. piracicabae*; (b) *A. hasemani*; (c) *A. ibitiensis*; (d) *Apareiodon* sp. Barra = 5 µm.....59
- Figura 2.** Cariótipos de espécimes fêmeas de Parodontidae submetidos à FISH com a sonda (GATA)_n. Os sinais de (GATA)_n são mostrados com rodamina (vermelho), a sonda pPh2004 com FITC (verde) e os cromossomos contra corados com DAPI (azul). Em (a) *P. pongoensis*; (b) *P. nasus*; (c) *P. hilarii*; (d) *A. affinis*. Barra = 5 µm.....60
- Figura 3.** Metáfases de espécimes fêmeas de Parodontidae submetidas à FISH com a sonda (TTAGGG)_n marcada com rodamina (vermelho). Em (a) *A. piracicabae*; (b)

<i>A. hasemani</i> ; (c) <i>A. ibitiensis</i> ; (d) <i>Apareiodon</i> sp.; (e) <i>P. pongoensis</i> ; (f) <i>P. nasus</i> ; (g) <i>P. hilarii</i> ; (h) <i>A. affinis</i> . Barra = 5 μ m.....	61
--	----

Capítulo 2

Figura 1. Metáfases de exemplares fêmeas de *Apareiodon piracicabae* hibridizadas com diferentes microssatélites contendo oligonucleotídeos marcados. Os cromossomos foram contra corados com DAPI. Barra = 10 μ m.....83

Figura 2. Metáfases de exemplares fêmeas de *Parodon nasus* hibridizadas com diferentes microssatélites contendo oligonucleotídeos marcados. Os cromossomos foram contra corados com DAPI. Barra = 10 μ m.....84

Figura 3. Metáfases de exemplares fêmeas de *Apareiodon* sp. hibridizadas com diferentes microssatélites contendo oligonucleotídeos marcados. Os cromossomos foram contra corados com DAPI. As setas indicam o cromossomo sexual W. Barra = 10 μ m.....85

Figura 4. Metáfases de exemplares fêmeas de *Parodon hilarii* hibridizadas com diferentes microssatélites contendo oligonucleotídeos marcados. Os cromossomos foram contra corados com DAPI. As setas indicam o cromossomo sexual W. Barra = 10 μ m.....86

Figura 5. Metáfases de exemplares fêmeas de *Apareiodon affinis* hibridizadas com diferentes microssatélites contendo oligonucleotídeos marcados. Os cromossomos foram contra corados com DAPI. As setas indicam os cromossomos sexuais Z, W₁ e W₂. Barra = 10 μ m.....87

Capítulo 3

Figura 1. Alinhamentos das sequências de histonas obtidas neste estudo a partir do DNA genômico de *Apareiodon* sp. com sequências de outras espécies de peixes. Em

(a) alinhamento de H1+ERV e H1 parcial das espécies *Apareiodon* sp., *Astyanax altiparanae*, *A. paranae*, *A. bockmanni*. Em amarelo está destacado a região de identidade com o RTE ERV. Em (b) alinhamento da H3 parcial de *Apareiodon* sp., *Astyanax fasciatus*, *A. paranae*, *A. bockmanni*. Em (c) alinhamento da H4 parcial de *Apareiodon* sp., *Astyanax mexicanus*, *Poecilia latipinna* e *Salmo salar*.....110

Figura 2. Cariótipos das espécies de Parodontidae submetidas à FISH com sondas de histonas H1+ERV (com o elemento transponível ERV1-2 FCa-I) (sinais vermelhos), H3 (sinal lilás) e H4 (sinal verde). Os cromossomos em destaque mostram os sítios das três sequências separadamente.....111

Figura 3. Cariótipos das espécies de Parodontidae submetidas à FISH com sondas de histonas H1 parcial (sem o elemento transponível ERV1-2 FCa-I) (sinal vermelho), H3 (sinal lilás) e H4 (sinal verde). Os cromossomos no destaque vermelho mostram os sítios das três sequências separadamente. Os cromossomos no destaque branco evidenciam os cromossomos portadores do DNAr 18S (sinal verde) e DNAr 5S (sinal lilás). Em *A. piracicabae* (F), o par 27 além dos sítios das histonas também possui o DNAr 18S.....112

Lista de tabelas

MATERIAIS E MÉTODOS

Tabela 1. Espécie, pontos de amostragem, distribuição nas bacias hidrográficas e número de espécies estudadas.....	34
---	----

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Capítulo 1

Tabela 1. Espécies estudadas e locais de amostragem de oito espécies de Parodontidae. As espécies são mantidas no Museu de Zoologia do Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura da Universidade Estadual de Maringá (NUPELIA) e no Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP).....	58
--	----

Capítulo 2

Tabela 1. Espécies estudadas e locais de amostragem. As espécies são mantidas no Museu de Zoologia do Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura da Universidade Estadual de Maringá (NUPELIA) e no Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP).....	82
---	----

Capítulo 3

Tabela 1. Espécies estudadas e locais de amostragem. As espécies são mantidas no Museu de Zoologia do Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura da Universidade Estadual de Maringá (NUPELIA) e no Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP).....	109
---	-----

Resumo

Parodontidae é organizada em três gêneros agrupados de acordo com suas características morfológicas: *Parodon*, *Saccodon* e *Apareiodon*. 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 com mapeamento de DNAs repetitivos por hibridação *in situ* fluorescente nos cromossomos de algumas espécies demonstraram possível origem, diferenciação e evolução dos sistemas de cromossomos sexuais desta família. No entanto, estudos mais aprofundados são fundamentais para um maior esclarecimento do papel genômico das sequências repetitivas. Neste estudo foram descritas a localização das sequências (GATA)_n e (TTAGGG)_n em oito espécies de Parodontidae, com o objetivo de avaliar os prováveis mecanismos de diversificação cromossômica, especialmente aqueles relacionados à diferenciação molecular do cromossomo W. Também foram mapeadas 16 sequências de microssatélites em cinco espécies da família, com objetivo de verificar o acúmulo de DNA repetitivo nos cromossomos e sua atuação na diferenciação cariotípica dos cromossomos sexuais heteromórficos. Por fim, sequências parciais das histonas H1, H3 e H4 e também dos DNAr 5S e 18S foram determinadas e tiveram sua localização cromossômica em seis espécies desta família. Com os resultados, foi possível determinar duas sequências de H1 para Parodontidae, H1 parcial e H1+ERV, além das sequências parciais para os genes H3 e H4. Todas essas análises propiciam uma melhor compreensão dos processos de diferenciação e evolução cariotípica na família Parodontidae.

Palavras-chave: cromossomos sexuais, hibridação *in situ* fluorescente, evolução cariotípica, DNAs repetitivos.

Abstract

Parodontidae is organized in three genera according to their morphological characteristics: *Parodon*, *Saccodon* and *Apareiodon*. The diploid number is conserved in this group with $2n=54$ chromosomes, with species without heteromorphic sex chromosomes systems and other with sex chromosomes system, with female heterogamety, ZZ/ZW or ZZ/ZW₁W₂. Studies of chromosome localization using repetitive DNAs chromosomes of species show possible origin, differentiation and evolution of sex chromosomes in Parodontidae. However, further studies using repeats DNAs are fundamental for a better comprehension of its pathway genomic structural or functional. In this study were described the chromosome location of the (GATA)_n and (TTAGGG)_n sequences in eight species of Parodontidae, with aim to evaluate the probable mechanisms of chromosomal diversification, especially those related to molecular differentiation of W chromosome. Also were mapped 16 microsatellites sequences in five species of the family to check the accumulation of the repetitive DNAs in the chromosomes and verify its performance in the karyotype and sex chromosomes differentiation. Yet, partial sequences of the histone H1, H3 and H4 were determined and had chromosomal localization in six species of Parodontidae. The data show two H1 sequences in Parodontidae genomes, herein called H1 partial and H1+ERV, in addition to partial sequences for the genes H3 and H4. The chromosomal localization of histone genes show H1, H3 and H4 in main cluster and the presence of the orphans genes for H1 + ERV. Hence, this study provide some advances in the understanding of the repetitive DNA mechanism in the karyotypic differentiation and evolution in the family Parodontidae.

Keywords: sex chromosomes, fluorescence *in situ* hybridization, karyotype evolution, repetitive DNAs.

1. INTRODUÇÃO

Os peixes representam o grupo mais diversificado e um dos mais interessantes para estudos de variabilidade genética e de evolução entre os vertebrados, com aproximadamente 33.592 espécies, as quais se encontram distribuídas em 5.136 gêneros (Eschmeyer & Fong, 2016; Nelson, 2006).

A ictiofauna neotropical é uma das mais diversificadas do mundo, representa um oitavo da diversidade de vertebrados vivos e constitui a maior de todas as faunas epicontinentais do planeta (Vari & Malabarba, 1998). A grande diversidade de peixes existentes nas bacias hidrográficas tropicais e subtropicais da região Neotropical demonstra o aumento significativo do conhecimento sobre a ictiofauna de água doce do Brasil, compreendendo 2.587 espécies catalogadas até 2006 (Buckup et al., 2007). A alta diversidade de peixes de água doce do Brasil deve-se principalmente à presença de diversos grandes sistemas hidrográficos, com considerável distinção ictiofaunística entre si (Rosa & Lima, 2008).

A grande riqueza de espécies de peixes reflete-se também na sua diversidade morfológica e ecológica, e a maior parte dessa riqueza e diversidade encontra-se em águas brasileiras (Lowe-McConnell, 1999), especialmente nas águas doces neotropicais, onde cinco ordens podem ser destacadas, juntas elas detêm mais de 95% das espécies de peixes de água doce conhecidas no Brasil, sendo a ordem Characiformes a mais numerosa, seguida dos Siluriformes, Perciformes, Cyprinodontiformes e Gymnotiformes (Rosa & Lima, 2008).

1.1. Aspectos gerais da ordem Characiformes

A ordem Characiformes é a mais abundante dentre os Ostariophysa, com 2.083 espécies consideradas válidas e 23 famílias (Eschmeyer & Fong, 2016). São

estritamente de água doce e apresentam uma grande variedade na forma do corpo, estrutura mandibular, dentição e anatomia interna, que é uma fonte importante para estudos de filogenia deste grupo.

Dentre as características morfológicas marcantes dos Characiformes, os dentes se apresentam desenvolvidos na maioria das espécies, o corpo geralmente é coberto por escamas, as nadadeiras pélvicas estão presentes (com 5-12 raios), a nadadeira anal varia de curta a moderadamente longa (com cerca de 45 raios), a linha lateral é geralmente oblíqua, os barbilhões são ausentes, e possuem cerca de 19 raios na nadadeira caudal (Nelson, 1994).

1.2. Aspectos gerais da família Parodontidae

A família Parodontidae Eigenmann, 1910, é considerada relativamente pequena quando comparada a outras famílias de Characiformes. São peixes fusiformes com um colorido cinza-claro e nadadeiras peitorais e pélvicas bem desenvolvidas (Pavanelli, 2003). Habitam geralmente rios de água corrente e de fundo rochoso, especialmente corredeiras e cachoeiras, onde permanecem sob o fundo, raspando e ingerindo os organismos que ali se desenvolvem (Nakatani et al., 2001). Suas espécies podem ser facilmente diagnosticadas dos demais Characiformes por possuírem boca inferior com mandíbula espatulada e desprovida de dentes anteriormente, dentes pré-maxilares pedunculados com borda distal larga, multicuspidada e distribuídos em uma única série, e pela ausência de lábio superior e fontanela (Pavanelli, 2003).

Parodontidae é organizada em três gêneros agrupados de acordo com suas características morfológicas: *Parodon* foi o primeiro gênero a ser descrito por Valenciennes (1850) e *Saccodon* o segundo gênero, por Kner (1864). O gênero

Apareiodon só foi descrito em 1916, por Eigenmann que o diferenciou de *Parodon* pela ausência de dentes laterais (Pavanelli, 1999). Atualmente conta com 32 espécies válidas (Eschmeyer & Fong, 2016), sendo que 16 são encontradas em território brasileiro (Traldi, 2015).

Quanto à distribuição geográfica dos membros da família Parodontidae, 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 & Britski, 2003).

Devido à falta de caracteres diagnósticos fortes para um correto agrupamento filogenético dos representantes desta família, surgem muitos questionamentos relacionados à sistemática do grupo (Pavanelli & Britski, 2003; Ingenito, 2008; Schemberger et al., 2011; Bellafronte et al., 2011, 2013). Diante deste quadro, muitos pesquisadores discutem a atual divisão dos gêneros de Parodontidae devido, principalmente, ao fato destes gêneros serem tradicionalmente descritos com base na presença ou ausência de caracteres morfológicos, sem considerar os possíveis valores apomórficos destes caracteres (Pavanelli & Britski, 2003; Ingenito & Buckup, 2005; Ingenito, 2008). Por outro lado, estudos citogenéticos têm demonstrado que embora problemas quanto à alocação das espécies nos gêneros *Parodon* e *Apareiodon* possam ocorrer, alguns agrupamentos monofiléticos podem ser destacados em relação à presença de cromossomos sexuais morfológicamente diferenciados e presença de DNAs repetitivos (Bellafronte et al., 2011; Schemberger et al., 2011).

1.3. Família Parodontidae como modelo de estudos citogenéticos, moleculares e de sequências repetitivas

Estudos citogenéticos demonstram que a família Parodontidae apresenta um número diploide conservado de 54 cromossomos. No entanto, a utilização de marcadores cromossômicos mostra uma enorme diversidade interespecífica nesta família, possibilitando inferir sobre a diversificação dos genomas (Moreira-Filho et al., 1980; 1993; Jesus & Moreira-Filho, 2000a; 2000b; Vicente et al., 2003; Schemberger et al., 2011). Bellafronte et al. (2011) inferiram com marcadores de citogenética clássica ($2n$, fórmula cariotípica, distribuição da heterocromatina e das RONS) e molecular (FISH com DNAr 5S, DNAr 18S e DNA satélite pPh2004) que as espécies *A. affinis*, *P. hilarii*, *P. moreirai*, *P. nasus* e *P. pongoensis* compartilham um conjunto de marcadores cromossômicos e, por isso, poderiam representar um agrupamento distinto de *A. piracicabae*, *A. vittatus*, *A. ibitiensis* e *A. vladii* entre os Parodontidae.

Schemberger et al. (2011) 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*. Neste estudo *Parodon* e *Apareiodon* formam clados distintos, com exceção de *A. affinis*. Entretanto, estudos com sequenciamento do gene mitocondrial Citocromo Oxidase I (COI) de espécies do gênero *Parodon* e *Apareiodon*, confirmam estes gêneros como unidades distintas dentro de Parodontidae, e a espécie *A. affinis* é mantida no gênero de origem. Portanto, existe a ocorrência de dois clados bem sustentados, corroborando a manutenção destes dois gêneros (Bellafronte et al., 2013).

Estudos convencionais têm demonstrado a ocorrência de heteromorfismo de cromossomos sexuais ZZ/ZW em *P. hilarii*, *P. moreirai*, *A. ibitiensis* (rio Verde, PR) citado como *Apareiodon* sp., *A. vladii* (rio Piquiri-PR), *A. ibitiensis* (rio Piumhi-MG) e *A. hasemani*, além do sistema múltiplo ZZ/ZW₁W₂ em *A. affinis* (Moreira-Filho et al.,

1980; 1993; Centofante et al., 2002; Rosa et al., 2006; Vicari et al., 2006; Bellafronte et al., 2009; 2011). Assim, enquanto em algumas espécies de *Parodon* e *Apareiodon* não se observa cromossomos sexuais morfologicamente diferenciados, as espécies que apresentam cromossomos sexuais poderiam estar mais relacionadas filogeneticamente (Schemberger et al., 2011).

Vicente et al., (2003) relataram a primeira descrição de um DNA satélite em Parodontidae, denominado *pPh2004*, isolado de *P. hilarii* através de digestão do genoma pela enzima *Eco RI*, identificado como uma sequência monomérica de 200 pb e de 60% rico em bases A-T. A hibridização *in situ* fluorescente com o satélite *pPh2004*, revelou sítios em *P. hilarii* (Vicente et al., 2003) e *P. moreirai*, citado como *Parodon* sp. (Centofante et al., 2002). A partir de então, inúmeros estudos de localização *in situ* do DNA satélite *pPh2004* foram realizados na família Parodontidae (Bellafronte et al., 2009; 2011; Schemberger et al., 2011).

No estudo da diferenciação dos cromossomos sexuais, houve a obtenção da sonda da fração heterocromática do cromossomo W de *A. ibitiensis*, denominada *WAp* (Vicari et al., 2010), e seu mapeamento sobre os cromossomos de nove espécies de Parodontidae evidenciou sítios terminais em alguns cromossomos em todas as espécies estudadas, além da fração heterocromática dos cromossomos sexuais (Schemberger et al., 2011). Steinemann & Steinemann (2005) propuseram a hipótese de origem e diversificação de cromossomos sexuais a partir do acúmulo de retroelementos em regiões não recombinantes. Outros autores consideram que o heteromorfismo de cromossomos sexuais é gerado por acúmulo ou amplificação de DNAs repetitivos *in tandem* (Devlin et al., 1998; Almeida-Toledo & Foresti, 2001; Artoni & Bertollo, 2002; Vicari et al., 2008). Em Parodontidae, duas hipóteses foram consideradas por Schemberger et al. (2011) para origem do DNA repetitivo *WAp*: (1) ser derivado de

famílias de DNA repetitivo disperso, ou ainda (2) compor uma classe de DNA satélite. Na hipótese de Müller para origem de cromossomos sexuais XY, a degeneração do Y ou W é consequência de sua permanente heterozigosidade (Müller, 1932). A degeneração do Y ou W é caracterizada por dois principais fenômenos: (1) a mudança de regiões eucromáticas em heterocromáticas, e (2) a erosão da atividade gênica do Y ou W. Por sua vez, na grande maioria dos sistemas de cromossomos sexuais ZW, o cromossomo heteromórfico W sofre modificações de acúmulo de sequências heterocromáticas e erosão da atividade gênica (Charlesworth et al., 2005).

No estudo realizado por Schemberger et al. (2011) os resultados da FISH com sonda *WAp* permitem inferir que o par de proto cromossomos sexuais de Parodontidae deve ter sido semelhante ao cromossomo Z presente em *A. ibitiensis* e *A. vladii*. Vicente et al. (2003) descreveram o DNA repetitivo *pPh2004* presente sobre autossomos e os cromossomos sexuais ZW de *P. hilarii*. Esta classe de DNA satélite *pPh2004* teve origem, possivelmente, sobre o par de proto cromossomos sexuais no gênero *Parodon* (Schemberger et al., op cit.), uma vez que as espécies *P. pongoensis*, *P. nasus*, *P. moreirai* e *P. hilarii*, apresentaram sítios do DNA satélite *pPh2004* em regiões terminais no braço longo de um par metacêntrico comparável, sendo este correspondente ao cromossomo Z nas espécies portadoras de sistema de cromossomos sexuais simples.

A amplificação e movimento de DNA satélite nos cromossomos é um fato bem documentado em alguns organismos (Hamilton et al., 1990; Modi, 1993) e suspeita-se que estes eventos exerçam um papel importante na evolução cariotípica (Wichman et al., 1991; Hamilton et al., 1992; Li et al., 2000; Vicari et al., 2010). A diferenciação dos DNAs repetitivos de Parodontidae está de acordo com a hipótese de Wichman et al. (1991), que sugere que o movimento intragenômico de sequências repetitivas pode

promover ou acelerar a evolução cromossômica. Em Parodontidae, a distribuição e expansão do DNA satélite *pPh2004* também exerce papel fundamental na diversificação dos cromossomos, porém, este DNA satélite, embora presente no cromossomo sexual de algumas espécies, não está envolvido com quebras ou com a diferenciação dos cromossomos sexuais do sistema simples. Por outro lado, o DNA repetitivo *WAp* tem proporcionado a diferenciação do sistema simples *ZZ/ZW* e, conjuntamente com a sequência *pPh2004* atuado na diferenciação do sistema múltiplo *ZZ/ZW₁W₂* (Schemberger et al., op cit.).

Com todas estas informações citogenéticas e ancorados com uma análise filogenética com marcadores cromossômicos, (Schemberger et al., 2011) hipotetizaram o possível ancestral de Parodontidae: $2n=54$ cromossomos meta/submetacêntrico, pouca heterocromatina proximal e terminal presente nos cromossomos, RON em região terminal de um par metacêntrico, ausência de DNA satélite *pPh2004* e ausência de sistemas de cromossomos sexuais heteromórficos. No que diz respeito à diferenciação do par sexual, a ocorrência somente de sítios *WAp* terminais representam a condição plesiomórfica para o carácter. Dessa forma, a manutenção do estado ausência de cromossomos sexuais diferenciados e presença de sítios *WAp* terminais foram diagnosticadas como simplesiomorfias para *A. piracicabae* e *A. vittatus* (Schemberger et al., op cit.).

Em Parodontidae, o sistema de cromossomos sexuais simples *ZZ/ZW* tem origem por uma inversão paracêntrica de um sítio terminal da sonda *WAp* para a região proximal do braço curto de um par cromossômico metacêntrico e, posterior amplificação desta sequência levando a diferenciação do cromossomo sexual *W* na maioria das espécies (Schemberger et al., 2011). Este estudo demonstrou com marcadores cromossômicos grupos de espécies próximas: sem cromossomos sexuais

heteromórficos (*A. piracicabae* e *A. vittatus*); com proto cromossomos sexuais e presença de DNA satélite pPh2004 (*P. nasus* e *P. pongoensis*); com sistema de cromossomos sexuais heteromórficos (*A. ibitiensis* e *A. vladii*); com sistema de cromossomos sexuais heteromórficos e presença de DNA satélite pPh2004 (*P. moreirai* e *P. hilarii*), além da espécie com sistema de cromossomos sexuais múltiplos e DNA satélite pPh2004 (*A. affinis*). Dessa forma, os principais marcadores cromossômicos até então mapeados que tem atuado na diversificação cromossômica têm sido os DNAs repetitivos pPh2004 e WAp juntamente com a diferenciação dos sistemas de cromossomos sexuais heteromórficos.

Por sua vez, a origem do sistema sexual ZZ/ZW₁W₂ em *A. affinis* foi hipotetizado pela ocorrência de rearranjos cromossômicos do tipo translocação autossomo proto cromossomos sexuais portadores de DNA satélite pPh2004 (Schemberger et al., 2011). Na sequência, esta nova combinação sofreria rearranjos do tipo fissão cêntrica, seguido de inversão pericêntrica originando os cromossomos W₁ e W₂ como proposto por Moreira-Filho et al. (1980), resguardando a origem de sistemas múltiplos a partir de um passo intermediário com espécies portadoras de sistemas simples (White, 1973).

No trabalho de Schemberger et al. (2014) foi obtida uma biblioteca de DNA repetitivo em Parodontidae, onde foram isolados 40 clones usando Cot-1, sendo que 17 destes clones exibiram similaridade com sequências repetitivas de DNA, incluindo satélites, minissatélites, microssatélites, e elementos transponíveis de classe I e classe II de *Danio rerio* e outros organismos. O mapeamento físico dos clones revelou a presença de um DNA satélite (sat1WP), elementos DNA transposon *Helitron* e *Tc1-Mariner*, retroelementos das classes SINE (Short Interspaced Nuclear Element) e LINE (Long Interspaced Nuclear Element) nos cromossomos sexuais. Também foi verificada

na região específica do cromossomo W uma expansão do microssatélite (GATA)n localizada em região intersticial (Ziemniczak et al., 2014).

Em um estudo recente, Traldi et al. (2016) analisaram duas espécies de *Apareiodon* que ainda não tinham dados cromossômicos disponíveis, *A. argenteus* e *A. davisii*. Neste trabalho, quatro sequências de DNAs repetitivos foram mapeadas, (DNAr 5S, DNAr 45S, *pPh2004* e *WAp*), onde *A. davisii* apresentou polimorfismo cromossômico envolvendo as duas sequências ribossômicas, com variações no número e posições dos sítios, e co-localização desses genes em alguns pares de cromossomos. *WAp* apresentou-se disperso ao longo dos cromossomos das duas espécies e *pPh2004* foi identificado nos pares de cromossomos 7, 8, 10, 11 e 18 em *A. argenteus* e no par 24 em *A. davisii*. Com isso, o estudo sugere uma possível identificação de cromossomos correspondentes ao par 13 (proto cromossomos sexuais), sendo o par 10 para *A. argenteus*, e o par 24 para *A. davisii*.

Assim, resultados dos estudos citogenéticos, até o presente momento, demonstraram que os DNAs repetitivos *WAp* e *pPh2004* são fortes marcadores evolutivos neste grupo e estiveram envolvidos em uma intensa diversificação cariotípica com possíveis implicações nos processos de especiação em Parodontidae.

1.4. DNAs repetitivos com ênfase em peixes

Os cromossomos de eucariontes são complexos quanto à estrutura e composição de diferentes classes de DNA. Além do denominado DNA cópia simples, algumas sequências de bases são repetidas de centenas a milhões de vezes no complemento cromossômico haplóide (Timberlakwe, 1978). Por sua vez, os DNAs repetidos são classificados de acordo com suas características principais e incluem as famílias multigênicas, as sequências não codificadoras repetidas *in tandem* e as sequências

dispersas. As famílias multigênicas são sequências repetidas de DNA que possuem um transcrito funcional, por exemplo, têm-se as famílias compostas de centenas ou milhares de cópias de sequências, que transcrevem importantes moléculas como os RNAs ribossomais (RNAr) (Long & David 1980, Pendás et al., 1994). Para uma revisão veja, López-Flores & Garrido-Ramos (2012).

As sequências repetidas *in tandem* não transcritas são classificadas em três sub-grupos de acordo com o tamanho do seu fragmento (Levinson & Gutman, 1987): (i) sequências satélites, a grande maioria dessas sequências apresentam cerca de 100 a 300 pares de base (pb) de comprimento e podem variar de 1.000 a mais de 1.000 000 cópias (DNA altamente repetido) de uma sequência básica que ocorre em um ou em alguns locos nos cromossomos (Timberlakwe, 1978; Walsh, 2001); (ii) Um segundo grupo das sequências organizadas *in tandem* compreende os minissatélites ou sequências com número variável de repetições (VNTR, *variable number of tandem repeats*). São repetições de aproximadamente 10 a 60 pb (DNA moderadamente repetido), encontrados em diferentes *loci* no genoma e agrupados nos telômeros (Jeffreys et al., 1985) e; (iii) o último grupo dos elementos repetidos *in tandem* é composto pelos microssatélites. Os microssatélites são repetições mais curtas (1 a 5 pb) do que a classe anterior e, ao menos 30.000 *loci* diferentes de microssatélites estão presentes no genoma (Weber & May, 1989).

A classe das sequências repetidas de DNA dispersas no genoma compreende dois tipos de elementos denominados Transposons de DNA e Retrotransposons (Feschotte, 2004), sendo classificados de acordo com sua organização estrutural e mecanismo de transposição. Os Retrotransposons ou elementos de classe I que transpõem via transcrição reversa do seu RNA. Os Transposons de DNA ou elementos de classe II se transpõem por “*copy and paste*” onde acontece a duplicação do elemento

obtendo cópias que se inserem em outros locais. Podem ocorrer também mecanismos não-replicativos, chamados também de “*cut and paste*”, em que o elemento transponível se desloca diretamente de um local para outro mantendo suas características (Wicker et al., 2007).. Diversas famílias de elementos transponíveis já foram identificadas, por exemplo: *Tc1/mariner* em *C. elegans* e *Drosophila* (Emmons et al., 1993), *hobo* também em *Drosophila* (Atkinson et al., 1993), *Helitrons* em *Arabidopsis thaliana* (Hollister & Gaute, 2007) e *C. elegans* (Kapitonov & Jurka, 2001), o elemento *P* em *Drosophila*, (Engels, 1992) e *Ac* e *Mu* no milho (McClintock, 1956; Robertson, 1978). No genoma dos peixes podem ser encontrados todos os tipos de elementos transponíveis, sendo que alguns desses elementos já foram estudados e mapeados nos cromossomos até o presente (Volf et al., 2003; Martins, 2007; Teixeira et al., 2009; Ferreira et al. 2011a,b; Schemberger et al., 2014).

Ainda que uma enorme diversidade de sequências repetidas possa estar presente nos vertebrados, incluindo os peixes (Oliveira et al., 2002), a classe mais intensivamente estudada destes segmentos genômicos é a das sequências repetidas arranjadas *in tandem*. O significado funcional de todas estas sequências nos genomas ainda não é totalmente conhecido. Porém, alguns estudos demonstram que os DNAs satélites podem apresentar um importante papel no pareamento cromossômico durante a meiose e afetar diretamente o número e a distribuição dos quiasmas (John, 1988), cariocinese (Csink & Henikoff, 1998) e até mesmo a segregação cromossômica (Bernard et al., 2001), além de serem um dos principais componentes estruturais e funcionais dos centrômeros e telômeros de diversos organismos (Schueler et al., 2001).

Muitas são as estratégias para buscar marcadores cromossômicos em peixes. O método mais utilizado para isolamento de DNAs satélites é o de digestão do DNA genômico com enzimas específicas. Duas novas estratégias, no entanto, têm provado ser

alternativas eficazes para o estudo desta classe de DNA, a re-associação cinética com base no DNA C₀t -1 (Zwick et al., 1997; Ferreira & Martins, 2008) e microdissecação de cromossomos submetidos a bandas C e posterior amplificação de sequências heterocromáticas usando DOP-PCR - *Degenerate Oligonucleotid Primed – Polymerase Chain Reaction* - (Vicari et al., 2010; Alves, 2010; Fernandes et al., 2011).

Estudos envolvendo sequências repetitivas têm sido conduzidos com o propósito de elucidar a provável origem dos cromossomos supranumerários (Oliveira & Foresti, 1993; Jesus et al., 2003; Voltolin et al., 2010), bem como identificar sequências sexo-específicas (Matsuda et al., 1997; Devlin et al., 2001; Parise-Maltempo et al., 2007; Hashimoto et al., 2009). Sequências de DNA satélite têm sido aplicadas no mapeamento físico dos cromossomos contribuindo para o desenvolvimento de marcadores genéticos em peixes (Ferreira e Martins, 2008; Blanco et al., 2010; Vicari et al., 2010), como também para tentar esclarecer a citotaxonomia dos complexos de espécies (Mantovani et al., 2004; Vicari et al., 2008). Outro enfoque de aplicação utilizando sequências de DNA satélite tem sido em estudos de filogenia (Garrido-Ramos et al., 1999; Vinas et al., 2004; Bellafronte et al., 2011); contudo a abordagem filogenética utilizando marcadores cromossômicos repetitivos tem sido questionada devido a características de transposição e espalhamento no genoma destas classes de DNA (Martins, 2007).

Várias famílias de DNAs repetitivos já foram prospectadas de diferentes espécies de peixes Neotropicais como, por exemplo: *Hop* (Haaf et al., 1993) e *5SHindIII* (Martins et al., 2006), ambas isoladas de *Hoplias malabaricus*; *As51* isolado por Mestriner et al. (2000) de *Astyanax scabripinnis*; *pPh2004* isolado por restrição genômica de *Parodon hilarii* (Vicente et al., 2003); *SATH1* e *SATH2* isolados por restrição genômica em *Prochilodus lineatus* (Jesus et al., 2003); *WAp* da fração heterocromática do cromossomo W de *Apareiodon ibitiensis* (Vicari et al., 2010).

Embora a fração repetitiva do genoma tenha sido muito estudada em invertebrados e mamíferos (Singer, 1982), em peixes ainda é restrito o número de informações que se tem a respeito da sua sequência e organização genômica, quando comparadas ao grande número de espécies existentes. Estudar estas sequências de DNA repetitivo significa conhecer a organização genômica dos peixes, assim como a dinâmica com que estas sequências têm evoluído nestes organismos. Estas sequências de DNA repetitivo podem ser utilizadas como bons marcadores para estudos evolutivos, na identificação de rearranjos cromossômicos e identificação de diferenças entre machos e fêmeas, entre outras aplicações genéticas (Ferreira, 2009).

1.5. Referências

- Almeida-Toledo, L.F.; Foresti, F. (2001). Morphologically differentiated sex chromosomes in Neotropical freshwater fish. **Genetica**. 111:91-100.
- Alves, J.C.P. (2010). **Estudos citogenéticos no gênero *Characidium* (Teleostei, Characiformes, Chrenuchidae), com análise estrutural e molecular do sistema ZZ-ZW de cromossomos sexuais**. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Botucatu, SP.
- Artoni, R.F.; Bertollo, L.A.C. (2002). Evolutionary aspects of the ZZ/ZW sex chromosome system in the Characidae fish, genus *Triportheus*. A monophyletic state and NOR. **Heredity**. 89:15-19.
- Atkinson, P.W.; Warren, W.D.; O'brochta, D.A. (1993). The hobo transposable element of *Drosophila* can be cross-mobilized in houseflies and excises like the Ac element of maize. **Genetics**. 90: 9693-9697.
- Bellafronte, E.; Vicari, M.R.; Artoni, R.F.; Margarido, V.P.; Moreira-Filho, O. (2009). Differentiated ZZ/ZW sex chromosomes in *Apareiodon ibitiensis* (Teleostei,

- Parodontidae): considerations on cytotaxonomy and biogeography. **Journal of Fish Biology**. 75:2313–2325. doi:10.1111/j.1095-8649.2009.02488.x
- Bellafronte, E.; Schemberger, M.O.; Moreira-Filho, O.; Almeida, M.C.; Artoni, R.F.; Margarido, V.P.; Vicari, M.R. (2011). Chromosomal markers in Parodontidae: an analysis of new and reviewed data with phylogenetic inferences. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**. 21:559–570. doi:10.1007/s11160-010-9177-3
- Bellafronte, E.; Mariguela, T.C.; Pereira, L.H.G.; Oliveira, C.; Moreira-Filho, O. (2013). DNA barcode of Parodontidae species from the La Plata river basin—applying new data to clarify taxonomic problems. **Neotropical Ichthyology**. 11 (3): 497-506.
- Bernard, P.; Maure, J.F.; Partridge, J.F.; Genier, S.; Javerzat, J.P.; Allshire, R.C. (2001). Requirement of heterochromatin for cohesion at centromeres. **Science**. 294:2539–2542.
- Blanco, D.R.; Lui, R.L.; Vicari, M.R.; Bertollo, L.A.C.; Moreira-Filho, O. (2010). Comparative cytogenetics of giant trahiras *Hoplias aimara* and *H. intermedius* (Characiformes, Erythrinidae): chromosomal characteristics of minor and major ribosomal DNA and cross-species repetitive centromeric sequences mapping differ among morphologically identical karyotypes. **Cytogenetic and Genome Research**. doi: 10.1159/000320923
- Buckup, P.A.; Menezes, N.A.; Ghazzi, M.S. **Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil**. Rio de Janeiro: Museu Nacional do Rio de Janeiro, 2007.
- Centofante, L.; Bertollo, L.A.C.; Moreira-Filho, O. (2002). ZZ/ZW sex chromosome system in new species of the genus *Parodon* (Pisces, Parodontidae). **Caryologia**. 54:139-150.

- Charlesworth, D.; Charlesworth, B.; Marais, G. (2005). Steps in the evolution of heteromorphic sex chromosomes. **Heredity**. 95:118-128.
- Csink, A.K.; Henikoff, S. (1998). Large-scale chromosomal movements during interphase progression in *Drosophila*. **Journal of Cell Biology**. 143:13-22.
- Devlin, R.H.; Stone, G.W.; Smailus, D.E. (1998). Extensive Direct-Tandem organization of a long tepeat DNA sequence on the Y chromosome of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). **Journal of Molecular Evolution**. 46:277–287.
- Devlin, R.H.; Biagi, C.A.; Smailus, D.E. (2001). Genetic mapping of Y-chromosomal DNA markers in Pacific salmon. **Genetica**. 111:43–58.
- Emmons, S.W.; Yesner, L.; Ruan, K.S.; Katzenberg, D. (1993). Evidence for a transposon in *Caenorhabditis elegans*. **Cell**. 32:55–65.
- Engels, W.R. (1992). The origin of P elements in *Drosophila melanogaster*. **BioEssays**. 14:681-686.
- Eigenmann, C.H. (1910). Catalogue of the fresh water fishes of tropical and south temperate America. Reports of the Princeton University Expeditions to Patagonia. Princeton. 3, 375-511.
- Eigenmann, C.H. (1916). On *Apareiodon*, a new genus of characid fishes. **Annals of the Carnegie Museum**. 10:71-76.
- Eschmeyer, W.N.; Fong, J.D. (2016). **Species by family/subfamily in the Catalog of Fishes**. Disponível em:
<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp#Parodontidae>. Acesso fevereiro de 2016.

- Fernandes, A.; Scudeler, P.E.S.; Diniz, D.; Foresti, F.; Campos, L.A.O.; Lopes, D.M. (2011). Microdissection: a tool for bee chromosome studies. **Apidologie (Celle)**. 42:1-6.
- Ferreira, I.A.; Martins, C. (2008). 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**. 39:411-418.
- Ferreira, D.C. (2009). **Análises moleculares na subfamília Hypoptopomatinae (Siluriformes, Loricariidae): Isolamento, caracterização e mapeamento cromossômico de sequências repetitivas**. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Botucatu, SP.
- Ferreira, D.C.; Oliveira, C.; Foresti, F. (2011a). Chromosome mapping of retrotransposable elements Rex1 and Rex3 in three fish species in the subfamily Hypoptopomatinae (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). **Cytogenetic and Genome Research**. 132(1-2):64-70.
- Ferreira, D.C.; Oliveira, C.; Foresti, F. (2011b). A new dispersed element in the genome of the catfish *Hisonotus leucofrenatus* (Teleostei: Siluriformes: Hypoptopomatinae). **Mobile Genetic Elements**. 1:1-4.
- Feschotte, C.M. (2004). New superfamily of DNA transposons identified in diverse animal genomes and related to bacterial IS1016 insertion sequences. **Molecular Biology and Evolution**. 21/9:1769-1780.
- Garrido-Ramos, M.A.; De La Herran, R.; Jamilena, M.; Lozano, R.; Rejon, C.R.; Rejon, M.R. (1999) Evolution of centromeric satellite DNA and its use in phylogenetic studies of the Sparidae family (Pisces, Perciformes). **Molecular Phylogenetics and Evolution**. 12: 200-204.

- Haaf, T.; Schmid, M.; Steinlein, C.; Galetti, P.M.Jr.; Willard, H.F. (1993). Organization and molecular cytogenetics of satellite DNA family from *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae). **Chromosome Research**. 1: 77–86.
- Hamilton, M.J.; Honeycutt, R.L.; Baker, R.J. (1990). Intragenomic movement, sequence amplification and concerted evolution in satellite DNA in harvest mice, *Reithrodontomys*: evidence from *in situ* hybridization. **Chromosoma**. 99:321–329.
- Hamilton, M.J.; Hong, G.H.; Wichman, A. (1992). Intragenomic movement and concerted evolution of satellite DNA in *Peromyscus*: evidence from *in situ* hybridization. **Cytogenetics and Cell Genetics**. 60:40-44.
- Hashimoto, D.T.; Parise-Maltempa, P.P.; Laudicina, A.; Bortolozzi, J.; Senhorini, J.A.; Foresti, F.; Foresti, F.; Porto-Foresti, F. (2009). Repetitive DNA probe linked to sex chromosomes in hybrids between Neotropical fish *Leporinus macrocephalus* and *Leporinus elongates* (Characiformes, Anostomidae). **Cytogenetic and Genome Research**. 124:151-157.
- Hollister, J.D.; Gaut, B.S. (2007). Population and evolutionary dynamics of *Helitron* transposable elements in *Arabidopsis thaliana*. **Molecular Biology and Evolution**. 24 (11):2515-2524.
- Ingenito, L.F.S.; Buckup, P.A. (2005). A New Species of *Parodon* from the Serra da Mantiqueira, Brazil (Teleostei: Characiformes: Parodontidae). **Copeia**. 4: 765–771.
- Ingenito, L.F.S. (2008). **Análise filogenética da família Parodontidae (Teleostei, Characiformes)**. Tese de doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, RJ.
- Jeffreys, A.J.; Wilson, V.; Thein, S.L. (1985). Hypervariable minisatellite regions in human DNA. **Nature**. 314:67-74.

- Jesus, C.M.; Moreira-Filho, O. (2000a). Cytogenetic studies in some *Apareiodon* species (Pisces, Parodontidae). **Cytologia**. 65:397–402.
- Jesus, C.M.; Moreira-Filho, O. (2000b). Karyotypes of three species of *Parodon* (Teleostei: Parodontidae). **Ichthyological Exploration of Freshwaters**. 11:75–80.
- Jesus, C.M.; Galetti, P.M.Jr.; Valentini, S.R.; Moreira-Filho, O. (2003). Molecular characterization and chromosomal location of two families of satellite DNA in *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae), a species with B chromosomes. **Genetica**. 118:25–32. doi: 10.1023/A:1022986816648.
- John, B. (1988). **The biology of heterochromatin**. In: Verma, R.S. (ed). Heterochromatin. Cambridge University Press. Cambridge, 1-147.
- Kapitonov, V.; Jurka, J. (2001). Rolling-circle transposons in eukaryotes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 98:8714–8719.
- Kner, R. (1864). Eine Uebersich der ichthyologischen Ausbeute dês Herrn Professors Dr. Mor. Wagner in Central-Amerika. Sitzungsber. Koningl. Bayer. **Akad. Wiss. Muenchen**. 2, 220-230.
- Levinson, G.; Gutman, G.A. (1987). Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. **Molecular Biology and Evolution**. 4:203-221.
- Li, Y.C.; Lee, C.; Sanoudou, D.; Hsu, T.H.; Li, S.Y.; Lin, C.C. (2000). Interstitial colocalization of two cervid satellite DNAs involved in the genesis of the *Indian muntjac* karyotype. **Chromosome Research**. 8:363–373.
- Long, E.O.; David, I.D. (1980). Repeated genes in eukaryotes. **Annual Review of Biochemistry**. 49:727–764.
- Lopez-Flores, I.; Garrido-Ramos, M.A. (2012). The repetitive DNA content of the eukaryotic genomes. **Genome Dynamics**. 7:1-28. doi: 10,1159 / 000337118.

- Lowe-McConnell, R.H. (1999). **Estudos ecológicos em comunidades de peixes tropicais**. 1. ed. São Paulo: EDUSP, 534 p.
- Mantovani, M.; Abel, L.D.S.; Mestriner, C.A.; Moreira-Filho, O. (2004). Evidence of the differentiated structural arrangement of constitutive heterochromatin between two populations of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Genetics and Molecular Biology**. 27:536–542. doi:10.1590/S1415-47572004000400012
- Martins, C.; Ferreira, I.A.; Oliveira, C.; Foresti, F.; Galetti, P.M. Jr. (2006). A tandemly repetitive centromeric DNA sequence of the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) is derived from 5S rDNA. **Genetica**. 127:133–141. doi: 10.1007/s10709-005-2674-y
- Martins, C. (2007). **Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome**. In: Pisano, E.; Ozouf-Costaz, C.; Foresti, F.; Kapoor, B.G. (eds). Fish Cytogenetics. Science Publisher, Inc., USA.
- Matsuda, M.; Kusama, T.; Oshiro, T.; Kurihara, Y.; Hamaguchi, S.; Sakaizumi, M. (1997). Isolation of a sex chromosome-specific DNA sequence in the medaka, *Oryzias latipes*. **Genes & Genetic Systems**. 72: 263-268.
- McClintock, B. (1956). Controlling elements and the gene. **Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.** 21: 197-216.
- Mestriner, C.A.; Galetti, P.M.Jr.; Valentini, S.R.; Ruiz, I.R.G.; Abel, L.D. S.; Moreira-Filho, O.; Camacho, J.P.M. (2000). Structural and functional evidence that a B chromosome in the characidae fish *Astyanax scabripinni* is an isochromosome. **Heredity**. 85:1–9. doi:10.1046/j.1365 2540.2000.00702.x
- Modi, W.S. (1993). Comparative analysis of heterochromatin in *Microtus*: sequence heterogeneity and localized expansion and contraction of satellite DNA arrays. **Cytogenetics and Cell Genetics**. 62:142-148.

- Moreira-Filho, O.; Bertollo, L.A.C.; Galetti, P.M. Jr. (1980). Evidences for a multiple sex chromosome system with female heterogamety in *Apareiodon affinis* (Pisces, Parodontidae). **Caryologia**. 33:83–91.
- Moreira-Filho, O.; Bertollo, L.A.C.; Galetti, P.M. Jr. (1993). Distribution of sex chromosomes mechanisms in neotropical fish and description of a ZZ/ZW system in *Parodon hilarii* (Parodontidae). **Caryologia**. 46:115–125.
- Müller, H.J. (1932). Some genetic aspects of sex. **The American Naturalist**. 66:118–138.
- Nakatani, K.; Agostinho, A.A.; Baumgartner, G.; Bialecki, A.; Sanches, P.V.; Makrakis, M.C.; Pavanelli, C.S. (2001). **Ovos e larvas de água doce: desenvolvimento e manual de identificação**. Maringá: EDUEM, p.378.
- Nelson, J.S. (1994). **Fishes of the world**. Nova Iorque: Wiley-Interscience.
- Nelson, J.S. (2006). **Fishes of the world**. Nova Iorque: Wiley-Interscience.
- Oliveira, E.H.C.; Neusser, M.; Figueiredo, W.B.; Nagamachi, C.; Pieczarka, J.C.; Sbalqueiro, I.J.; Wienberg, J.; Müller, S. (2002). The phylogeny of howler monkeys (*Alouatta*, Platyrrhini): reconstruction by multicolor cross-species chromosome painting. **Chromosome Research**. 10: 669-683.
- Oliveira, C.; Foresti, F. (1993). Occurrence of supernumerary microchromosomes in *Steindachnerina insculpta* (Pisces, Characiformes, Curimatidae). **Cytobios**. 76:183-186.
- Parise-Maltempi, P.P.; Martins, C.; Oliveira, C.; Foresti, F. (2007). Identification of a new repetitive element in the sex chromosomes of *Leporinus elongates* (Teleostei: Characiformes: Anostomidae): new insights into the sex chromosomes of *Leporinus*. **Cytogenetic Genome Research**. 116:218-223.

- Pavanelli, C.S. (1999). **Revisão taxonômica da família Parodontidae (Ostariophysi:Characiformes)**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos.
- Pavanelli, C.S. (2003). **Family Parodontidae**. In: Reis, R.E.; Kullander, S.O.; Ferraris, C.J. (eds.). Check list of the freshwater fishes of South and Central America. Porto Alegre: EDIPUCRS, 46-50.
- Pavanelli, C.S.; Britski, H.A. (2003). *Apareiodon* Eigenmann, 1916 (Teleostei, Characiformes), from the Tocantins-Araguaia Basin, with description of three new species. **Copeia**. 2:337-348.
- Pendás, A.M.; Morán, P.; Freije, J.P.; Garcia-Vazquez, E. (1994). Chromosomal mapping and nucleotide sequence of two tandem repeats of Atlantic salmon 5S rDNA. **Cytogenetics and Cell Genetics**. 67:31-36.
- Robertson, D.S (1978). Characterization of mutator system in maize. **Mutation Research**. 51:21-28
- Roberts, T.R. (1974). Osteology and classification of the neotropical characoid fishes of the families Hemiodontidae (including Anodontidae) and Parodontidae. **Bulletin of the Museum of Comparative Zoology**. 146, 411-472.
- Rosa, R.; Bellafrente, E.; Moreira-Filho, O.; Margarido, V.P. (2006). Constitutive heterochromatin, 5S and 18S rDNA genes in *Apareiodon* sp. (Characiformes, Parodontidae) with a ZZ/ ZW sex chromosome system. **Genetica**. 128:159–166. doi: 10.1007/s10709-005-5700-1
- Rosa, S.R.; Lima, F.C. (2008). **Os Peixes Brasileiros Ameaçados de Extinção**. 278 p. Disponível em: <<http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/biodiversidade/fauna-brasileira/livro-vermelho/volumeII/Peixes.pdf>> Acesso em fevereiro de 2016.

- Schemberger, M.O.; Bellafronte, E.; Nogaroto, V.; Almeida, M.C.; Schühli, G.S.; Artoni, R.F.; Moreira-Filho, O.; Vicari, M.R. (2011). Differentiation of repetitive DNA sites and sex chromosome systems reveal closely related group in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes). **Genetica**. 139: 1499-1508.
- Schemberger, M.O.; Oliveira, J.I.N.; Nogaroto, V.; Almeida, M.C.; Artoni, R.F.; Cestari, M.M.; Moreira-Filho, O.; Vicari, M.R. (2014). Construction and characterization of a repetitive DNA library in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes): A genomic and evolutionary approach to the degeneration of the W sex chromosome. **Zebrafish**. 11, 518-527.
- Schueler, M.G.; Higgins, A.W.; Rudd, M.K.; Gustashaw, I.K.; Willard, H.F. (2001). Genomic and genetic definition of a functional human centromere. **Science**. 294:109-115.
- Singer, M.F. (1982). Highly repeated sequences in mammalian genomes. **International Review of Cytology**. 76:67-112.
- Steinemann, S.; Steinemann, M. (2005). Retroelements: tools for sex chromosome evolution. **Cytogenetic Genome Research**. 110:134–143.
- Teixeira, W.G.; Ferreira, I.A.; Cabral-de-Mello, D.C.; Mazzuchelli, J.; Valente, G.T.; Pinhal, D.; Poletto, A.B.; Venere, P.C.; Martins, C. (2009). Organization of repeated DNA elements in the genome of the cichlid fish *Cichla kelberi* and its contributions to the knowledge of fish genomes. **Cytogenetic and Genome Research**. 125:224-234.
- Timberlakwe, E. (1978). Low repetitive DNA content in *Aspergillus nidulans*. **Science**. 202:973- 975.

- Traldi, J. (2015). **Investigação do papel dos DNAs repetitivos na evolução cromossômica de espécies de *Apareiodon* (Characiformes, Parodontidae)**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos, SP.
- Traldi, J.B.; Vicari, M.R.; Martinez, J.F.; Blanco, D.R.; Lui, R.L.; Moreira-Filho, O. (2016). Chromosome Analyses of *Apareiodon argenteus* and *Apareiodon davisi* (Characiformes, Parodontidae): An Extensive Chromosomal Polymorphism of 45S and 5S Ribosomal DNAs. **Zebrafish**. 1:19-25.
- Vari, R.P.; Malabarba, L.R. (1998). Neotropical ichthyology: an overview. In Phylogeny and classification of Neotropical fishes (L.R. Malabarba, R.E. Reis, R.P. Vari, Z.M.S. Lucena & C. A. S. Lucena, eds). Edipucrs, Porto Alegre, p. 1-12.
- Vicari, M.R.; Moreira-Filho, O.; Artoni, R.F.; Bertollo, L.A.C. (2006). ZZ/ZW sex chromosome system in an undescribed species of the genus *Apareiodon* (Characiformes, Parodontidae). **Cytogenetic Genome Research**. 114:163-168.
- Vicari, M.R.; Artoni, R.F.; Moreira-Filho, O.; Bertollo, L.A.C. (2008). Co-localization of repetitive DNAs and silencing of major rDNA genes. A case report in the fish *Astyanax janaeensis*. **Cytogenetic Genome Research**. 122:67–72. doi:10.1159/000151318
- Vicari, M.R.; Nogaroto, V.; Noletto, R.B.; Cestari, M.M.; Cioffi, M.B.; Almeida, M.C.; Moreira-Filho, O.; Bertollo, L.A.C.; Artoni, R.F. (2010). Satellite DNA and chromosomes in Neotropical fishes: Methods, applications and perspectives. **Journal of Fish Biology**. 76:1094-1116.
- Vicente, V.E.; Bertollo, L.A.C.; Valentini, S.R.; 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.

- Vinas, A.; Abuin, M.; Pardo, B.G.; Matinez, P. and Sanches, L. (2004). Characterization of a new *HpaI* centromeric satellite DNA in *Salmo salar*. **Genetica**. 121:81-87.
- Volff, J.N.; Bouneau, L.; Ozouf-Costaz, C.; Fischer, C. (2003). Diversity of retrotransposable elements in compact pufferfish genomes. **Trends Genetic**. 19:74-678.
- Voltolin, T.A.; Laudicina, A.; Senhorini, J.A.; Bortolozzi, J.; Oliveira, C.; Foresti, Fausto.; Porto-Foresti, F. (2010). Origin and molecular organization of supernumerary chromosomes of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae) obtained by DNA probes. **Genetica**. 138:1133-1139.
- Walsh, J.B. (2001). Genome Evolution: Overview. **Encyclopedia of Life Sciences**.
- Weber, J.L.; May, P.E. (1989). Abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerase chain reaction. **The American Journal of Human Genetics**. 44/3:388-396.
- White, M.J.D. (1973). Animal Cytology and Evolution. 3rd edn. Columbia Univ Press: New York.
- Wichman, H.A.; Payne, C.T.; Ryder, O.A.; Hamilton, M.J.; Maltbie, M.; Baker, R.J. (1991). Genomic distribution of heterochromatic sequences in equids: implications to rapid chromosomal evolution. **Journal of Heredity**. 82:369–377.
- Wicker, T.; Sabot, F.; Hua-Van, A.; Bennetzen, J.L.; Capy, P.; Chalhoub, B.; Flavell, A.; Leroy, P.; Morgante, M.; Panaud, O. (2007). A unified classification system for eukaryotic transposable elements. **Nature Reviews Genetics**. 8:973-982.
- Ziemniczak, K.; Traldi, J.B.; Nogaroto, V.; Almeida, M.C.; Artoni, R.F.; Moreira-Filho, O.; Vicari, M.R. (2014). *In situ* localization of (GATA)_n and (TTAGGG)_n repeat

DNAs and W sex chromosome differentiation in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes). **Cytogenetic and Genome Research**. doi:10.1159/000370297

Zwick, M.S.; Hanson, R.E.; Mcknight, T.D.; Islam-Faridi, H.M.; Stelly, D.M.; Wing, R.A.E.; Price, J.H. (1997). A rapid procedure for the isolation of C0t-1 DNA from plants. **Genome**. 40:138-142.

2. JUSTIFICATIVA

No estudo cromossômico de peixes, a utilização de sequências de DNA repetitivo tem-se mostrado um marcador importante, pois tem permitido novas interpretações da diversidade e evolução cariotípica, bem como da organização genômica de segmentos cromossômicos deste grupo de peixes. As informações que vem sendo obtidas com diversas classes de DNAs repetitivos também são valiosas para o entendimento das relações evolutivas entre espécies e gêneros relacionados, considerando a distribuição e localização dessas sequências nos cromossomos, contribuindo também no tocante a diversas problemáticas de natureza citotaxonômica e de diferenciação cariotípica, como é o caso da família Parodontidae.

Com isso, a ampliação de estudos acerca da composição e distribuição de diferentes famílias de DNAs satélites em peixes, poderá fornecer maiores contribuições à caracterização genética de diferentes espécies e à compreensão da evolução do genoma dos peixes.

Embora existam estudos envolvendo DNAs repetitivos em cromossomos sexuais de Parodontidae, poucas são as investigações realizadas em cromossomos autossômicos, que são fundamentais para uma melhor compreensão dos processos evolutivos e mecanismos envolvidos com a diversificação cariotípica em Parodontidae.

3. OBJETIVOS

O intuito do presente trabalho foi de contribuir para o conhecimento dos processos de diferenciação, evolução cariotípica e problemas de natureza citotaxonômica da família Parodontidae. Para tanto, foram propostos os seguintes objetivos específicos:

- Estudar a dinâmica evolutiva dos DNAs repetitivos na família Parodontidae, com ênfase àqueles de natureza autossômica.
- Caracterizar cromossomicamente espécies da família Parodontidae, provenientes de diversas bacias hidrográficas brasileiras;
- Caracterizar a evolução cromossômica ocorrida neste grupo e o papel exercido pelos DNAs repetitivos (DNAr 5s, 18s, H1, H1+ER, H3 e H4), associando os caracteres da citogenética clássica e da citogenética molecular, numa análise comparativa entre as diferentes espécies estudadas.
- Caracterizar cromossomicamente 16 microssatélites investigando se o processo de heterocromatinização e diferenciação sexual estão associados com o acúmulo destes microssatélites.
- Gerar subsídios à melhor compreensão acerca da dinâmica e evolução de DNAs repetitivos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Amostras coletadas

Exemplares de oito espécies da família Parodontidae foram utilizados neste estudo. Estas espécies foram diagnosticadas morfológicamente pela Dra. Carla Simone Pavanelli como sendo: *Apareiodon ibitiensis*, *Apareiodon* sp., *Apareiodon affinis*, *Apareiodon piracicabae*, *Apareiodon hasemani*, *Parodon hilarii*, *Parodon nasus* e *Parodon pongoensis* (figura 1 e tabela 1). Na figura 2 mostra o mapa com os pontos de coleta das respectivas espécies. O material cromossômico e de DNA foi obtido via preparação de espécimes coletados na natureza (Licença permanente para coleta de material zoológico MMA/IBAMA/SISBIO: 15117-1; 10538-1 – (Anexo 1) ou, eventualmente, a partir do banco de preparações cromossômicas e tecidos do Laboratório de Citogenética e Evolução da Universidade Estadual de Ponta Grossa e do Laboratório de Biodiversidade Molecular e Cromossômica de Peixes da Universidade Federal de São Carlos. Os procedimentos estão de acordo com o Comitê de Ética do Uso de Animais da Universidade Estadual de Ponta Grossa (Protocolo: 13/2014 – Anexo 2).

Para a captura dos exemplares foram utilizadas tarrafas, arrastões e puçás. Os peixes capturados foram transportados vivos, em condições de oxigenação e temperatura adequadas para o Laboratório de Citogenética e Evolução da Universidade Estadual de Ponta Grossa ou para o Laboratório de Biodiversidade Molecular e Cromossômica de Peixes da Universidade Federal de São Carlos, onde foram mantidos em aquários aerados até serem processados.

4.2. Metodologia Citogenética Clássica

4.2.1. Obtenção de cromossomos mitóticos

4.2.1.1. Tratamento “*in vivo*”

Os cromossomos mitóticos foram obtidos de células do rim anterior e posterior, por meio da técnica descrita por Bertollo et al. (1978) – (Anexo 3).

4.2.1.2. Tratamento “in vitro”

Alternativamente, os cromossomos foram obtidos segundo o protocolo descrito por Foresti et al. (1993) – (Anexo 4).

4.2.1.3. Tratamento em campo

Foi utilizado o protocolo descrito por Blanco et al. (2012) para espécimes que não puderam ser transportados para o laboratório para o processamento. – (Anexo 5).

4.3. Metodologia Citogenética Molecular

4.3.1. Isolamento de DNAs repetitivos

A sequência do DNAr 18S foi obtida por PCR a partir do DNA nuclear da espécie de peixe *Prochilodus argenteus* (Hatanaka & Galetti Jr. 2004), e a sequência de DNAr 5S foi obtida a partir da espécie de peixe *Leporinus elongatus* (Martins & Galetti Jr. 1999). A sonda pPh2004 (Vicente et al., 2003) foi utilizada para facilitar a identificação correta dos cromossomos. Os DNAr 18S e 5S e o satélite pPh2004, foram submetidas ao procedimento de mini preparação plasmidial (kit “Illustra Plasmid Prep Mini Spin” (GE Healthcare) - (Anexo 6).

As sequências parciais dos genes das histonas H1, H3 e H4 foram amplificadas a partir do genoma de *Apareiodon* sp., utilizando os primers H1F (5'-ATGGCAGAARYCGCMCCAGC -3') e H1R (5'-TACTTCTTCTTGGGSGCTGC-3'), (Hashimoto et al., 2011) e outra utilizando os primers H1PFw 5'-GTCTCGCAGTCCAAGGAGAG - 3' e H1PRv 5'-GGTGCCTTTGGTCTGCAC - 3' desenhados neste estudo a partir da sequência obtida de Parodontidae; H3F (5'-ATGGCTCGTACCAAGCAGACVGC-3') e H3R (5'-

ATATCCTTRGGCATRATRGTGAC-3'), (Colgan et al., 1998); H4F2s (5'-TSCGIGAYAACATYCAGGGIATCAC-3') e H4F2er (5'-CKYTTIAGIGCRTAIACCACRTCCAT-3'), (Pineau et al., 2005), respectivamente. As reações estão descritas no anexo 7.

Outras classes de DNAs repetitivos foram obtidas através de reações de PCR na ausência de DNA molde. O DNA telomérico (TTAGGG)_n foi amplificado utilizando os primers (TTAGGG)₅ e (CCCTAA)₅ (Ijdo et al., 1991) e a sequência (GATA)_n foi obtida com os primers (GATA)₇ e (TATC)₇ (Eppelen et al., 1982). As reações de amplificação estão descritas no anexo 8.

4.3.2. Marcação das sondas

Foram utilizadas várias metodologias para marcações das sondas:

Nick Translation:

- Digoxigenina 11 dUTP (Dig Nick Translation, Roche Applied Science) seguindo as instruções do fabricante – (Anexo 9), para a marcação da sequência telomérica (TTAGGG)_n e sequência (GATA)_n.
- Biotina 16 dUTP (Biotin Nick translation, Roche Applied Science) seguindo as orientações do fabricante – (Anexo 10), para a marcação do satélite *pPh2004*.
- BioNick™ Labeling System (Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante – (Anexo 11), para a marcação do DNAr 18S.
- Diretamente com biotina na extremidade 5' (Sigma, St. Louis, MO, USA), durante a síntese – para a marcação dos microssatélites (GAC)₁₀, (CGG)₁₀, (C)₃₀, (A)₃₀, (TAA)₁₀, (GAA)₁₀, (GAG)₁₀, (GACA)₄, (GA)₁₅, (TA)₁₅, (CA)₁₅, (CG)₁₅, (CAA)₁₀, (CAC)₁₀, (CAT)₁₀, e (CAG)₁₀

-PCR: (Anexo 12)

- Fluorocromo Alexa Fluor 594 (Life Technologies) – para a marcação da histona H3 e DNAr 5S.
- Digoxigenina 11 dUTP (Roche Applied Science) – para a marcação da histona H1 + ERV (com o elemento transponível ERV1-2 FCa-I) e H1 parcial (sem o elemento transponível ERV1-2 FCa-I).
- Biotina 16 dUTP (Roche Applied Science) – para a marcação da histona H4.

4.3.3. Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH)

A localização dos sítios de DNA repetitivo nos cromossomos foi obtida pela hibridização *in situ* fluorescente (FISH), segundo Pinkel et al. (1986), com algumas adaptações – (Anexo 13).

4.3.4. Análises cariotípicas

As preparações cromossômicas convencionais e com hibridização *in situ* fluorescente foram analisadas em microscópio de campo claro e epifluorescência Zeiss Axio Imager A2 acoplado ao software ZEISS pro 2011 em Câmera Zeiss Axio Cam MRm de Captura Monocromática com sensor CCD e resolução de 1.4 megapixels (Carl Zeiss®). E também o microscópio de epifluorescência Olympus BX41 equipado com o sistema digital de DP71 de captura de imagem (Olympus, Tóquio, Japão).

As imagens foram selecionadas para organizar os cariótipos, onde os cromossomos foram recortados usando o software Adobe Photoshop, versão CS6, e organizados em pares de homólogos em classes e ordem decrescente de tamanho. Os cromossomos foram classificados em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a) de acordo com Levan et al. (1964).

4.4. Metodologia Molecular

4.4.1. Extração de DNA

A Extração de DNA foi realizada a partir de tecidos sólidos (fígado ou músculo), utilizando o protocolo adaptado de Doyle & Doyle (1990) – (Anexo 14).

4.4.2. Sequenciamento Nucleotídico

As sequências das histonas H1, H3 e H4 foram purificadas seguindo o protocolo do Kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare) – (Anexo 15).

Posteriormente foram submetidas ao serviço de sequenciamento nucleotídico realizado pela empresa ACT Gene Análises Moleculares (disponibilizado pela empresa Ludwig Biotec), utilizando o equipamento ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

4.4.3. Análise das sequências nucleotídicas

As sequências obtidas foram analisadas usando o BIOEDIT 5.0.9 (Hall, 1999), e submetidas a uma análise de identidade utilizando os bancos de dados BLAST (Altschul et al., 1990) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e CENSOR (www.girinst.org/censor/index.php) e submetidas a alinhamentos por similaridade no software on-line MultAlin (Corpet, 1988).

4.5. Referências

- Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**. 215:403–410.
- Bertollo, L.A.C.; Takahash, C.S.; Moreira-Filho, O. (1978). Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Revista Brasileira de Genética**. 1 (2):103-120.

- Blanco, D.R.; Bertollo, L.A.C.; Lui, R.L.; Vicari, M.R.; Margarido, V.P.; Artoni, R.F.;
Moreira-Filho, O. (2012). A new technique for obtaining mitotic chromosome
spreads from fishes in the field. **Journal of Fish Biology**. 81:351-357.
- Colgan, D.; McLauchlan, A.; Wilson, G.; Livingston, S. (1998). Histone H3 and U2
snRNA DNA sequences and arthropod molecular evolution. **Australian Journal of
Zoology**. 46:419-437.
- Corpet, F. (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. **Nucleic
Acids Research**. 16(22):10881-90.
- Doyle, J.J.; Doyle, J.L. (1990). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of
fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**. 19:11-15.
- Epplen, J.T.; Mc Carrey, J.R.; Sutou, S.; Ohno, S. (1982). Base sequence of a cloned
snake W chromosome DNA fragment and identification of a male-specific putative
mRNA in the mouse. **Proceedings of the National Academy of Sciences**.
79:3798-3802.
- Foresti, F.; Oliveira, C.; Almeida-Toledo, L.F. (1993). A method for chromosome
preparations from large specimens of fishes using 'in vitro' short treatment with
colchicine. **Experientia**. 49:810-813.
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and
analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**. 41:
95-98.
- Hashimoto, D.T.; Ferguson-Smith, M.A.; Rens W, Foresti F, Porto-Foresti F (2011)
Chromosome mapping of H1 histone and 5S rRNA gene clusters in three species of
Astyanax (Teleostei, Characidae). **Cytogenetic and Genome Research**. 134:64-71.

- Hatanaka, T.; Galetti Jr., P.M. (2004). Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). **Genetica**. 122:239-244.
- Ijdo, J.W.; Wells, R.A.; Baldini, A.; Reeders, S.T. (1991). Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)_n generated by PCR. **Nucleic Acids Research**. 19:4780.
- Levan, A.; Fredga, K.; Sandberg, A.A. (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**. 52:201-220.
- Martins, C.; Galetti Jr., P.M. (1999). Chromosomal localization of 5S DNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). **Chromosome Research**. 7:363-367.
- Pineau, P.; Henry, M.; Suspène, R.; Marchio, A.; Dettai, A.; Debruyne, R.; Petit, T.; Lécu, A.; Moisson, P.; Dejean, A.; Wain-Hobson, S.; Vartanian, J.P. (2005). A universal primer set for PCR amplification of nuclear histone H4 genes from all animal species. **Molecular Biology and Evolution**. 22:582-588.
- Pinkel, D.; Straume T.; Gray, J.W. (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 83:2934-2938.
- Vicente, V.E.; Bertollo, L.A.C.; Valentini, S.R.; 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.

4.6. Figuras e Tabelas

Tabela 1. Espécie, pontos de amostragem, distribuição nas bacias hidrográficas e número de espécies estudadas.

Espécies	Ponto de amostragem	Bacia hidrográfica	Nº de ♀	Nº de ♂	Total
<i>Apareiodon</i> sp.	Rio São João (PR)	Alto Tibagi / Paranapanema / Alto Paraná	8	5	13
<i>Apareiodon</i> sp.	Rio Laranjinha (PR)	Alto Cinzas / Paranapanema / Alto Paraná	9	10	19
<i>Apareiodon</i> sp.	Rio Verde (PR)	Alto Paraná	8	5	13
<i>A. ibitiensis</i>	Rio Passa Cinco (SP)	Alto Paraná	12	9	21
<i>A. piracicabae</i>	Rio Mogi Guaçu (SP)	Alto Paraná	14	12	26
<i>A. hasemani</i>	Rio São Francisco (MG)	São Francisco	11	8	18
<i>A. affinis</i>	Rio Passa Cinco (SP)	Alto Paraná	8	22	19
<i>A. affinis</i>	Rio Piracicaba (SP)	Piracicaba / Tietê / Alto Paraná	6	8	14
<i>P. nasus</i>	Rio Mogi Guaçu (SP)	Alto Paraná	10	10	20
<i>P. hilarii</i>	Rio São Francisco (MG)	São Francisco	12	19	31
<i>P. pongoensis</i>	Rio Araguaia (GO)	Tocantins/Araguaia	8	11	19



Figura 1. Foto das espécies de Parodontidae analisadas no presente trabalho. Fonte: *Apareiodon* sp., *A. piracicabae*, *A. affinis*, *P. nasus* e *P. hilarii* (Arquivo pessoal); *A. ibitiensis* e *P. pongoensis* (Pavanelli C.S); *A. hasemani* (www.fishbase.org).

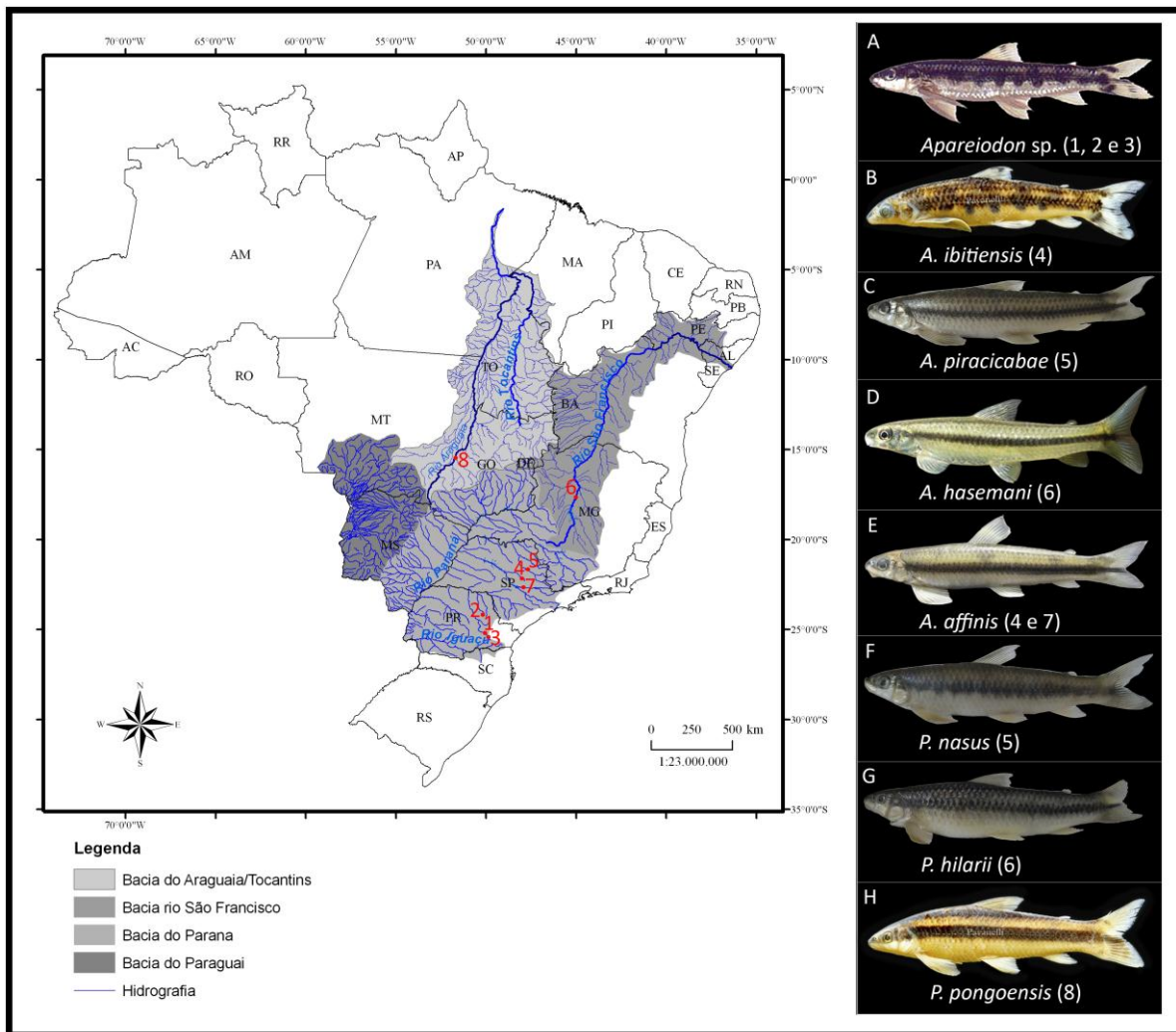


Figura 2. Mapa hidrográfico do Brasil, mostrando a distribuição das espécies de Parodontidae. Em (1) rio São João – PR; (2) rio Laranjinha – PR; (3) rio Verde – PR; (4) rio Passa Cinco – SP; (5) rio Mogi Guaçu – SP; (6) rio São Francisco - MG; (7) rio Piracicaba - SP; (8) rio Araguaia – GO. Ao lado as espécies estudadas numeradas de acordo com a sua localização nas bacias. Fotos: (A, C, E, F, G) – Arquivo pessoal; (B, H) Pavaneli C.S.; (D) fonte: www.fishbase.org.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados juntamente com a discussão foram alocados em capítulos, sendo que cada capítulo corresponde a um artigo.

Capítulo 1: Localização *in situ* dos DNAs repetitivos (GATA)_n e (TTAGGG)_n e a diferenciação do cromossomo sexual W em Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes) – versão publicada na revista *Cytogenetic and Genome Research* (anexo 16).

Capítulo 2: Mapeamento cromossômico de microssatélites em Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes): ênfase nos cromossomos sexuais. Em preparação.

Capítulo 3: Mapeamento cromossômico das sequências de histonas H1, H3 e H4 em espécies de Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes). Em preparação.

5.1. Capítulo 1

Localização *in situ* dos DNAs repetitivos (GATA)_n e (TTAGGG)_n e a diferenciação do cromossomo sexual W em Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes)

Kaline Ziemniczak, Josiane Baccarin Traldi, Viviane Nogaroto, Mara Cristina Almeida,
Roberto Ferreira Artoni, Orlando Moreira-Filho, Marcelo Ricardo Vicari

Palavras chave: *modificações da cromatina; região W específica; evolução cariotípica; erosão de genes do W*

Capítulo referente ao artigo publicado na revista *Cytogenetic and Genome Research* DOI: 10.1159/000370297

Resumo

Parodontidae apresenta um número diploide conservado de 54 cromossomos e diferentes estágios quanto à diferenciação de cromossomos sexuais ZW. Para a grande maioria das espécies desta família, foi proposto que a diversificação cariotípica é devida principalmente à movimentação e acúmulo de DNA repetitivo. Neste estudo, duas sondas repetitivas (GATA)_n e (TTAGGG)_n, foram utilizadas com o objetivo de avaliar os prováveis mecanismos de diversificação cromossômica, especialmente aqueles relacionados à diferenciação molecular do cromossomo W. Os resultados mostraram que a sequência (GATA)_n está envolvida na diferenciação da região específica da fêmea, *female specific region* (FSR) no cromossomo W de Parodontidae e apresenta diversos sinais e outros pontos de acumulação em autossomos. A repetição (TTAGGG)_n faz parte do telômero de vertebrados e a presença de sítios teloméricos intersticiais (ITS) pode ajudar na identificação de rearranjos cromossômicos. Em Parodontidae, não foram detectados ITS. Este estudo mostra a plasticidade na quantidade de repetição (GATA)_n em Parodontidae que pode estar envolvido em modificações da cromatina e controle transcricional do cromossomo W, e o papel de DNAs repetitivos na diversificação genômica nesta família de peixes é discutida.

Palavras-chave: modificações da cromatina; região W específica; evolução cariotípica; erosão de genes do W.

Abstract

The family Parodontidae presents a conserved diploid number of 54 chromosomes and different stages associated with ZW sex chromosome differentiation. For the great majority of species in this family it was proposed that the karyotypic diversification is mostly due to repetitive DNA mobility and accumulation. In this study, 2 repetitive probes, (GATA)_n and (TTAGGG)_n, were used to assess probable mechanisms of chromosome diversification, especially those related to molecular differentiation of the W chromosome. Results showed that the (GATA)_n sequence is involved in the differentiation of the W chromosome female-specific region of Parodontidae and that it is accumulated in diverse autosomes. The (TTAGGG)_n repeat is part of the vertebrate telomere, and the presence of interstitial telomeric sites may help to identify chromosome rearrangements. However, in Parodontidae, no interstitial telomeric sites were detected. This study shows plasticity in the amount of the (GATA)_n repeat in Parodontidae that may be involved in chromatin modifications and transcriptional control of the W chromosome, and the role of repetitive DNAs in genomic diversification in this fish family is discussed.

Keywords: chromatin modification, female-specific region, karyotype evolution, W gene erosion.

5.1.1. Introdução

Diferentes classes de DNA compõe a estrutura dos cromossomos de eucariontes (Sumner, 2003). Além do denominado DNA cópia simples, algumas sequências de bases são repetidas de centenas a milhões de vezes no complemento cromossômico (Timberlakwe, 1978). Estes DNAs repetitivos são classificados de acordo com suas características principais e incluem as famílias multigênicas, as sequências não codificadoras repetidas *in tandem* (satélite, minissatélite e microssatélite) e as sequências dispersas classificadas como transposons e retrotransposons (Sumner, 2003).

É conhecido que o acúmulo e a movimentação de sequências repetitivas nos genomas promove a diferenciação cromossômica, com importante atuação na evolução cariotípica (Wichman et al., 1991; Hamilton 1992; Li et al., 2000; Pucci et al., 2014). O microssatélite (GATA)_n foi descrito como o maior componente do DNA satélite Bkm (Banded Krait Minor), o qual está amplamente distribuído entre os eucariotos (Epplen et al., 1982; Singh et al., 1984; Milani & Cabral-de-Mello, 2014). Esta sequência simples repetida (SSR) está relacionada à diferenciação molecular dos cromossomos sexuais de uma grande parcela de vertebrados (Epplen et al., 1982; Singh et al., 1984; Epplen, 1988; Nanda et al., 1990; Subramanian et al., 2003). Isto sugere que (GATA)_n pode ter um significado funcional na biologia dos cromossomos sexuais e na especiação (Subramanian et al., 2003).

Associado a ampla distribuição nos genomas eucariontes, o SSR (GATA)_n serve de sequência de DNA consenso para a ligação de fatores de transcrição da família de proteínas de ligação- GATA (Orkin et al., 1998). Os membros da família de proteínas GATA, (GATA1-6) funciona como uma linhagem específica de fatores de transcrição para uma série de tipos de células no sistema hematopoiético (para uma revisão ver, Chen et al., 2012). Ainda, outros estudos mostraram a expressão de proteínas de ligação

Bkm (BBP) (Bkm binding proteins), sexo e tecidos específicos, no ovário de cobras e nos testículos de ratos (Singh et al., 1994a). Nos testículos de ratos esta BBP foi relacionada ao evento de descondensação do cromossomo Y, específico do testículo. Esta proteína é diferente da família de fatores de transcrição GATA do sistema hematopoiético, uma vez que se liga a sequências de repetições (GATA)_n (Singh et al., 1994b). Além da função de local de ligação de fator de transcrição, Subramanian et al. (2003) relatou a distribuição de (GATA)_n ao longo do cromossomo e sua proximidade com regiões associadas a matriz como possíveis domínios demarcados na cromatina para uma expressão coordenada de genes.

Outro DNA repetitivo, o minissatélite (TTAGGG)_n, componente estrutural dos telômeros de vertebrados tem sido localizado *in situ* nos genomas para auxiliar na visualização de alguns tipos de rearranjos cromossômicos (Slijepcevic, 1998). Em peixes, Ocalewicz (2013) verificou que 80 espécies foram submetidas à localização *in situ* da sequência (TTAGGG)_n, das quais cerca de 42% apresentam sinais de hibridização telomérica adicional distante do término do cromossomo (sequências teloméricas intersticiais ou internas, “internal or interstitial telomeric sites”, ITS). A localização destes ITS confirmaram a ocorrência de fusões Robertsonianas (Rosa et al., 2012; Blanco et al., 2012; Traldi et al., 2013; Errero Porto et al., 2014), mas podem também ser inseridos nas posições intersticiais pela telomerase ou ainda, são transpostos para reparar as rupturas de filamentos duplos de DNA (Nergadze et al., 2007).

A família de peixes neotropical Parodontidae (gêneros *Parodon*, *Apareiodon* e *Saccodon*) apresenta número diplóide de 54 cromossomos conservado, com pequena variação nas fórmulas cariotípica da grande maioria dos seus representantes, mas com grande variação de marcadores cromossômicos demonstrando uma enorme diversidade interespecífica (Bellafronte et al., 2011; Schemberger et al., 2011). Nesta família,

algumas espécies são homomórficas em relação à presença de cromossomos sexuais, enquanto outras apresentam sistemas ZZ/ZW em diferentes estágios de acúmulo de DNAs repetitivos (Schemberger et al., 2011; 2014). Aqui nós relatamos nossa análise dos padrões de distribuição de (GATA)_n e (TTAGGG)_n nos genomas de Parodontidae para verificar os rearranjos cromossômicos, com foco no cromossomo W.

5.1.2. Material e Métodos

Oito espécies da família Parodontidae foram analisadas: *Apareiodon piracicabae*, *Apareiodon hasemani*, *Apareiodon ibitiensis*, *Apareiodon* sp. (população do Rio Verde), *Apareiodon affinis*, *Parodon pongoensis*, *Parodon nasus* e *Parodon hilarii*, (Tabela 1). As espécies foram depositadas no Museu de Zoologia do Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura da Universidade Estadual de Maringá (Brasil) e no Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP). Os procedimentos de manuseio animal em pesquisa foram realizados em conformidade com o Comitê de Ética em Experimentação Animal (processo número: 13/2014) da Universidade Estadual de Ponta Grossa (Brasil). As preparações de cromossomos foram obtidas pelo método de air-drying a partir de células renais (Bertollo et al., 1978) com modificações (Blanco et al., 2012).

Neste estudo, foram utilizados três tipos de sondas repetitivas: o microssatélite (GATA)_n, o minissatélite (TTAGGG)_n e o DNA satélite de Parodontidae pPh2004 Vicente et al. (2003). A sonda pPh2004 só foi utilizado para facilitar a identificação correta dos cromossomos, esta sonda já foi descrita em outros estudos (Bellafronte et al., 2011; Schemberger et al., 2011). As expansões (GATA)_n e (TTAGGG)_n foram sintetizadas por reação em cadeia da polimerase (PCR). A amplificação da sonda (GATA)_n foi realizada com os primers (GATA)₇ e (TATC)₇ enquanto que a sonda

(TTAGGG)_n foi amplificada com os primers (TTAGGG)₅ e (CCCTAA)₅ ambas na ausência de DNA molde, conforme proposto para obtenção da sequência geral de telômero de vertebrados (Ijdo et al., 1991). A reação de amplificação de cada DNA repetitivo em tubos isolados foi composta por 1x Taq Reaction buffer (200 mM Tris pH 8.4, 500 mM KCl), 40 µM dNTPs, 2 mM MgCl₂, 2 U de Taq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, USA), 0.2 µM primers (GATA)₇ e (TATC)₇ para o tubo de PCR GATA e; 0.2 µM primers (TTAGGG)₅ e (CCCTAA)₅ para a amplificação da sequência telomérica. A PCR foi feita em dois ciclos. A primeira amplificação foi realizada com baixa estringência: 4 min a 94 °C, 12 ciclos de 1 min a 94 °C, 45 s a 52 °C e 1 min 30 s a 72 °C; seguido por 35 ciclos de alta estringência: 1 min a 94 °C, 1 min 30 s a 60 °C e 1 min 30 s a 72 °C. Os produtos da PCR foram confirmados gel de agarose 1%, onde foram obtidos arrastos entre 1000 – 2000 bp. As amplificações (GATA)_n e (TTAGGG)_n foram então marcadas com digoxigenin 11-dUTP por Nick Translation (Dig Nick Translation mix, Roche Applied Science, Mannheim, Germany), seguindo as instruções do fabricante. Por sua vez, a sonda do satélite pPh2004 contida em vetor e obtida por mini preparação plasmidial foi marcada biotin 16-dUTP por Nick Translation (Biotin Nick Translation mix, Roche Applied Science) segundo orientações do fabricante.

A hibridação *in situ* fluorescente (FISH) foi realizada sob condições de alta estringência (2.5 ng/µL de sonda, 50% de formamida, 2X SSC, e 10% de sulfato de dextrano durante 18 h a 37 °C), de acordo com o método de Pinkel et al. (1986). A detecção do sinal foi realizada utilizando um anticorpo anti-estreptavidina conjugada com Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Carlsbad, CA, EUA) e um anticorpo anti-digoxigenina conjugados com rodamina (Roche Applied Science). Os cromossomos foram contrastados com 0.2 µg·mL⁻¹ de 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) em meio de

montagem Vectashield (Vector, Burlingame, CA, EUA) e analisadas utilizando um microscópio de epifluorescência Olympus BX41 equipado com o sistema digital de DP71 de captura de imagem (Olympus, Tóquio, Japão). Os cromossomos foram identificados utilizando o sistema proposto por Levan et al. (1964) e classificados como metacêntricos (m), submetacêntrico (sm), ou subtelocêntrico (st).

5.1.3. Resultados

As espécies estudadas apresentaram $2n = 54$ cromossomos e quanto à presença de cromossomos sexuais heteromórficos são classificadas: cromossomos sexuais ausentes ou homomórficos (*A. piracicabae*), proto cromossomos sexuais – par 13 - (*P. pongoensis* e *P. nasus*), sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW (*A. hasemani*, *A. ibitiensis*, *Apareiodon* sp. e *P. hilarii*); e sistema ZZ/ZW₁W₂ em *A. affinis* (Figs. 1 e 2; para uma revisão ver Schemberger et al., 2011; Bellafronte et al., 2012).

A FISH com sonda (GATA)_n revelou a presença deste elemento repetitivo disperso pelos cromossomos, formando pequenos acúmulos em algumas regiões nas oito espécies estudadas (Figs. 1 e 2). Em *A. piracicabae*, além de loci dispersos pelo cariótipo, acúmulos (GATA)_n puderam ser detectados nos pares 2, 6, 9, 17, 20, 21, 25 e 27 (Fig. 1a). Em *A. hasemani*, pequenos acúmulos puderam ser detectados nas regiões terminal ou subterminal de todos os cromossomos, incluindo os cromossomos Z e W (Fig. 1b). Nas espécies *A. ibitiensis* e *Apareiodon* sp., puderam ser detectados pequenos acúmulos (GATA)_n nos autossomos além de uma marcação intersticial mais evidente no braço longo do cromossomo W (Fig. 1c, d). Já *P. pongoensis* e *P. nasus*, além de acúmulos em autossomos, apresentam um pequeno acúmulo (GATA)_n na região terminal do braço curto do par 13 – proto cromossomo sexual (Fig. 2a, b). Já *P. hilarii* apresentou loci (GATA)_n dispersos, praticamente imperceptíveis, no cromossomo Z e

autossomos, mas com blocos evidentes nos pares 4, 5 e na região intersticial do braço longo do cromossomo W (Fig. 2c). Por sua vez, em *A. affinis* a sonda (GATA)_n mostrou localização pela região terminal dos autossomos e blocos mais evidentes nos cromossomos sexuais W₁ e W₂ (Fig. 2d). A sonda (TTAGGG)_n detectou os sítios terminais dos cromossomos marcados nas oito espécies estudadas e não foram observados ITS (Fig. 3).

5.1.4. Discussão

A diferenciação molecular e a erosão da atividade gênica na rota evolutiva de cromossomos sexuais, envolve o acúmulo de DNAs repetitivos *in tandem* e elementos transponíveis, *transposable elements* (TEs), (Steinemann & Steinemann, 2005). Embora o mecanismo geral de acúmulo de sequências seja bem entendido pela visualização da fração heterocromática no cromossomo sexual heteromórfico, na grande maioria das espécies, falta em conhecimento de quais sequências repetitivas estão ali presentes e qual sua relação na demarcação de domínios na cromatina e controle da expressão gênica (Subramanian et al., 2003).

Parodontidae tem sido utilizada para estudos da diferenciação dos cromossomos sexuais, onde é observado a invasão de sequências repetitivas e aumento do tamanho do cromossomo W (Centofante et al., 2002; Rosa et al., 2006; Vicari et al., 2006; Bellafronte et al., 2009; 2011; 2012; Schemberger, 2011; 2014). Neste estudo, a localização *in situ* da sequência (GATA)_n em oito espécies revelou acúmulo deste microsatélite na região de diferenciação molecular e erosão gênica do cromossomo W. Os sinais (GATA)_n foram comparados com a descrição da localização do bandamento C nestas espécies estudadas (Bellafronte et al., 2011). Os acúmulos autossômicos da sequência (GATA)_n não podem ser correlacionados com as regiões heterocromáticas, a

excessão de algumas regiões heterocromáticas terminais menores. Por outro lado, os sinais (GATA)_n nos cromossomos sexuais Z e W estão localizadas em regiões heterocromáticas. Nesta família, a espécie *A. piracicabae* não apresenta cromossomos sexuais heteromórficos. Em outros estudos, a localização destas repetições simples tem permitido a detecção de diferenças moleculares e estruturais ainda entre cromossomos sexuais aparentemente homomórficos de *Poecilia reticulata* (Nanda et al., 1990). No entanto, a localização (GATA)_n neste estudo em vários autossomos demonstra que este DNA repetitivo não está exclusivamente relacionado aos cromossomos sexuais, fato que não permite apontar um provável par proto cromossomo sexual em *A. piracicabae*.

No estudo de pintura cromossômica com a fração heterocromática do cromossomo W de *Apareiodon* sp., denominada sonda WAp, em combinação com a sonda DNA satélite pPh2004, foi possível estabelecer o par 13 como sendo o proto par sexual nas espécies *P. pongoensis* e *P. nasus* (Schemberger et al., 2011). Nesta duas espécies, a localização da repetição (GATA)_n demonstrou um pequeno acúmulo no braço curto deste par. Esta situação de pequeno acúmulo (GATA)_n é também visualizada para o cromossomo Z das espécies que possuem heteromorfismo de cromossomos sexuais. Por sua vez, o cromossomo W detém acúmulo (GATA)_n crescente em espécies com cromossomos sexuais maiores. Entre as espécies estudadas, *A. hasemani* possui o cromossomo W em menor diferenciação molecular, com bandas heterocromáticas nas regiões do braço curto e terminal do braço longo (Bellafronte et al., 2012). A localização da sequência (GATA)_n nas regiões terminais em ambos os braços do cromossomo W evidencia a participação deste DNA microssatélite já no início da diferenciação e heteromorfismo do cromossomo W. Ainda, é evidente o acúmulo (GATA)_n nas espécies que possuem o cromossomo W maior e conseqüente maior diferenciação molecular (*A. ibitiensis*, *Apareiodon* sp., *P. hilarii*) e nos cromossomos

W_1 e W_2 do sistema de cromossomos sexuais múltiplo de *A. affinis*. Em um exemplo similar no gênero *Poecilia*, o tamanho da região heterocromática do cromossomo Y difere entre as linhagens e é correlacionada ao tamanho total do cromossomo Y, mecanismo que pode ser atribuído a amplificação diferencial e a deleção da heterocromatina constitutiva. Ainda, foi sugerido que o padrão de coloração ligado ao cromossomo sexual e outros genes sexuais em *Poecilia* são importantes para a manutenção do polimorfismo estrutural dos cromossomos sexuais (Nanda et al., 2014).

Em peixes, estudos com o microssatélite (GATA)_n em algumas espécies mostrou localização dispersa pelos cromossomos, sem quaisquer tipos de acúmulo preferenciais (Cross et al., 2006; Úbeda-Manzanaro et al., 2010; Traldi et al., 2013). Embora alguns acúmulos (GATA)_n foram detectados nos cromossomos de Parodontidae, especialmente nos sexuais, é visível um extensivo número de cópias dispersas nos cariótipos. É conhecido que estas repetições microssatélites estão frequentemente presentes nas sequências dos elementos transponíveis ou intercaladas à DNAs cópia simples (Schäfer et al., 1986; Coates et al., 2009). Nesta via, as cópias dispersas (GATA)_n em Parodontidae podem ser consequência de eventos de transposição, quando repetições em tandem pegam “carona” dentro de elementos móveis, como visualizado em outros organismos (Wilder & Hollocher, 2001; López-Giráldez et al., 2006; Coates et al., 2009). No entanto, a dispersão de repetições (GATA)_n em regiões eucromáticas dos cromossomos de Parodontidae poderia ser intergênica, sugerindo que eles podem possuir, em associação com a região associada à matriz, uma função de regular a totalidade do domínio definido por essas sequências, tal como proposto para os seres humanos (Subramanian et al., 2003). Ainda, (GATA)_n é a parte principal da sequência consenso de DNA para a ligação da família de fatores de transcrição (GATA1-6) com função em células do sistema hematopoiético (Chen et al., 2012).

Em algumas espécies, a maior concentração (GATA)_n nos cromossomas sexuais foi atrelada à atividade de descondensação da cromatina (Singh et al., 1994a; Viger et al., 1998; Priyadarshini et al., 2003). Em cobras e ratos em que a atividade BBP foi relatado para ser no seu nível máximo pelo início da espermatogênese e desenvolvimento de oócitos, correspondente a descondensação dos cromossomos W e Y, respectivamente (Singh et al., 1994a). GATA-4, um outro membro da mesma família de fatores de transcrição presentes nas gônadas de rato, que é expresso especificamente nas células de Sertoli de testículos e da célula granulosa do ovário, foi assumido estar envolvido no desenvolvimento precoce das gônadas e dimorfismo sexual (Viger et al., 1998). Da mesma forma, na serpente do mar *Enhydrina schistosa*, onde o cromossomo W é dividido em duas partes separadas, W₁ e W₂, ambos descondensam-se simultaneamente (Singh et al., 1979), indicando a sua regulação comum. *A. affinis* também apresentou sequências (GATA)_n nos cromossomos W₁ e W₂ como uma possível função no desenvolvimento sexual de Parodontidae.

As espécies de Parodontidae, em sua maioria, mantém o 2n = 54 cromossomos, com pequena variação de fórmula cariotípica 54 m/sm para 48 m/sm + 6st (Bellafronte et al., 2011). Neste contexto, Schemberger et al. (2011) inferiram que a variação cromossômica na família Parodontidae é em grande parte devida a movimentação de sequências de DNAs satélites e TEs. A presença de ITS em pontos de fusão e ou translocação é um evento relativamente comum em peixes (Rosa et al., 2012; Ocalewicz, 2013; Errero Porto et al., 2014), embora em inúmeros eventos de rearranjos cromossômicos os telômeros possam ser completamente perdidos ou estar em baixo número de cópias (Slijepcevic, 1998). A localização telomérica da sonda (TTAGGG)_n em oito espécies de Parodontidae corrobora a proposta da conservação de 2n e pequena variação de fórmulas cromossômicas. Em *A. affinis*, a origem do sistema de

cromossomos sexuais múltiplos ZZ/ZW_1W_2 é atribuída a rearranjos cromossômicos do tipo fissão e inversão pericêntrica ou translocação cromossômica (Moreira-Filho et al., 1980; Schemberger et al., 2011). Mesmo nesta espécie, não há indícios de ITS que possam ser indicativos de trocas entre cromossomos não homólogos.

Por outro lado, Schemberger et al. (2014) isolaram uma biblioteca C_{ot} -1 para DNA repetitivo e verificaram um intenso acúmulo de sequências satélites e elementos tranponíveis, entre as quais, algumas foram relacionadas a degeneração molecular do cromossomo W. Com todos estes dados, é possível verificar que a região pseudoautossômica (PAR) dos cromossomos sexuais é composta pelos braços longo do cromossomo Z e curto do cromossomo W, as quais possuem o DNA satélite *pPh2004* no gênero *Parodon*. Na região específica da fêmea, “*female-specific region*” (FSR) do cromossomo W de Parodontidae é possível verificar o acúmulo de sequências satélites e TEs, as quais não são exclusivas dos sexuais. A expansão $(GATA)_n$ identificada neste estudo está localizada na FSR, em região intersticial. A região proximal da FSR é composta pelo DNA satélite (*sat1WP*), na região terminal foi visualizado um extensivo acúmulo do TE helitron e, em toda sua extensão, a FSR é invadida por TEs degenerados de diferentes classes (Schemberger et al., 2014). Deste modo, a diferenciação molecular e a erosão da atividade gênica do cromossomo W ocorreu por acúmulos de sequências repetitivas de diferentes tipos e classes, as quais podem formar domínios na cromatina e ter uma relação com o controle da expressão dos genes presentes nos sexuais e determinação sexual.

Neste contexto, este estudo demonstra com a localização *in situ* das expansões $(GATA)_n$ e $(TTAGGG)_n$ que Parodontidae apresenta uma diversificação cromossômica associada ao movimento de sequências repetitivas no genoma. Estes dados, quando comparados com a literatura, fornecer evidências indiretas de que a repetição $(GATA)_n$

está associada com modificações da cromatina no cromossomo W de Parodontidae que pode estar relacionado com o controle de expressão de genes e determinação sexual.

5.1.5. Agradecimentos

Os autores agradecem ao Ministério do Meio Ambiente / Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA / MMA / SISBIO No. 15117-1; 10538-1) pela autorização para recolher as amostras biológicas. Este estudo foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Secretaria de Ciência e Tecnologia do Estado do Paraná (SETI) e Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná (Fundação Araucária).

5.1.6. Referências

- Bellafronte, E.; Vicari, M.R.; Artoni, R.F.; Margarido, V.P.; Moreira-Filho, O. (2009). Differentiated ZZ/ZW sex chromosomes in *Apareiodon ibitiensis* (Teleostei, Parodontidae): considerations on cytotaxonomy and biogeography. **Journal of Fish Biology**. 75:2313–2325. doi:10.1111/j.1095-8649.2009.02488.x
- Bellafronte, E.; Schemberger, M.O.; Moreira-Filho, O.; Almeida, M.C.; Artoni, R.F.; Margarido, V.P.; Vicari, M.R. (2011). Chromosomal markers in Parodontidae: an analysis of new and reviewed data with phylogenetic inferences. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**. 21:559–570. doi:10.1007/s11160-010-9177-3
- Bellafronte, E.; Schemberger, M.O.; Artoni, R.F.; Moreira-Filho, O.; Vicari, M.R. (2012). Sex chromosome system ZZ/ZW in *Apareiodon hasemani* Eigenmann,

- 1916 (Characiformes, Parodontidae) and a derived chromosomal region. **Genetic Molecular Biology**. 35:770-776.
- Bertollo, L.A.C.; Takahashi, C.S.; Moreira-Filho, O. (1978). Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Revista Brasileira de Genética**. v. 1, n. 2, p. 103-120.
- Blanco, D.R.; Bertollo, L.A.C.; Lui, R.L.; Vicari, M.R.; Margarido, V.P.; Artoni, R.F.; Moreira-Filho, O. (2012). A new technique for obtaining mitotic chromosome spreads from fishes in the field. **Journal of Fish Biology**. 81:351-357.
- Centofante, L.; Bertollo, L.A.C.; Moreira-Filho, O. (2002). ZZ/ZW sex chromosome system in new species of the genus *Parodon* (Pisces, Parodontidae). **Caryologia**. 54:139-150.
- Chen, Y.; Bates, D.L.; Dey, R.; Chen, P.H.; Machado, A.C.; Laird-Offringa, I.A.; Rohs, R.; Chen, L. (2012). DNA binding by GATA transcription factor suggests mechanisms of DNA looping and long-range gene regulation. **Cell Reports**. 2:1197-1206.
- Coates, B.S.; Sumerford, D.V.; Hellmich, I.I.R.L.; Lewis, L.C. (2009). Repetitive genomic elements in a european corn borer, *Ostrinia nubilalis*, bacterial artificial chromosome library were indicated by bacterial artificial chromosome end sequencing and development of sequence tag site markers: Implications for Lepidopteran genomic research. **Genome**. 52:57-67.
- Cross, I.; Merlo, A.; Manchado, M.; Infante, C.; Cañavate, J.P.; Rebordinos, L. (2006). Cytogenetic characterization of the *Solea senegalensis* (Teleostei: Pleurenctiformes: Soleidae): Ag-NOR, (GATA)*n*, (TTAGGG)*n* and ribosomal genes by one-color and two-color FISH. **Genetica**. 128:253–259.

- Epplen, J.T.; Mc Carrey, J.R.; Sutou, S.; Ohno, S. (1982). Base sequence of a cloned snake W chromosome DNA fragment and identification of a male-specific putative mRNA in the mouse. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 79:3798-3802.
- Epplen, J.T.; Studer, R.; McLaren, A. (1988). Heterogeneity in the *SXR* (*sex-reversal*) locus of the mouse as revealed by synthetic GAA probes. **Genetic Research**. 51:239-246.
- Errero Porto, F.; de Rossi Vieira, M.M.; Barbosa, L.M.; Borin-Carvalho, L.A.; Vicari, M.R.; de Portela Castro, A.L.B.; Martins-Santos, I.C. (2014). Chromosomal polymorphism in *Rineloricaria Lanceolata* Günther, 1868 (Loricariidae: Loricariinae) of the Paraguay basin (Mato Grosso do Sul, Brazil): Evidence of fusions and their consequences in the population. **Zebrafish**. 11:318-324.
- Hamilton, M.J.; Hong, G.H.; Wichman, A. (1992). Intragenomic movement and concerted evolution of satellite DNA in *Peromyscus*: evidence from *in situ* hybridization. **Cytogenetics and Cell Genetics**. 60:40-44.
- Ijdo, J.W.; Wells, R.A.; Baldini, A.; Reeders, S.T. (1991). Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)_n generated by PCR. **Nucleic Acids Research**. 19:4780.
- Levan, A.; Fredga, K.; Sandberg, A.A. (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**. 52:201-220.
- Li, Y.C.; Lee, C.; Sanoudou, D.; Hsu, T.H.; Li, S.Y.; Lin, C.C. (2000). Interstitial colocalization of two cervid satellite DNAs involved in the genesis of the *Indian muntjac* karyotype. **Chromosome Research**. 8:363–373.

- López-Giráldez, F.; Andres, O.; Domingo-Roura, X.; Bosch, M. (2006). Analysis of carnivore microsatellites and their intimate association with tRNA-derived SINEs. **BMC Genomics**. 7:269.
- Milani, D.; Cabral-de-Mello, D.C. (2014). Microsatellite organization in the grasshopper *Abracris flavolineata* (Orthoptera: Acrididae) revealed by FISH mapping: Remarkable spreading in the A and B chromosomes. **PloS One**. 9:e97956.
- Moreira-Filho, O.; Bertollo, L.A.C.; Galetti, P.M. Jr. (1980). Evidences for a multiple sex chromosome system with female heterogamety in *Apareiodon affinis* (Pisces, Parodontidae). **Caryologia**. 33:83–91.
- Nanda, I.; Schories, S.; Tripathi, N.; Dreyer, C.; Haaf, T.; Schmid, M.; Schartl, M. (2014). Sex chromosome polymorphism in guppies. **Chromosoma**. 123: 373–383.
- Nanda, I.; Feichtinger, W.; Schmid, M.; Schröder, J.H.; Zischler, H.; Epplen, J.T. (1990). Simple repetitive sequences are associated with the differentiation of the sex chromosomes in the guppy fish. **Journal of Molecular Evolution**. 30:456-462.
- Nergadze, S.G.; Santagostino, M.A.; Salzano, A.; Mondello, C.; Giulotto, E. (2007). Contribution of telomerase RNA retrotranscription to DNA double-strand break repair during mammalian genome evolution. **Genome Biology**. 8:R260.
- Ocalewicz, K. (2013). Telomeres in Fishes. **Cytogenet Genome Research**. 141:114–125.
- Orkin, S.H.; Shivdasani, R.A.; Fujiwara, Y.; McDevitt, M.A. (1998). Transcription factor GATA-1 in megakaryocyte development. **Stem Cells**. 16:79–83.
- Pinkel, D.; Straume T.; Gray, J.W. (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 83:2934-2938.

- Priyadarshini, P.; Murthy, B.S.; Nagaraju, J.; Singh, L. (2003). GATA-binding protein expressed predominantly in the pupal ovary of the silkworm, *Bombyx mori*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. 33:185-95.
- 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. (2014). Population differentiation and speciation in the genus *Characidium* (Characiformes: Crenuchidae): effects of reproductive and chromosomal barriers. **Biological Journal of the Linnean Society**. 111:541-553
- Rosa, K.O.; Ziemniczak, K.; Barros, A.V.; Nogaroto, V.; Almeida, M.C.; Cestari, M.M.; Artoni, R.F.; Vicari, M.R. (2012). Numeric and structural chromosome polymorphism in *Rineloricaria lima* (Siluriformes: Loricariidae): fusion points carrying 5S rDNA or telomere sequence vestiges. **Reviews in Fish Biology and Fisheries** 22:739–749.
- Rosa, R.; Bellafronte, E.; Moreira-Filho, O.; Margarido, V.P. (2006). Constitutive heterochromatin, 5S and 18S rDNA genes in *Apareiodon sp.* (Characiformes, Parodontidae) with a ZZ/ ZW sex chromosome system. **Genetica**. 128:159–166. doi: 10.1007/s10709-005-5700-1
- Schäfer, R.; Ali, S.; Epplen, J.T. (1986). The organization of the evolutionarily conserved GATA/GACA repeats in the mouse genome. **Chromosoma**. 93:502–510.
- Schemberger, M.O.; Bellafronte, E.; Nogaroto, V.; Almeida, M.C.; Schühli, G.S.; Artoni, R.F.; Moreira-Filho, O.; Vicari, M.R. (2011). Differentiation of repetitive DNA sites and sex chromosome systems reveal closely related group in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes). **Genetica**. 139: 1499-1508.

- Schemberger, M.O.; Oliveira, J.I.N.; Nogaroto, V.; Almeida, M.C.; Artoni, R.F.; Cestari, M.M.; Moreira-Filho, O.; Vicari, M.R. (2014). Construction and characterization of a repetitive DNA library in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes): A genomic and evolutionary approach to the degeneration of the W sex chromosome. **Zebrafish**. 11, 518-527.
- Singh, L.; Purdom, I.F.; Jones, K.W. (1979). Behaviour of sex chromosome associated satellite DNA in somatic and germ cells in snakes. **Chromosoma**. 71:167–181.
- Singh, L.; Phillips, C.; Jones, K.W. (1984). The conserved nucleotide sequences of Bkm, which define Sxr in the mouse, are transcribed. **Cell**. 36:111-120.
- Singh, L.; Wadhwa, R.; Naidu, S.; Nagaraj, R.; Ganesan, M. (1994a). Sex- and tissue-specific Bkm (GATA)-binding protein in the germ cells of heterogametic sex. **Journal of Biological Chemistry**. 269: 25321-25327.
- Singh, L.; Panicker, S.G.; Nagaraj, R.; Majumdar, K.C. (1994b). Banded krait minor-satellite (Bkm)-associated Y-chromosome specific repetitive DNA in mouse. **Nucleic Acids Research**. 22:2289–2295.
- Slijepcevic, P. (1998). Telomeres and mechanisms of Robertsonian fusions. **Chromosoma**. 107:136–140.
- Steinemann, S.; Steinemann, M. (2005). Retroelements: tools for sex chromosome evolution. **Cytogenetic Genome Research**. 110:134–143.
- Subramanian, S.; Mishra, R.K.; Singh, L. (2003). Genome-wide analysis of Bkm sequences (GATA repeats): predominant association with sex chromosomes and potential role in higher order chromatin organization and function. **Bioinformatics**. 19:681–685.
- Sumner, A.T. (2003). Chromosomes: Organization and Function, Chapter 5: 57–69 (Blackwell Science Ltd., Malden).

- Timberlakwe, E. (1978). Low repetitive DNA content in *Aspergillus nidulans*. **Science**. 202:973-975.
- Traldi, J.B.; Blanco, D.R.; Vicari, M.R.; Martinez, J.D.E.F.; Lui, R.L.; Artoni, R.F.; Moreira-Filho, O. (2013). Physical mapping of (GATA)_n and (TTAGGG)_n sequences in species of *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae). **Journal of Genetics**. 92:127-130.
- Úbeda-Manzanaro, M.; Merlo, M.A.; Palazón, J.L.; Cross, I.; Sarasquete, C.; Rebordinos, L. (2010). Chromosomal mapping of the major and minor ribosomal genes, (GATA)_n and U2 snRNA gene by double-colour FISH in species of the Batrachoididae family. **Genetica**. 138:787–794.
- Vicari, M.R.; Moreira-Filho, O.; Artoni, R.F.; Bertollo, L.A.C. (2006). ZZ/ZW sex chromosome system in an undescribed species of the genus *Apareiodon* (Characiformes, Parodontidae). **Cytogenetic Genome Research**. 114:163-168.
- Vicente, V.E.; Bertollo, L.A.C.; Valentini, S.R.; 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.
- Viger, R.S.; Mertineit, C.; Trasler, J.M.; Nemer, M. (1998). Transcription factor GATA 4 is expressed in a sexually dimorphic pattern during mouse gonadal development and is a potent activator of the MIS promoter. **Development**. 125:2665–2675.
- Wichman, H.A.; Payne, C.T.; Ryder, O.A.; Hamilton, M.J.; Maltbie, M.; Baker, R.J. (1991). Genomic distribution of heterochromatic sequences in equids: implications to rapid chromosomal evolution. **Journal of Heredity**. 82:369–377.
- Wilder, J.; Hollocher, H. (2001). Mobile elements and the genesis of microsatellites in dipterans. **Molecular Biology and Evolution**. 18:384–392.

5.1.7. Figuras e Tabelas

Tabela 1. Espécies estudadas e locais de amostragem de oito espécies de Parodontidae.

As espécies são mantidas no Museu de Zoologia do Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura da Universidade Estadual de Maringá (NUPELIA) e no Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP).

Espécies	Rio/Estado	Bacia Hidrográfica	Nº de ♂	Nº de ♀	Total
<i>Apareiodon piracicabae</i>	Rio Mogi-Guaçu (SP)	Alto Paraná	12	14	26
<i>Apareiodon hasemani</i>	Rio São Francisco (MG)	São Francisco	8	11	19
<i>Apareiodon ibitiensis</i>	Rio Corumbataí (SP)	Piracicaba	2	3	5
<i>Apareiodon sp.</i>	Rio Verde (PR)	Alto Paraná	5	8	13
<i>Parodon pongoensis</i>	Rio Araguaia (GO)	Tocantins/Araguaia	11	8	19
<i>Parodon nasus</i>	Rio Mogi-Guaçu (SP)	Alto Paraná	10	10	20
<i>Parodon hilarii</i>	Rio São Francisco (MG)	São Francisco	19	12	31
<i>Apareiodon affinis</i>	Rio Passa-Cinco (SP)	Alto Paraná	22	8	30

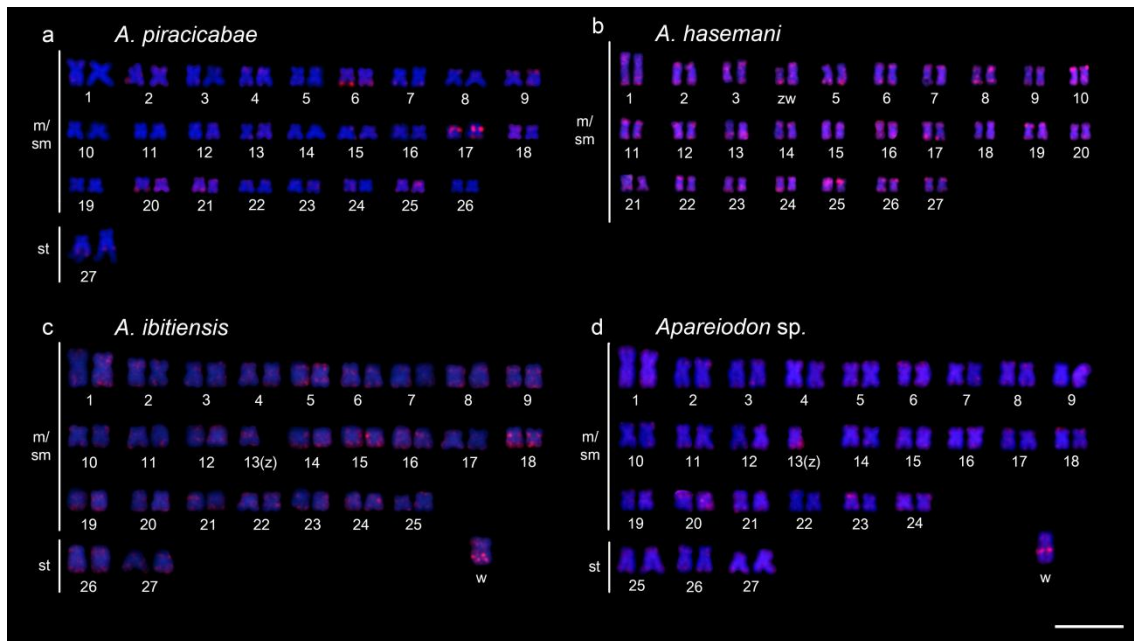


Figura 1. Cariótipos de espécimes fêmeas de Parodontidae submetidos à FISH com a sonda (GATA) n . Os sinais de (GATA) n são mostrados com rodamina (vermelho) e os cromossomos contra corados com DAPI (azul). Em (a) *A. piracicabae*; (b) *A. hasemani*; (c) *A. ibitiensis*; (d) *Apareiodon* sp. Barra = 5 μ m.

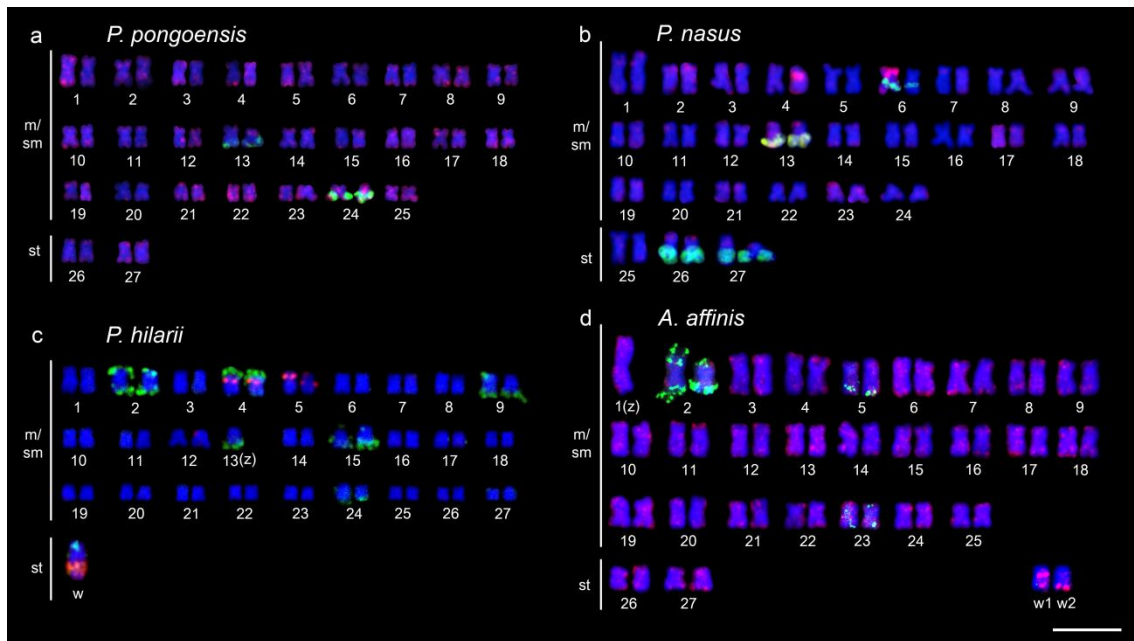


Figura 2. Cariótipos de espécimes fêmeas de Parodontidae submetidos à FISH com a sonda (GATA)_n. Os sinais de (GATA)_n são mostrados com rodamina (vermelho), a sonda pPh2004 com FITC (verde) e os cromossomos contra corados com DAPI (azul). Em (a) *P. pongoensis*; (b) *P. nasus*; (c) *P. hilarii*; (d) *A. affinis*. Barra = 5 µm.

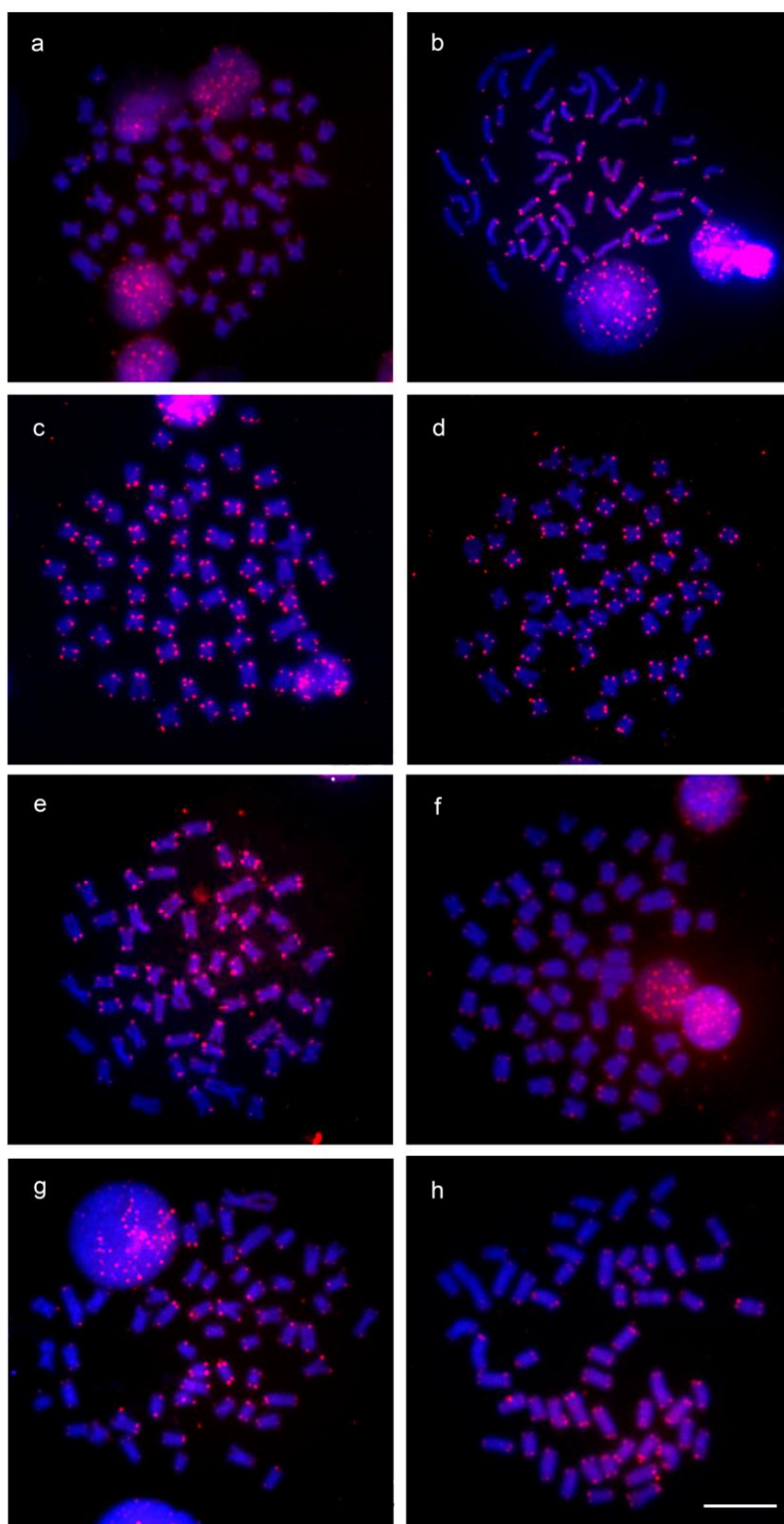


Figura 3. Metáfases de espécimes fêmeas de Parodontidae submetidas à FISH com a sonda (TTAGGG) n marcada com rodamina (vermelho). Em (a) *A. piracicabae*; (b) *A. hasemani*; (c) *A. ibitiensis*; (d) *Apareiodon* sp.; (e) *P. pongoensis*; (f) *P. nasus*; (g) *P. hilarii*; (h) *A. affinis*. Barra = 5 μ m.

5.2. Capítulo 2

Mapeamento cromossômico de microssatélites em Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes): ênfase nos cromossomos sexuais

Artigo em Preparação

Resumo

Os genomas eucariotos são densamente povoados por microssatélites, (SSR - *Simple Sequence Repeats*). Alguns atuam na replicação do DNA, recombinação, regulação da expressão gênica e organização da cromatina, tornando-os importantes em estudos de genoma. Assim, o mapeamento cromossômico de microssatélites demonstra um enorme potencial para o entendimento da diferenciação cariotípica em peixes. Neste estudo foram mapeadas 16 sequências de microssatélites, em cinco espécies da família Parodontidae (*Apareiodon piracicabae*, *Parodon nasus*, *Apareiodon* sp., *Parodon hilarii* e *Apareiodon affinis*), com objetivo de verificar o acúmulo de DNA repetitivo nos cromossomos e sua atuação na diferenciação cariotípica dos cromossomos sexuais heteromórficos. As espécies apresentaram $2n = 54$ cromossomos, exibindo cromossomos sexuais ausentes ou homomórficos (*A. piracicabae*), proto cromossomo sexual (*P. nasus*), sistema de cromossomos sexuais heteromórficos do tipo ZZ/ZW (*Apareiodon* sp. e *P. hilarii*); e sistema de cromossomos sexuais heteromórficos do tipo ZZ/ZW₁W₂ (*A. affinis*). Os SSR demonstraram uma localização cromossômica relativamente semelhante nos autossomos das cinco espécies. Alguns tiveram sinais predominantemente terminais/subterminais. Em *A. piracicabae*, foram observados sinais na região subterminal do par cromossômico portador do DNAr 45S. Outros mostraram marcações correlacionadas às regiões eucromáticas dispersas nos genomas. Estes resultados sugerem que o acúmulo de microssatélites é compartilhado na história evolutiva de Parodontidae. Também atuam na manutenção das pontas cromossômicas e exercem um provável papel funcional no genoma. Demais acúmulos exibiram sinais em regiões heterocromáticas intersticiais, essencialmente nos cromossomos sexuais diferenciados. Houve um maior acúmulo no cromossomo W de *P. hilarii*, o que corrobora com a proposta de invasão de DNAs repetitivos, atuando na degeneração

genética e heterocromatinização do cromossomo sexual heteromórfico. Com os resultados, foi possível inferir sobre uma intensa invasão e acúmulo dessas sequências nas regiões terminais dos cromossomos, e verificada a atuação dos SSR na diferenciação genética e na história evolutiva do cromossomo W.

Palavras-chave: microssatélites, hibridação *in situ* fluorescente, cromossomos sexuais, DNAs repetitivos.

Abstract

The eukaryotic genomes are highly fulfilled for microsatellites (SSR - *Simple Sequence Repeats*). These sequences may play a role in DNA replication, recombination, regulation of genic expression and chromatin organization, making them important to genome studies. Chromosomal mapping of microsatellites perform then a huge potential to understand karyotypic differentiation in fishes. In this study we mapped 16 microsatellite sequences, in the genome of five species of Parodontidae (*Apareiodon piracicabae*, *Parodon nasus*, *Apareiodon* sp., *Parodon hilarii* and *Apareiodon affinis*), in order to search the accumulation of repetitive DNA in chromosomes and its role in heteromorphic sex chromosomes differentiation. The studied species have a diploid number of 54 chromosomes, exhibiting absent or homomorphic sex chromosomes (*A. piracicabae*), proto sex chromosomes (*P. nasus*), heteromorphic ZZ/ZW sex chromosomes system (*Apareiodon* sp. and *Parodon hilarii*); heteromorphic ZZ/ZW₁W₂ sex chromosomes system (*A. affinis*). The SSR sequences were observed in a similar localization on autosomes of all five species. Some of them showed terminal/subterminal signals. In *A. piracicabae*, signals were observed in subterminal region of the chromosome pair bearing 45S rDNA sequence. Others revealed marks related to euchromatic regions spread through the genomes. These results suggest that the accumulation of microsatellites is shared in evolutionary history of Parodontidae. They also act in keeping chromosomal ends and probably have an important role in the genome. Further accumulation was observed in interstitial heterochromatic regions, especially in differentiated sex chromosomes. There were a major accumulation in the W chromosome of *P. hilarii*, that corroborates with the repetitive DNA invasion proposal, acting in genic erosion and heterochromatinization of heteromorphic sex

chromosome. These results enable some inferences about an intense invasion and accumulation of sequences in terminal regions of chromosomes, verifying the role of SSR in the genetic differentiation and evolutionary history of W chromosome.

Keywords: microsatellites, fluorescence *in situ* hybridization, sex chromosomes, repetitive DNAs.

5.2.1. Introdução

O genoma de organismos eucariotos contém vários tipos de sequências de DNA presente em múltiplas cópias, que muitas vezes pode representar grandes porções do genoma (Charlesworth et al., 1994). Essas sequências podem ser repetidas *in tandem* e incluem as famílias multigênicas, os satélites, minissatélites e microsatélites (Martins, 2007). Também podem ser dispersas no genoma, como os transposons e retrotransposons (Martins, 2007).

As sequências repetitivas de DNA geralmente se acumulam em regiões cromossômicas com baixa recombinação, formando a heterocromatina (Charlesworth et al., 1994; Stephan e Cho 1994; Martins, 2007). Nessas regiões de alta densidade de DNAs repetitivos o genoma está sujeito a inúmeros processos, os quais incluem elevada taxa mutacional, degeneração de genes, adição de genes ou, quebras e rearranjos cromossômicos (Charlesworth & Charlesworth, 2000).

Os microsatélites são denominados de sequências repetidas simples (SSR - *Simple Sequence Repeats*), que consistem de unidades de 1 a 6 nucleotídeos que estão repetidas *in tandem* (para uma revisão veja Schlotterer, 2000; Li et al., 2002; Ellegren, 2004). Podem ser encontrados entre as regiões codificantes dos genes estruturais ou entre outras sequências repetitivas (Tautz & Renz, 1984). Portanto, não são encontrados somente na porção heterocromática, podendo ser amplamente dispersos ou limitar-se a determinadas regiões dos cromossomos (Cuadrado et al., 2008), e estão entre as sequências de DNA com mais rápida evolução (Kubat et al., 2008).

Certos SSRs detêm um papel estrutural/funcional no DNA, entre os quais, atuam na replicação do DNA, na recombinação, na regulação da expressão gênica e na organização da cromatina (Li et al., 2004; Martins et al., 2011). Ainda, as sequências repetitivas microsatélites são os elementos mais polimórficos no DNA devido à intensa

variação do número das unidades de repetição (Cuadrado et al., 2008; Schneider et al., 2015). Essas características tornam os SSRs ferramentas importantes para utilização em estudos de genoma e para a visualização de rearranjos cromossômicos e amplificação da heterocromatina (Terencio et al., 2013; Ziemniczak et al., 2014). Neste contexto, o mapeamento cromossômico de microssatélites demonstra um enorme potencial para o entendimento da diferenciação cariotípica em peixes (Cioffi et al., 2010; Martins et al., 2012; Cioffi et al., 2012; Xu et al., 2013; Poltronieri et al., 2013; Yano et al., 2014; Cioffi et al., 2015; Schneider et al., 2015; Maneechot et al., 2016, Traldi et al., 2016).

A família Parodontidae compreende um grupo de peixes neotropicais dividido em três gêneros: *Parodon*, *Apareiodon* e *Saccodon* (Pavanelli & Britski, 2003). Apresentam um número diploide conservado de 54 cromossomos, onde ocorrem espécies sem cromossomos sexuais heteromórficos, espécies com proto cromossomos sexuais, espécies com sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW e espécies com sistema múltiplo de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW₁W₂ (Moreira-Filho et al., 1980, 1993; Schemberger et al., 2011, 2014).

Neste estudo foram mapeadas 16 sequências repetitivas de microssatélites em cinco espécies da família Parodontidae (*Apareiodon piracicabae*, *Parodon nasus*, *Apareiodon* sp., *Parodon hilarii* e *Apareiodon affinis*) com objetivo de verificar o acúmulo de DNA repetitivo nos cromossomos e sua atuação na diferenciação cariotípica.

5.2.2. Material e Métodos

Preparação do material

Cinco espécies da família Parodontidae foram analisadas citogeneticamente: *A. piracicabae*, *P. nasus*, *Apareiodon* sp. (população rio Tibagi), *P. hilarii* e *A. affinis* (Tabela 1). A captura das espécies na natureza está em conformidade com a autorização

do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (Licença permanente para coleta de material zoológico ICMBio/SISBIO: 10538-1; 15117-1). Os procedimentos de manuseio animal em pesquisa foram realizados em conformidade com o Comitê de Ética em Experimentação Animal (processo número: 13/2014) da Universidade Estadual de Ponta Grossa (Brasil). As preparações de cromossomos foram obtidas pelo método de air-drying a partir de células renais (Bertollo et al., 1978) com modificações (Blanco et al., 2012).

Preparação das sondas

Neste estudo foram utilizados os seguintes microssatélites: (GAC)₁₀, (CGG)₁₀, (C)₃₀, (A)₃₀, (TAA)₁₀, (GAA)₁₀, (GAG)₁₀, (GACA)₄, (GA)₁₅, (TA)₁₅, (CA)₁₅, (CG)₁₅, (CAA)₁₀, (CAC)₁₀, (CAT)₁₀, e (CAG)₁₀. Estas sequências foram marcadas em sua extremidade 5' durante sua síntese (Sigma, St. Louis, MO, USA) e utilizados como sondas no procedimento de hibridação *in situ* fluorescente (FISH).

FISH e análise de microscopia

A hibridação *in situ* fluorescente (FISH) foi realizada em condições de estrigência próxima à 77% (2.5 ng/μL de sonda, 50% formamida, 2xSSC e 10% sulfato dextrano por 18 h a 37° C), de acordo com o método descrito por Pinkel et al. (1986). A detecção do sinal de fluorescência foi realizada usando *streptavidin Alexa Fluor 488* (Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA). Os cromossomos foram contracorados com 0.2 μg mL⁻¹ of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) em meio de montagem Vectashield (Vector, Burlingame, CA, USA).

As hibridizações foram analisadas em microscópio de epifluorescência Zeiss Axio Imager A2 e Câmera Zeiss Axio Cam MRm de Captura Monocromática com

sensor CCD e resolução de 1.4 mega pixels acoplado ao software ZEISS pro 2011 (Carl Zeiss®). As melhores metáfases foram fotografadas e registradas. A análise da verificação da reprodutibilidade do sinal de fluorescência foi realizada em cerca de 30 metáfases para cada sonda/espécie, metodologia adotada para sondas multi-locos.

5.2.3. Resultados

As espécies estudadas apresentaram $2n = 54$ cromossomos e quanto à presença de cromossomos sexuais heteromórficos são classificadas: cromossomos sexuais ausentes ou homomórficos (*A. piracicabae*), proto cromossomo sexual (*P. nasus*), sistema de cromossomos sexuais heteromórficos do tipo ZZ/ZW (*Apareiodon* sp. e *Parodon hilarii*); e sistema de cromossomos sexuais heteromórficos do tipo ZZ/ZW₁W₂ (*A. affinis*).

A localização cromossômica por FISH dos microssatélites (GAC)₁₀, (CGG)₁₀, (C)₃₀, (A)₃₀ e (TAA)₁₀ não apresentaram nenhuma marcação específica nos cromossomos das espécies analisadas (Figuras 1, 2, 3 e 5), exceto na espécie *P. hilarii*, onde as sequências (CGG)₁₀, (C)₃₀, (A)₃₀ e (TAA)₁₀ apresentaram marcações no cromossomo W e poucos sinais espalhados pelo cariótipo (Figura 4). Já os microssatélites (GAA)₁₀, (GAG)₁₀, e (GACA)₄ tiveram localização dispersa nos cromossomos de *A. piracicabae*, *P. nasus* e *Apareiodon* sp. (Figuras 1, 2 e 3), marcações conspícuas no cromossomo W de *P. hilarii* (Figura 4) e no cromossomo Z de *A. affinis* (Figura 5).

Os microssatélites (GA)₁₅, (TA)₁₅, (CA)₁₅, (CG)₁₅, (CAA)₁₀, (CAC)₁₀, (CAT)₁₀ e (CAG)₁₀ detêm localização cromossômica predominantemente terminais/subterminais em todas as espécies avaliadas (Figuras 1, 2, 3, 4 e 5). Em *A. piracicabae* também exibiram sinais subterminais no par em que o DNA ribossomal 45S está localizado

(Figura 1). Estes mesmos microssatélites localizados nos cromossomos de *Apareiodon* sp., além das marcas autossômicas dispersas, apresentaram um acúmulo no cromossomo W, nas regiões pericentromérica e intersticiais, exceto (CAC)₁₀ e (CAG)₁₀ (Figura 3). Em *P. hylarii*, apenas o microssatélite (GAC)₁₀ não apresentou sinais consistentes no cromossomo W. Todos os outros 15 microssatélites localizados *in situ* estão distribuídos no cromossomo W, sendo principalmente acumulados ao longo de todo o braço longo (Figura 4). Em *A. affinis*, (GA)₁₅, (TA)₁₅, (CA)₁₅ e (CAA)₁₀, apresentaram acúmulos terminais/subterminais nos autossomos e um maior acúmulo no cromossomo Z, também nas regiões terminais (Figura 5). Já os cromossomos W₁/W₂ de *A. affinis* não detêm acúmulos diferenciais destes microssatélites (figura 5).

5.2.4. Discussão

Os DNAs repetitivos têm sido amplamente aplicados como marcadores de localização física em cromossomos, para estudos comparativos de localização de rearranjos cromossômicos, identificação e caracterização de cromossomos sexuais e análise de evolução cromossômica em peixes Neotropicais (Vicari et al., 2010; Terencio et al., 2013; Scacchetti et al., 2015). Os SSR neste estudo demonstraram uma localização cromossômica relativamente semelhante nos autossomos das espécies *A. piracicabae*, *P. nasus*, *Apareiodon* sp., *Parodon hylarii* e *Apareiodon affinis*. Esse padrão sugere que o acúmulo de microssatélites nos genomas destas espécies é compartilhado na história evolutiva do grupo, com poucas modificações, exceto àquelas relativas aos cromossomos sexuais. Este padrão de localização corrobora a hipótese de que cada grupo de organismos/espécies apresenta acúmulo preferencial de SSR específicos com uma distribuição cromossômica característica (Tóth et al., 2000; Ruiz-Ruano et al., 2015; Scacchetti et al., 2015).

A região cromossômica terminal/subterminal possui uma alta taxa de modificações (Jain et al., 2010). Esta região é tipicamente composta por diferentes classes de DNA repetitivo, que podem ajudar a estabilizar a parte terminal dos cromossomos, devido à possibilidade de amplificar estas sequências, mesmo na ausência da atividade telomerase (Jain et al., 2010; Torres et al., 2011). Neste estudo os SSR (GA)₁₅, (TA)₁₅, (CA)₁₅, (CG)₁₅, (CAA)₁₀, (CAC)₁₀, (CAT)₁₀ e (CAG)₁₀ tiveram sinais predominantemente terminais/subterminais em todas as espécies analisadas, o que sugere uma atuação na manutenção das pontas cromossômicas. Para estes mesmos SSR, no caso particular de *A. piracicabae*, foram observados sinais também na região subterminal do par cromossômico portador do DNAr 45S. Este intenso acúmulo de microssatélites na região adjacente ao DNAr 45S nesta espécie ajuda a explicar o polimorfismo de tamanho desta região cromossômica (Moreira-Filho et al., 1993; Bellafrente et al., 2011). Entretanto, minissatélites e microssatélites são muitas vezes localizados em regiões eucromáticas de cromossomos (Kubat et al., 2008), sugerindo que uma porção destas sequências desempenham um papel funcional no genoma (Terencio et al., 2013). Em Parodontidae, a localização física dos SSR mostraram marcações correlacionadas às regiões eucromáticas dispersas nos genomas.

Além da grande maioria de locos terminais para os microssatélites analisados, é possível notar que em Parodontidae, os demais acúmulos microssatélites estão em regiões heterocromáticas intersticiais e, essencialmente nos cromossomos sexuais diferenciados. Durante a origem e evolução dos cromossomos sexuais, o evento mais provável nas fases iniciais da diferenciação é o acúmulo de sequências de DNA repetitivo, antecedendo e atuando na degeneração genética, visão apoiada por Steinemann & Steinemann (2005) e confirmada em diversos grupos (Kubat et al., 2008; Schemberger et al., 2011, 2014). Portanto, a redução da recombinação, o acúmulo de

sequências repetitivas e a heterocromatinização, são processos que estão interligados e determinantes na diferenciação dos cromossomos sexuais (Poltronieri et al., 2013).

Os SSR que exibiram sinais nos cromossomos sexuais W de *Apareiodon* sp. e *P. hilarii* coincidiram com as regiões heterocromáticas destes cromossomos (Bellafronte et al., 2011). Alguns estudos já mostraram maior acúmulo de SSR nas regiões heterocromáticas dos cromossomos sexuais (Pokorná et al., 2011; Cioffi et al., 2012; Poltronieri et al., 2013; Terencio et al., 2013; Nanda et al., 2014; Yano et al., 2014; Ziemniczak et al., 2014; Scacchetti et al., 2015). Em Parodontidae é possível notar que o acúmulo de microssatélites nos cromossomos sexuais é mais intenso no cromossomo W de *P. hilarii*. Esta espécie tem o maior cromossomo W entre os Parodontidae avaliados, o qual é intensamente heterocromático. Esse intenso acúmulo de SSR no cromossomo W corrobora a proposta de invasão de DNAs repetitivos, essencialmente elementos transponíveis e microssatélites, na degeneração genética e heterocromatinização do cromossomo sexual heteromórfico de Parodontidae (Schemberger et al., 2014; Ziemniczak et al., 2014).

Ao comparar o acúmulo de SSRs nos cromossomos W de *Apareiodon* sp. e *P. hilarii* é possível notar que *Apareiodon* sp. possui blocos menores localizados em posição proximal do braço longo, a qual não é visualizada no cromossomo Z e nos proto cromossomos sexuais de *P. nasus*. Já *P. hilarii* possui a expansão e acúmulo da maioria dos SSRs analisados por toda a extensão do braço longo. Este tipo de distribuição cromossômica, sem evidência de homologia destes sítios nos cromossomos Z, demonstra que estes microssatélites não participaram do evento de inversão paracêntrica proposto para a origem dos cromossomos sexuais (Centofante et al., 2002; Vicente et al., 2003; Schemberger et al., 2011), mas sim, atuaram na diferenciação e erosão gênica dos mesmos.

Sequências repetitivas já foram prospectadas e localizadas nos cromossomos sexuais de Parodontidae (Vicente et al., 2003; Vicari et al., 2010; Schemberger et al., 2011, 2014; Ziemniczak et al., 2014). Essas sequências repetitivas foram identificadas como satélites, minissatélites, microssatélites e elementos transponíveis degenerados. Em especial, é importante destacar que a região específica do cromossomo W (REW) detém acúmulo do microssatélite (GATA)_n, dos elementos transponíveis Tc1-Mariner e Helitron e, do DNA satélite sat1WP (Schemberger et al., 2014; Ziemniczak et al., 2014). Neste estudo é demonstrado que inúmeros outros microssatélites atuaram na diferenciação genética e na história evolutiva do cromossomo W.

A distribuição de microssatélites nos cromossomos sexuais múltiplos da espécie *A. affinis* é menor quando comparados aos cromossomos W de *Apareiodon* sp. e *P. hilarii*. Moreira-Filho et al., (1980) propuseram o sistema de cromossomos sexuais múltiplos ZZ/ZW₁W₂ de *A. affinis* portando poucas regiões heterocromáticas. Estes autores discutiram a provável interferência do excesso de heterocromatina no emparelhamento meiótico dos cromossomos sexuais múltiplos. O mapeamento de DNAs repetitivos em Parodontidae (Schemberger et al., 2011, 2014, Ziemniczak et al., 2014) tem demonstrado o pequeno acúmulo de sequências repetitivas nos cromossomos ZW₁W₂ de *A. affinis*. Neste estudo, os SSR com maior acúmulo nos cromossomos sexuais de *A. affinis* foram as sequências (GA)₁₅, (CA)₁₅ e (CAA)₁₀. No entanto, estas sequências evidenciaram prováveis sítios de homologia entre os cromossomos Z e W₁ ou W₂, que poderiam facilitar ou atuar no emparelhamento meiótico.

Com os resultados obtidos do mapeamento cromossômico de SSR, foi possível inferir sobre uma intensa invasão e acúmulo dessas sequências nas regiões terminais dos cromossomos de Parodontidae. Ainda, foi verificada a atuação dos SSR nas regiões de

diferenciação dos cromossomos sexuais, promovendo a erosão genética e heterocromatinização.

5.2.5. Agradecimentos

Os autores agradecem ao Ministério do Meio Ambiente / Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA / MMA / SISBIO No. 15117; No. 10538-1) pela autorização para recolher as amostras biológicas. Este estudo foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Secretaria de Ciência e Tecnologia do Estado do Paraná (SETI) e Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná (Fundação Araucária).

5.2.6. Referências

- Bellafronte, E.; Schemberger, M.O.; Moreira-Filho, O.; Almeida, M.C.; Artoni, R.F.; Margarido, V.P.; Vicari, M.R. (2011). Chromosomal markers in Parodontidae: an analysis of new and reviewed data with phylogenetic inferences. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**. 21:559–570.
- Bertollo, L.A.C.; Takahashi, C.S.; Moreira-Filho, O. (1978). Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Revista Brasileira de Genética**. 1 (2):103-120.
- Blanco, D.R.; Bertollo, L.A.C.; Lui, R.L.; Vicari, M.R.; Margarido, V.P.; Artoni, R.F.; Moreira-Filho, O. (2012). A new technique for obtaining mitotic chromosome spreads from fishes in the field. **Journal of Fish Biology**. 81:351-357.

- Centofante, L.; Bertollo, L.A.C.; Moreira-Filho, O. (2002). ZZ/ZW sex chromosome system in new species of the genus *Parodon* (Pisces, Parodontidae). **Caryologia**. 54:139-150.
- Charlesworth, B.; Charlesworth, D. (2000). The degeneration of Y chromosomes. **Philosophical Transactions of the Royal Society**. 355:1563–1572.
- Charlesworth, B.; Sniegowski, P.; Stephan, W. (1994). The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature**. 371:215-220.
- Cioffi, M.B.; Martins, C.; Bertollo, L.A.C. (2010). Chromosomal spreading of associated transposable elements and ribosomal DNA in the fish *Erythrinus erythrinus*. Implications for genome change and karyoevolution in fish. **BMC Evolutionary Biology**. 10:217.
- Cioffi, M.B.; Bertollo, L.A.C. (2012). **Chromosomal Distribution and Evolution of Repetitive DNAs in Fish**. In: Garrido R, editor. Repetitive DNAs Genome Dynamics. Basel: Karger. 197–221.
- Cioffi, M.B.; Bertollo, L.A.C.; Villa, M.A.; Oliveira, E.A.; Tanomtong, A.; Yano, C.F Supiwong, W.; Chaveerach, A. (2015). Genomic organization of repetitive DNA elements and its implications for the chromosomal evolution of channid fishes (Actinopterygii, Perciformes). **Plos One**. 10(6):e0130199.
- Cuadrado, A.; Cardoso, M.; Jouve, N. (2008). Physical organisation of simple sequence repeats (SSRs) in Triticeae: structural, functional and evolutionary implications. **Cytogenet Genome Research**. 120:210–219.
- Ellegren, H. (2004). Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nature Reviews Genetics**. 5:435–445.

- Jain, D.; Hebden, A.K.; Nakamura, T.M.; Miller, K.M.; Cooper, J.P. (2010). HAATI survivors replace canonical telomeres with blocks of generic heterochromatin. **Nature**. 467:223–227.
- Kubat, Z.; Hobza, R.; Vyskot, B.; Kejnovsky, E. (2008). Microsatellite accumulation in the Y chromosome of *Silene latifolia*. **Genome**. 51:350–356.
- Li, Y.C.; Korol, A.B.; Fahima, T.; Beiles, A.; Nevo, E. (2002). Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. **Molecular Ecology**. 11:2453–2465.
- Li, Y.C.; Korol, A.B.; Fahima, T.; Nevo, E. (2004). Microsatellites within genes: structure, function, and evolution. **Molecular Biology and Evolution**. 21:991–1007.
- Maneechot, N.; Yano, C.F.; Bertollo, L.A.C.; Getlekha, N.; Molina, W.F.; Ditcharoen S.; Tengjaroenkul, B.; Supiwong, W.; Tanomtong, A.; Cioffi, M.B. (2016). Genomic organization of repetitive DNAs highlights chromosomal evolution in the genus *Clarias* (Clariidae, Siluriformes). **Molecular Cytogenetics**. 9:4.
- Martins, C. (2007). **Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome**. In: Pisano, E.; Ozouf-Costaz, C.; Foresti, F.; Kapoor, B.G. (eds). Fish Cytogenetics. Science Publisher, Inc., USA.
- Martins, C.; Cabral-de-Mello, D.C.; Valente, G.T.; Mazzuchelli, J.; Oliveira, S.G. (2011). In: Urbano K (Ed.) Advances in Genetics Research, Vol. 4. Nova Science Publisher, Hauppauge, NY, USA, 1–82.
- Martins, N.F.; Bertollo, L.A.C.; Troz, W.P.; Feldberg, E.; Valentin, F.C.S.; Cioffi, M.B. (2012). Differentiation and evolutionary relationships in *Erythrinus erythrinus* (Characiformes, Erythrinidae). Comparative chromosome mapping of repetitive sequences. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**. 23:261–269.

- Moreira-Filho, O.; Bertollo, L.A.C.; Galetti Jr., P.M. (1993). Distribution of sex chromosome mechanisms in Neotropical fish and description of a ZZ/ZW system in *Parodon hilarii* (Parodontidae). **Caryologia**. 46:115-125.
- Moreira-Filho, O.; Bertollo, L.A.C.; Galetti, P.M. Jr. (1980). Evidences for a multiple sex chromosome system with female heterogamety in *Apareiodon affinis* (Pisces, Parodontidae). **Caryologia**. 33:83–91.
- Nanda, I.; Schories, S.; Tripathi, N.; Dreyer, C.; Haaf, T.; Schmid, M.; Schartl, M. (2014). Sex chromosome polymorphism in guppies. **Chromosoma**. 123:373–383.
- Pavanelli, C.S.; Britski, H.A. (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.; Gray, J.W. (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 83:2934-2938.
- Pokorná, M.; Kratochvil, L.; Kejnovsky, E. (2011). Microsatellite distribution on sex chromosomes at different stages of heteromorphism and heterochromatinization in two lizard species (Squamata: Eublepharidae: *Coleonyx elegans* and Lacertidae: *Eremias velox*). **BMC Genetics**. 12:90.
- Poltronieri, J.; Marquioni, V.; Bertollo, L.A.C.; Kejnovsky, E.; Molina, W.F. (2013). Comparative chromosomal mapping of microsatellites in *Leporinus* species (Characiformes, Anostomidae): unequal accumulation on the W chromosomes. **Cytogenetic Genome Research**. 142: 40–45.
- Ruiz-Ruano, F.J.; Cuadrado, A.; Montiel, E.E.; Camacho, J.P.M.; Lopez-Leon, M.D. (2015). Next generation sequencing and FISH reveal uneven and nonrandom

- microsatellite distribution in two grasshopper genomes. **Chromosoma**. 124:221–234.
- Scacchetti, P.C.; Utsunomia, R.; Pansonato-Alves, J.C.; Vicari, M.R.; Artoni, R.F. Oliveira, C.; Foresti, F. (2015). Chromosomal Mapping of Repetitive DNAs in *Characidium* (Teleostei, Characiformes): Genomic Organization and Diversification of ZW Sex Chromosomes. **Cytogenetic Genome Research**. p.1-8.
- Schemberger, M.O.; Bellafronte, E.; Nogaroto, V.; Almeida, M.C.; Schühli, G.S.; Artoni, R.F.; Moreira-Filho, O.; Vicari, M.R. (2011). Differentiation of repetitive DNA sites and sex chromosome systems reveal closely related group in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes). **Genetica**. 139: 1499-1508.
- Schemberger, M.O.; Oliveira, J.I.N.; Nogaroto, V.; Almeida, M.C.; Artoni, R.F.; Cestari, M.M.; Moreira-Filho, O.; Vicari, M.R. (2014). Construction and characterization of a repetitive DNA library in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes): A genomic and evolutionary approach to the degeneration of the W sex chromosome. **Zebrafish**. 11, 518-527.
- Schlotterer, C. (2000). Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. **Chromosoma**. 109:365–371.
- Schneider, C.H.; Gross, M.C.; Terencio, M.L.; Tavares, Édika S.G.M.; Martins, C.; Feldberg, E. (2015). Chromosomal distribution of microsatellite repeats in Amazon cichlids genome (Pisces, Cichlidae). **Comparative Cytogenetics**. 9(4):595–605.
- Steinemann, S.; Steinemann, M. (2005). Retroelements: tools for sex chromosome evolution. **Cytogenetic Genome Research**. 110:134–143.
- Stephan, W.; Cho, S. (1994). Possible role of natural selection in the formation of tandem-repetitive noncoding DNA. **Genetics**. 136: 333–341.

- Tautz, D.; Renz, M. (1984). Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. **Nucleic Acids Research**. 25. 12(10):4127–38.
- Terencio, M.L.; Schneider, C.H.; Gross, M.C.; Vicari, M.R.; Farias, I.P. (2013). Evolutionary dynamics of repetitive DNA in *Semaprochilodus* (Characiformes, Prochilodontidae): a fish model for sex chromosome differentiation. **Sexual Development**. 7:325–333.
- Torres, G.A.; Gong, Z.; Iovene, M.; Hirsch, C.D.; Buell, C.R.; Bryan, G.J.; Novák, P.; Macas, J.; Jiang, J. (2011). Organization and evolution of subtelomeric satellite repeats in the potato genome. **Genetics**. 1:85–92.
- Tóth, G.; Gaspari, Z.; Jurka, J. (2000). Microsatellites in different eukaryotic genomes survey and analysis. **Genome Research**. 10:967–981.
- Traldi, J.B.; Vicari, M.R.; Martinez, J.F.; Blanco, D.R.; Lui, R.L.; Moreira-Filho O. (2016). Chromosome Analyses of *Apareiodon argenteus* and *Apareiodon davisi* (Characiformes, Parodontidae): An Extensive Chromosomal Polymorphism of 45S and 5S Ribosomal DNAs. **Zebrafish**. 13(1):19-25.
- Vicari, M.R.; Nogaroto, V.; Noletto, R.B.; Cestari, M.M.; Cioffi, M.B.; Almeida, M.C.; Moreira-Filho, O.; Bertollo, L.A.C.; Artoni, R.F. (2010). Satellite DNA and chromosomes in Neotropical fishes: methods, applications and perspectives. **Journal of Fish Biology**. 76:1094-1116.
- Vicente, V.E.; Bertollo, L.A.C.; Valentini, S.R.; 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.
- Xu, D.; Lou, B.; Bertollo, L.A.C.; Cioffi, M.B. (2013). Chromosomal mapping of microsatellite repeats in the rock bream fish *Oplegnathus fasciatus*, with emphasis of their distribution in the neo-Y chromosome. **Molecular Cytogenetics**. 6:12.

- Yano, C.F.; Poltronieri, J.; Bertollo, L.A.C.; Artoni, R.F.; Liehr, T.; Cioffi, M.B. (2014). Chromosomal Mapping of Repetitive DNAs in *Triportheus trifurcatus* (Characidae, Characiformes): Insights into the Differentiation of the Z and W Chromosomes. **PLoS ONE**. 9(3):1-7.
- Ziemniczak, K., Traldi, J. B., Nogaroto, V., Almeida, M. C., Artoni, R. F., Moreira-Filho, O., Vicari, M. R. (2014). In situ localization of (GATA)_n and (TTAGGG)_n repeat DNAs and W sex chromosome differentiation in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes). **Cytogenetic and Genome Research**. 144:325-332.

5.2.7. Figuras e Tabelas

Tabela 1. Espécies estudadas e locais de amostragem. As espécies são mantidas no Museu de Zoologia do Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura da Universidade Estadual de Maringá (NUPELIA) e no Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP).

Espécies	Rio/Estado	Bacia Hidrográfica	Nº de	Nº de	Total
			♀	♂	
<i>A. piracicabae</i>	Rio Mogi-Guaçu (SP)	Alto Paraná	12	12	24
<i>P. nasus</i>	Rio Mogi-Guaçu (SP)	Alto Paraná	10	10	20
<i>Apareiodon sp.</i>	Rio São João (PR)	Alto Tibagi / Paranapanema / Alto Paraná	8	5	13
<i>P. hilarii</i>	Rio São Francisco (MG)	São Francisco	12	19	31
<i>A. affinis</i>	Rio Piracicaba (SP)	Piracicaba / Tietê / Alto Paraná	8	22	30

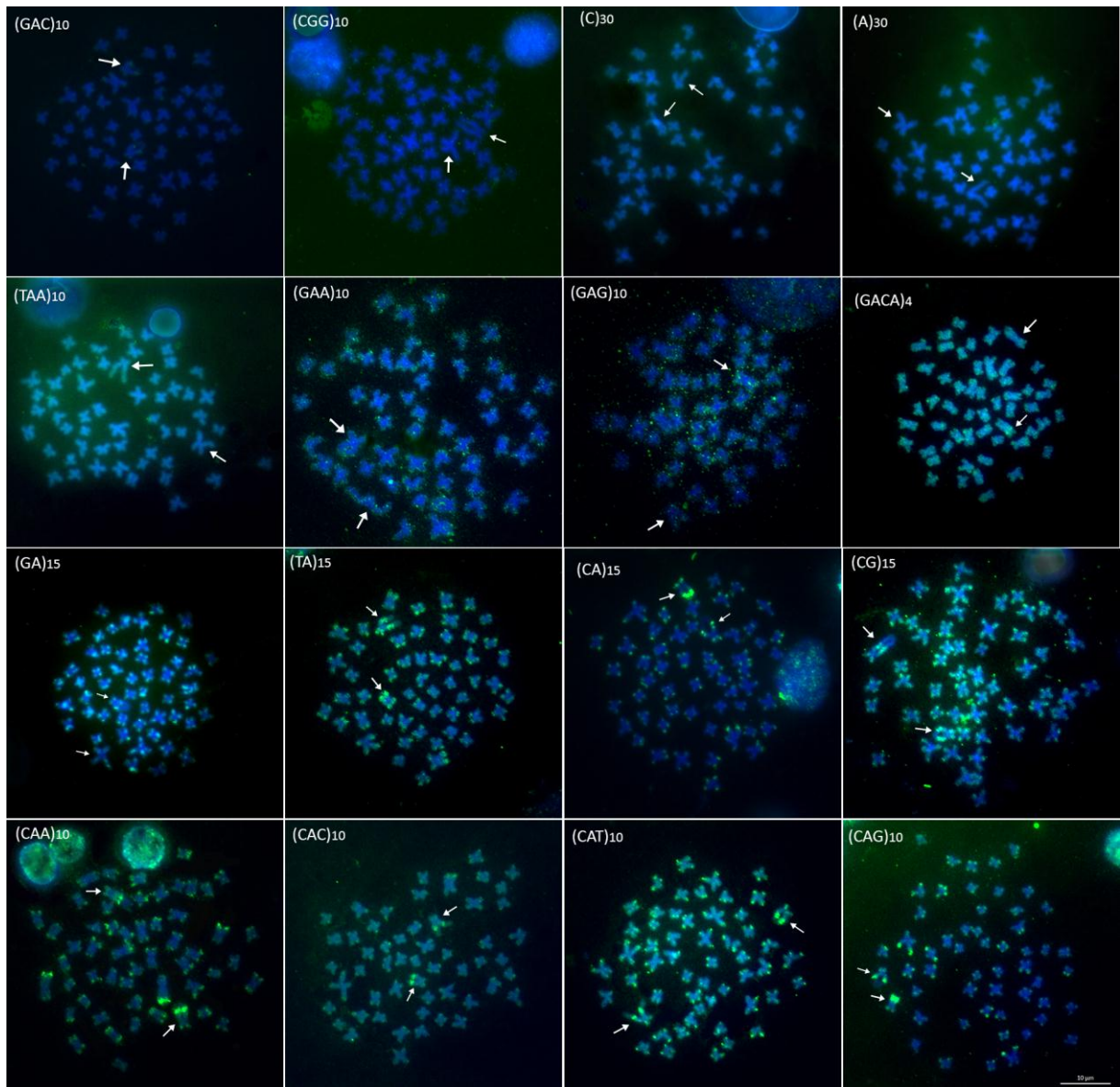


Figura 1. Metáfases de exemplares fêmeas de *Apareiodon piracicabae* hibridizadas com diferentes microssatélites contendo oligonucleotídeos marcados. Os cromossomos foram contra corados com DAPI. As setas indicam o par portador do DNAr 18s. Barra = 10 µm.

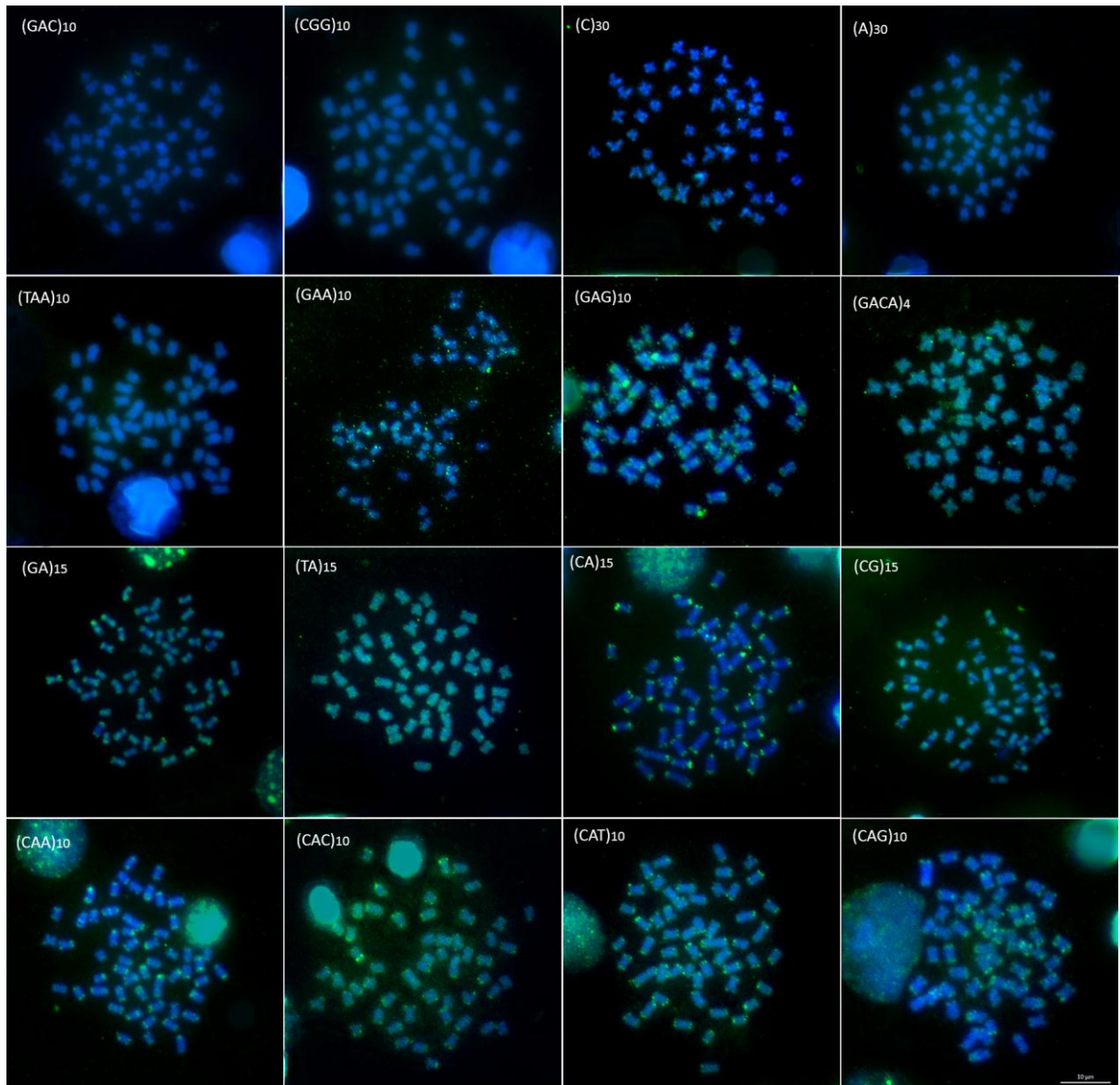


Figura 2. Metáfases de exemplares fêmeas de *Parodon nasus* hibridizadas com diferentes microssatélites contendo oligonucleotídeos marcados. Os cromossomos foram contra corados com DAPI. Barra = 10 µm.

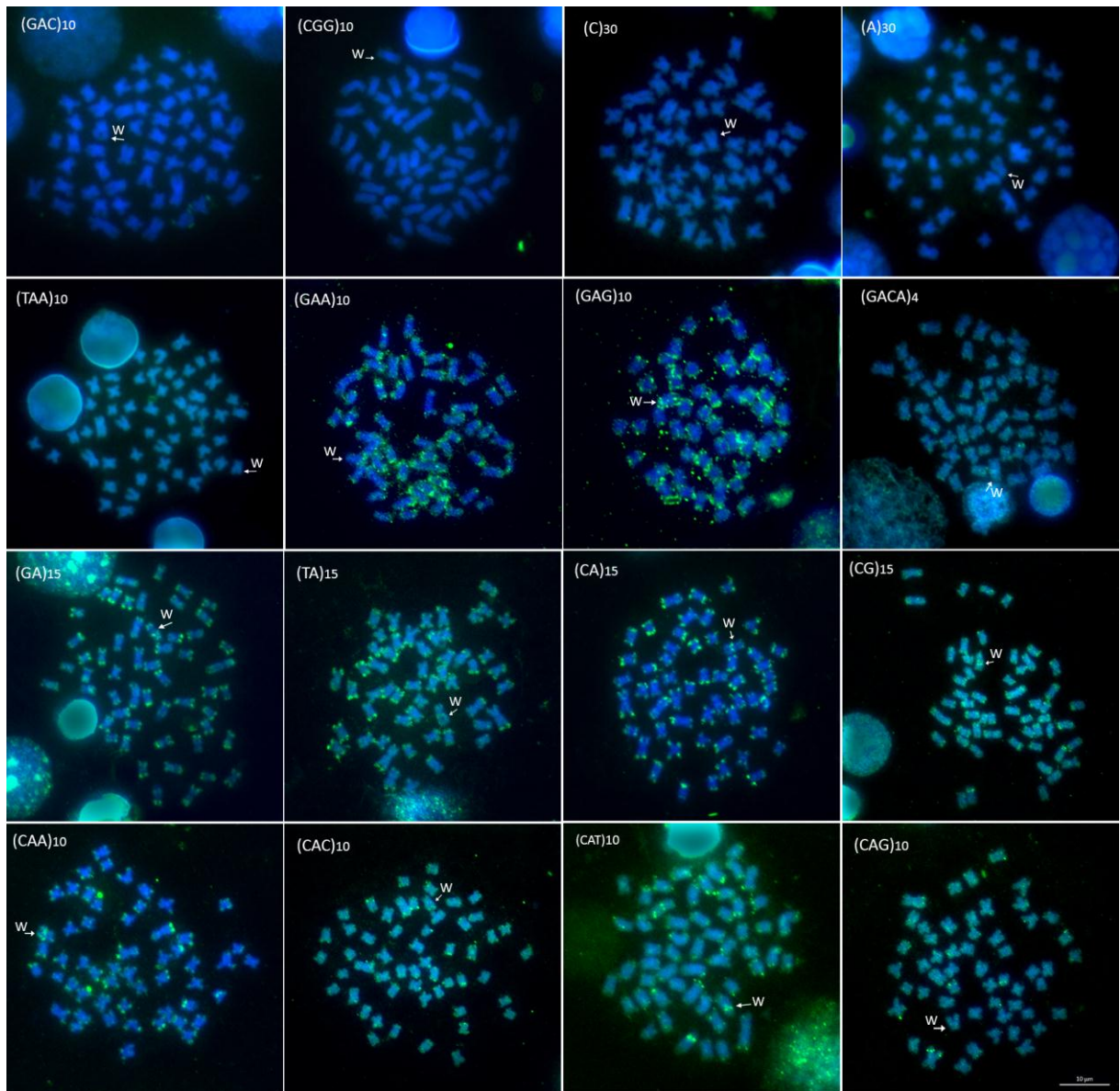


Figura 3. Metáfases de exemplares fêmeas de *Apareiodon* sp. hibridizadas com diferentes microssatélites contendo oligonucleotídeos marcados. Os cromossomos foram contra corados com DAPI. As setas indicam o cromossomo sexual W. Barra = 10 µm.

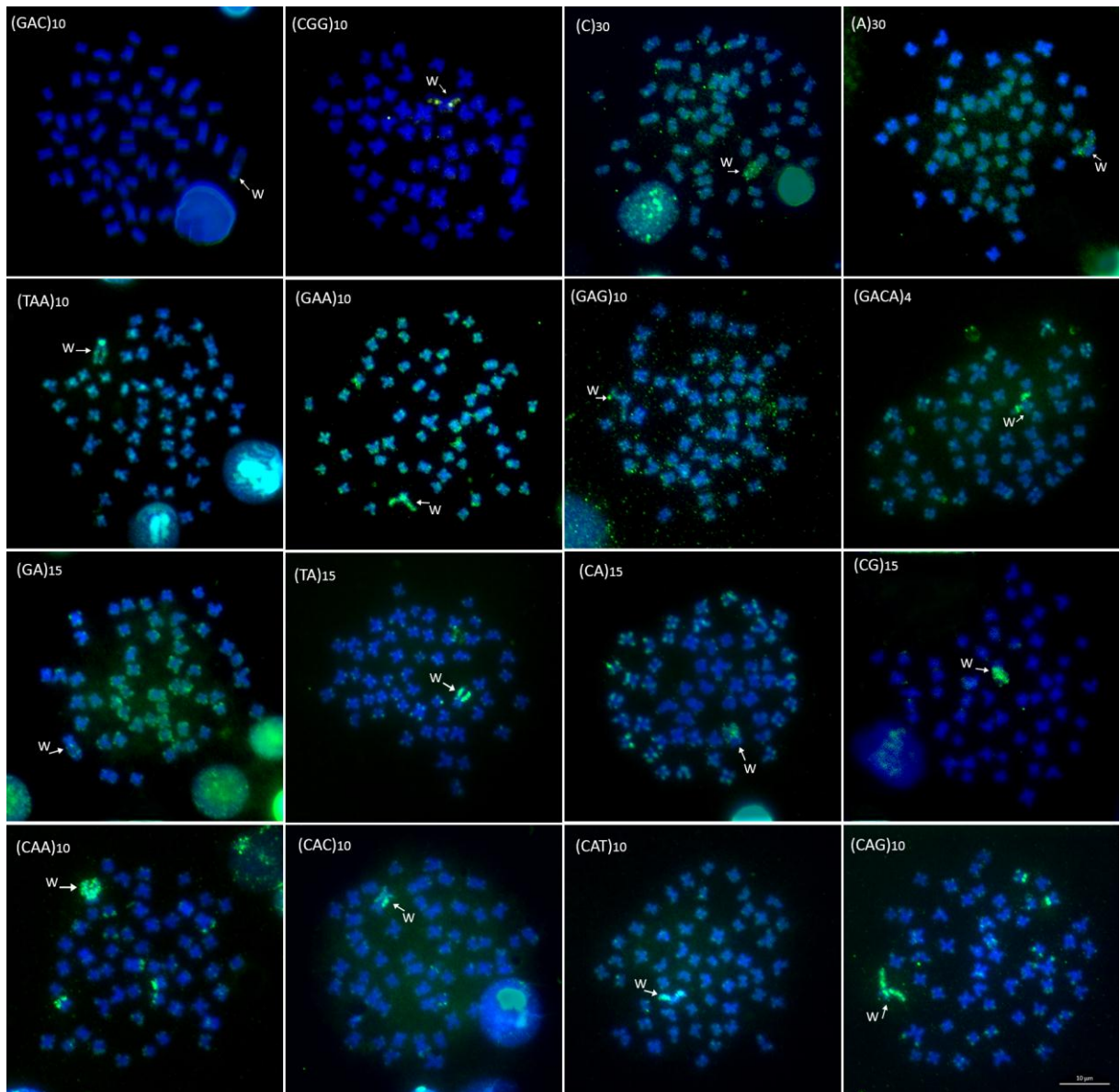


Figura 4. Metáfases de exemplares fêmeas de *Parodon hilarii* hibridizadas com diferentes microssatélites contendo oligonucleotídeos marcados. Os cromossomos foram contra corados com DAPI. As setas indicam o cromossomo sexual W. Barra = 10 µm.

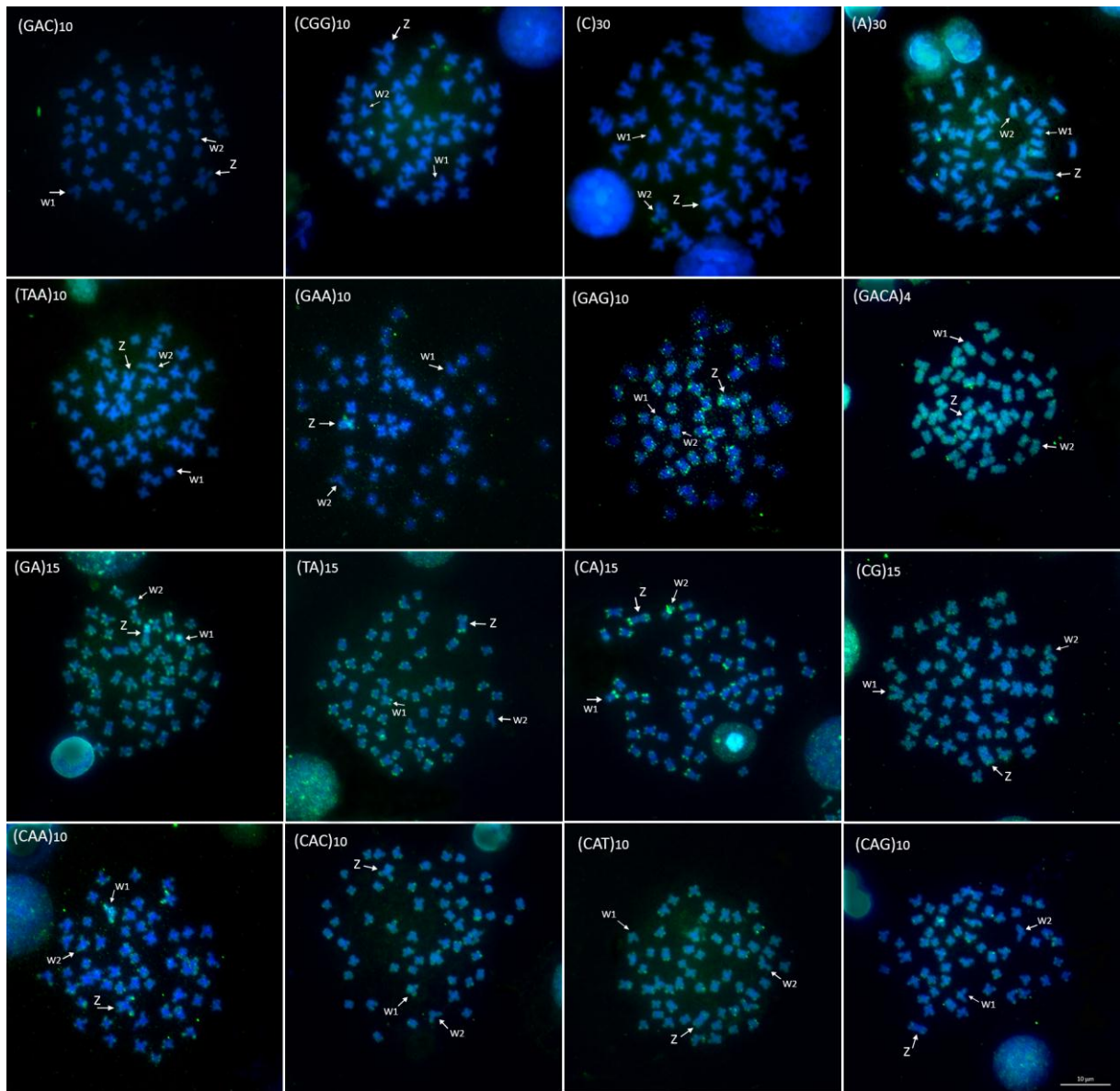


Figura 5. Metáfases de exemplares fêmeas de *Apareiodon affinis* hibridizadas com diferentes microssatélites contendo oligonucleotídeos marcados. Os cromossomos foram contra corados com DAPI. As setas indicam os cromossomos sexuais Z, W₁ e W₂.

Barra = 10 µm.

5.3. Capítulo 3

Mapeamento cromossômico das sequências de histonas H1, H3 e H4 em espécies de Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes)

Artigo em Preparação

Resumo

As histonas compõem uma família gênica de eucariotos de cinco proteínas básicas altamente conservadas, servem para organizar o DNA na sua unidade fundamental, o nucleossomo e, em conjunto com outras nucleoproteínas, na compactação maior da estrutura da cromatina. Genes de histonas variantes órfãos funcionais e pseudogenes também são conhecidos. Neste estudo, os DNA ribossomais 18S e 5S e as sequências parciais das histonas H1, H3 e H4 foram determinadas e tiveram sua localização cromossômica nas espécies *Apareiodon ibitiensis*, *A. affinis*, *Apareiodon* sp., *P. hilarii*, *P. nasus* e *A. piracicabae*. Com os resultados, foi possível determinar duas sequências de H1 para Parodontidae, H1 parcial e H1+Erv, além das sequências parciais para os genes H3 e H4. A localização *in situ* destas sequências mostraram a sequência H1+Erv dispersa pelos cromossomos das seis espécies avaliadas, enquanto H1 parcial, H3 e H4 foram localizadas em um ou dois loci principais. Os resultados demonstram o provável evento de transposição da H1 associado ao elemento retrotransponível Erv, divergência das sequências e, a origem de genes órfãos ou pseudogenes de H1 variantes. Os resultados de localização *in situ* das histonas também reforçam a ocorrência de inúmeros rearranjos cromossômicos em Parodontidae envolvendo sequências repetitivas de DNA. Neste contexto, a determinação das cópias variantes de H1 em peixes neotropicais necessita de estudo de validação e caracterização para a determinação da estrutura molecular dos genes histônicos e, a associação da sua regulação da expressão gênica no desenvolvimento e localização cromossômica.

Palavras-chave: histonas, hibridação *in situ* fluorescente, elemento retrotransponível Erv, rearranjos cromossômicos.

Abstract

The histones are included in a gene family of eukaryotes, composed by five essential proteins highly conserved. These proteins organize the DNA in its fundamental unit, the nucleosome and, along with other nucleoproteins, in a higher compaction of chromatin structure. Variants of functional histone genes and pseudogenes are also known. In this study, 18S and 5S ribosomal DNA and partial sequences of histones H1, H3 and H4 were determined and chromosome mapped in the species *Apareiodon ibitiensis*, *A. affinis*, *Apareiodon* sp., *Parodon hilarii*, *P. nasus* and *A. piracicabae*. The result analysis allowed the determination of two sequences of H1 for Parodontidae, partial H1 and H1+ERV, besides partial sequences of H3 and H4 genes. The *in situ* localization evidenced H1+ERV dispersed over chromosomes of the six species studied, while partial H1, H3 and H4 were evidenced in one or two main loci. The results suggest a possible transposition event involving the sequence H1 and retrotransposable element ERV, divergence of sequences and, the raise of orphan genes or pseudogenes of H1 variants. The results of *in situ* localization of histones also reinforce the occurrence of a significant number of chromosomal rearrangements in Parodontidae, involving repeated DNA sequences. In this context, the determination of the H1 variant copies in neotropical fishes require more validation and description researches, involving molecular structure determination of histone genes and, the association of regulation of these genes expression in the development and chromosomal localization.

Keywords: histones, fluorescence *in situ* hybridization, retrotransposable element Erv, chromosomal rearrangements.

5.3.1. Introdução

As histonas são genes exclusivos dos eucariotos e suas proteínas estão envolvidas no empacotamento do DNA em nucleossomos e também em eventos de modificação da cromatina e controle da expressão gênica (Eirín-López et al., 2004). Existem cinco classes de histonas que podem ser classificadas em dois grupos principais: nucleares (H2A, H2B, H3, H4) e histona ligante (H1) (Simpson, 1978), além de genes de histonas variantes (Shimada et al., 1981).

Os genes das histonas constituem uma família multigênica com um número variável de cópias agrupadas *in tandem* em uma ou mais regiões cromossômicas, ou, em alguns casos, estão espalhados individualmente sobre o genoma como cluster, como genes “órfãos” funcionais ou, pseudogenes (Childs et al., 1981; Hankeln & Schmidt, 1993). A organização típica da família gênica das histonas é no quinteto H2A, H2B, H3, H4 e H1 (Schienman et al., 1998). Contudo, a organização do cluster H2A, H2B, H3 e H4, outros tipos de clusterizações e diversos tipos de ordenamento dos genes de histonas já foram relatados para inúmeros genomas (Heintz et al., 1981; Hentschel & Birnstiel, 1981; Nagel & Grossbach, 2000; Braastad et al., 2004; Nagoda et al., 2005; Roehrdanz et al., 2010).

Genes de histonas organizados em repetições *in tandem*, diferem daqueles que ocorrem dispersos quanto à temporalidade da expressão gênica em um mesmo genoma (Childs et al., 1982). A expressão gênica temporal de variantes de histonas H3 e H4 (Childs et al., 1982) e de variantes da H1 (Destrée et al., 1979; Molgaard et al., 1980) é descrita para ser tardia no desenvolvimento. Em alguns organismos, a variante da H1 apresenta expressão tardia durante a etapa final da diferenciação de tecidos específicos, tais como células eritroides e na espermatogênese (Destrée et al., 1979; Molgaard et al., 1980; Hajkova et al., 2008).

Quanto à distribuição das histonas nos genomas, devido à organização das famílias multigênicas em “cluster”, elas se tornam importantes como marcadores cromossômicos para análise de evolução cariotípica, estrutura genômica e da origem e evolução de cromossomos B em animais (Oliveira et al., 2011). Embora a família multigênica das histonas possa ser considerada um excelente modelo para estudos de mapeamento de cromossomos, genes de histonas foram mapeados por hibridação *in situ* em poucos organismos, como em mexilhão (Eirín-López et al., 2002; Eirín-Lopez et al., 2004; Pérez-García et al., 2014), besouro (Cabral-de-Mello et al., 2010), gafanhoto (Cabrero et al., 2009; Oliveira et al., 2011), mariscos (García-Souto et al., 2015) e pulgão (Novotná et al., 2011). Em peixes são poucos os estudos da organização e distribuição de genes das histonas dentro dos seus genomas (Hashimoto et al., 2012; Pendas et al., 1994; Hashimoto et al., 2011; Lima-Filho et al., 2012; Pansonato-Alves et al., 2013a; Pansonato-Alves et al., 2013b; Silva et al., 2013; Costa et al., 2014).

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi estabelecer a localização física da família multigênica histônica usando sequências H1, H3 e H4, e também dos DNAr 5S e 18S em seis espécies da família Parodontidae (*Apareiodon ibitiensis*, *Apareiodon affinis*, *Apareiodon* sp., *Parodon hilarii*, *Parodon nasus* e *Apareiodon piracicabae*). As análises visam localizar a distribuição das sequências histônicas e dos DNA ribossomais 18S e 5S nos genomas dessas espécies, além de propiciar a compreensão dos processos de diferenciação e evolução cariotípica na família Parodontidae.

5.3.2. Material e Métodos

Espécies analisadas e preparação do material

Seis espécies da família Parodontidae foram analisadas: *A. ibitiensis*, *A. affinis*, *Apareiodon* sp., *P. hilarii*, *P. nasus* e *A. piracicabae* (Tabela 1). A captura das espécies

na natureza está em conformidade com a autorização do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (Licença permanente para coleta de material zoológico ICMBio/SISBIO: 15117-1; 10538-1). Os procedimentos de manuseio animal em pesquisa foram realizados em conformidade com o Comitê de Ética em Experimentação Animal (processo número: 13/2014) da Universidade Estadual de Ponta Grossa (Brasil). As preparações de cromossomos foram obtidas pelo método de air-drying a partir de células renais (Bertollo et al., 1978) com modificações (Blanco et al., 2012).

Metodologias Moleculares

A extração de DNA genômico foi realizada a partir do fígado da espécie *Apareiodon* sp., utilizando o protocolo adaptado de Doyle e Doyle (1990). Foram amplificadas por PCR duas sequências da histona H1, uma utilizando os primers H1F (5'-ATGGCAGAARYCGCMCCAGC-3') e H1R (5'-TACTTCTTCTTGGGSGCTGC-3') (Hashimoto et al., 2011) e outra utilizando os primers H1Pfw 5'-GTCTCGCAGTCCAAGGAGAG-3' e H1PRv 5'-GGTGCCTTTGGTCTGCAC-3' desenhados neste estudo a partir da sequência obtida de Parodontidae. A sequência da histona H3 foi amplificada a partir dos primers H3F (5'-ATGGCTCGTACCAAGCAGACVGC-3') e H3R (5'-ATATCCTTRGGCATRATRGTGAC-3') (Colgan et al., 1998) e para a sequência da histona H4 foram utilizados os primers H4F2s (5'-TSCGIGAYAACATYCAGGGIATCAC-3') e H4F2er (5'-CKYTTIAGIGCRTAIACCACRTCCAT-3') (Pineau et al., 2005). As reações de amplificação das histonas foram compostas por 100-200 ng de DNA genômico, 0,2µM de cada primer, 0,16 mM de dNTPs, 1U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen®), 1,5mM de cloreto de magnésio, 1x tampão da reação (200 mM Tris, pH 8.4, 500 mM KCl). O

programa da reação de amplificação consistiu de desnaturação inicial por 5 min a 95 °C, 30 ciclos de 95 °C por 30 s, 52 °C por 45 s, 72 °C por 1 min e 20 s e, extensão final a 72 °C por 7 min. Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose 1%, purificados pelo Kit Illustra GFX PCR DNA and GelBand Purification (GE Healthcare). As sequências foram submetidas ao sequenciamento nucleotídico utilizando o equipamento ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

As sequências obtidas foram analisadas usando o BIOEDIT 5.0.9 (Hall, 1999) e posteriormente submetidas a uma análise de identidade utilizando os bancos de dados BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e CENSOR (www.girinst.org/censor/index.php) e submetidas a alinhamentos por similaridade no software on-line MultAlin (Corpet, 1988).

Preparação das sondas

Neste estudo, juntamente com as sequências de histonas, as sequências de DNAr 18S e DNAr 5S foram utilizadas como sondas para localização cromossômica. A sequência do DNAr18S foi obtida por PCR a partir do DNA nuclear da espécie de peixe *Prochilodus argenteus* (Hatanaka e Galetti Jr. 2004), e a sequência de DNAr 5S foi obtida a partir da espécie de peixe *Leporinus elongatus* (Martins e Galetti Jr. 1999).

Os produtos de PCR de DNAr 5S e H3 foram sintetizados como sondas por PCR utilizando o nucleotídeo marcado dUTP Alexa Fluor 594 (Life Technologies). As duas sequências H1 obtidas foram marcadas através da incorporação do nucleotídeo digoxigenina 11 dUTP (Roche Applied Science) e, por sua vez, a sequência H4 foi marcada com biotina 16 dUTP (Roche Applied Science). As reações de PCR para incorporações de nucleotídeos marcadores foi realizada com 20 ng de DNA molde, 1× Tampão, 40 µM dATP, dGTP e dCTP, 28 µM dTTP, 12 µM do nucleotídeo marcador, 2

mM MgCl₂ e 0.05 U/μl de Taq DNA polimerase. O DNAr 18S foi biotilado usando o kit BioNick™ Labeling System (Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante.

FISH e análise de microscopia

A hibridação *in situ* fluorescente (FISH) foi realizada em condições de estrigência próxima à 77% (2.5 ng/μL de sonda, 50% formamida, 2xSSC e 10% sulfato dextrano por 18 h a 37° C), de acordo com o método descrito por Pinkel et al. (1986). A detecção do sinal de fluorescência para sondas biotiladas foi realizada usando *streptavidin Alexa Fluor 488* (Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA) e para sondas com digoxigenina foi utilizado o composto anti digoxigenina rodamina (Roche Applied Science). Os cromossomos foram contracolorados com 0.2 μg mL⁻¹ of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) em meio de montagem Vectashield (Vector, Burlingame, CA, USA).

As hibridizações foram analisadas em microscópio de epifluorescência Zeiss Axio Imager A2 e Câmera Zeiss Axio Cam MRm de Captura Monocromática com sensor CCD e resolução de 1.4 mega pixels acoplado ao software ZEISS pro 2011 (Carl Zeiss®).

As imagens foram selecionadas para organizar os cariótipos, onde os cromossomos foram recortados usando o software Adobe Photoshop, versão CS6, e organizados em pares de homólogos em classes e ordem decrescente de tamanho. Os cromossomos foram classificados em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm) e subtelocêntricos (st) de acordo com Levan et al. (1964).

5.3.3. Resultados

Os resultados do sequenciamento nucleotídico retornaram sequências de 548 pb e 247 pb para os produtos de amplificação dos dois conjuntos de primers para a H1 (Figura 1A). A sequência de H1 de 548 pb, aqui denominada de H1+ERV, apresentou identidade média de 88% na base de dados Blastn com H1 de diversas espécies de peixes, tais como: *Astyanax altiparanae*, *A. paranae*, *A. bockmanni*. Na base de dados Censor, a mesma sequência, além de retornar identidade com a H1, também apresentou similaridade em um segmento interno (256 – 459 pb) com parte do elemento transponível (TE) ERV1-2 FCa-I (Figura 1A). Por sua vez, a sequência H1 de 247 pb, aqui denominada de H1 parcial, representa a parte inicial da sequência anterior (100% de identidade) e não contém a parte da sequência H1 que detém similaridade com o TE ERV1-2 FCa-I (Figura 1A).

O resultado do sequenciamento nucleotídico da H3 retornou 318 pb, os quais apresentaram identidade média de 92% com H3 de *Astyanax fasciatus*, *A. paranae*, e *A. bockmanni*, (Figura 1B). Já, o sequenciamento da H4 retornou 431 pb, com identidade média de 90% com sequências parciais do gene H4 de *Astyanax mexicanus*, *Salmo salar*, *Poecilia latipinna*, entre outros (Figura 1C). Todas as sequências nucleotídicas serão depositadas na base de dados GeneBank por ocasião de publicação do artigo.

A FISH com a sonda da histona H1+ERV revelou pequenos sítios dispersos pelo cariótipo em todas as espécies analisadas, incluindo sítios dispersos também pelos cromossomos portadores dos sítios H3 e H4 (Figura 2). A FISH com sondas dos DNAr 18S e 5S de Parodontidae (Figura 3), demonstraram a mesma localização descrita para as espécies no estudo feito por Bellafronte et al. (2011), e foram utilizadas neste estudo para a verificação de ocorrência de sítios sintênicos às histonas. Em *A. ibitiensis*, *A.*

affinis e *Apareiodon* sp., a FISH com as sondas das histonas H1 parcial, H3 e H4 mostraram cluster no par cromossômico 12, na região distal do braço curto (Figura 3A, B e C). Já na espécie *P. hilarii* as histonas H1 parcial, H3 e H4 marcaram no braço curto do par 23 (Figura 3 D). Em *P. nasus*, dois pares apresentaram marcações das histonas H1 parcial, H3 e H4, os pares 18 e 26, sendo que no par 18 os sinais foram no braço longo, e no par 26 no braço curto (Figura 3 E). Na espécie *A. piracicabae* foi observado sinais em duas regiões do par subtelocêntrico 27, no braço curto e na região pericentromérica do braço longo. Neste par também está localizado o DNAr 18S na região distal do braço longo (Figura 3 F).

5.3.4. Discussão

A organização do cluster e a distribuição das histonas em unidades de repetições *in tandem* ou em clusters dispersos e, a presença de genes órfãos de histonas é variável nos genomas (Heintz et al., 1981; Braastad et al., 2004; Roehrdanz et al., 2010). Neste estudo, a localização das histonas H1, H3 e H4 demonstraram a ocorrência de um cluster principal de repetição *in tandem*. A presença deste cluster principal pode ser determinada pelas sequências H1 parcial, H3 e H4 colocalizadas nos cromossomos de Parodontidae. Contudo, a localização cromossômica da sequência H1+ERV demonstrou inúmeros sítios dispersos nos cromossomos das espécies analisadas.

Elementos transponíveis ou partes destes são comumente encontrados em famílias gênicas de DNAr (da Silva et al., 2011; Rebordinos et al., 2013; Symonová et al., 2013). Para as histonas, a presença de genes órfãos foi associada a elementos transponíveis devido sua possibilidade de saltar nos genomas (Childs et al., 1981) e, estes genes órfãos transpostos estariam livres para divergir em sequências e na temporalidade da expressão. Em *Chrionomus* um gene órfão variante da H1 resultou da

translocação e considerável divergência da sequência H1 (Hankeln & Schmidt, 1993). Em Parodontidae, a localização da sequência H1+ERV é dispersa pelo genoma e pode ser consequência de inúmeras retrotransposições na linhagem evolutiva associada ao elemento retrotransponível (RTE) da classe ERV. Estas inúmeras cópias nos genomas podem ter gerado inúmeros sítios pseudogenes H1, e grande quantidade dos sinais de hibridação visualizados podem ser resultado da identidade da sonda para o RTE. No entanto, a possibilidade de genes órfãos H1 funcionais espalhados pelos genomas aqui estudados não pode ser descartada. A expressão de H1 variantes nos genomas é dita para ser tardia e sob regulação tecido específica no desenvolvimento (Destrée et al., 1979; Molgaard et al., 1980; Hajkova et al., 2008). A identificação de genes H1 órfãos funcionais no genoma de Parodontidae gera a possibilidade da avaliação da temporalidade da expressão gênica das cópias variantes associada à localização cromossômica.

Estudos sobre a localização cromossômica de histonas mostram que, em geral, estas sequências apresentam localização cromossômica conservada em organismos relacionados, como observado nas espécies de gafanhotos (Cabrero et al., 2009), crustáceos (Barzotti et al., 2000) e peixes (Pendás et al., 1994; Hashimoto et al., 2011; Pansonato-Alves et al., 2013a; Pansonato-Alves et al., 2013b). No entanto, a histona H3 apresentou localização cromossômica conservada em *Hypostomus strigaticeps* e *H. nigromaculatus*, mas não em *H. ancistroides* (Pansonato-Alves et al., 2013a). No presente estudo, o cluster histônico detém localização cromossômica conservada nas espécies *A. ibitiensis*, *A. affinis* e *Apareiodon* sp., e loci cromossômicos diferentes para as espécies *P. hilarii*, *P. nasus* e *A. piracicabae*.

Contrário a aparente conservação cromossômica, a localização cromossômica de sequências repetitivas tem demonstrado inúmeros rearranjos cromossômicos em

espécies de Parodontidae (Vicente et al., 2003; Bellafronte et al., 2011; Schemberger et al., 2011, 2014; Ziemniczak et al., 2014). O par cromossômico subtelocêntrico 27 da espécie *A. piracicabae* mostrou sítios cromossômicos de histonas duplicados, além do DNAr 18S, em sítios cromossômicos independentes. Em *P. nasus* e *A. piracicabae* foram detectados dois clusters histônicos, sendo que em *P. nasus* os clusters estão em cromossomos diferentes. A localização cromossômica diferenciada do cluster histônico nas espécies *P. hilarii*, *P. nasus* e *A. piracicabae*, demonstram a ocorrência de rearranjos do tipo transposição e translocação em Parodontidae, não detectados por meio das análises cariotípicas convencionais. Todos estes dados sugerem, que o controle da disseminação dessas famílias multigênicas em um grupo de organismos, depende de uma combinação de forças evolutivas que operam de forma diferente em função da família multigênica específica, e do grupo de espécies em questão (Garcia-Souto et al., 2015).

Sítios cromossômicos da histona H1 e do DNAr 18S já foram detectados sintênicos e colocalizados em um híbrido entre as espécies *Pseudoplatystoma corruscans* e *Pseudoplatystoma reticulatum* (Hashimoto et al., 2012). Do ponto de vista estrutural, clusters detentores de famílias gênicas de DNAr associadas a famílias gênicas histônicas são descritos por não apresentar vantagem funcional, uma vez que são genes transcritos por diferentes polimerases (Hashimoto et al., 2012). Costa et al. (2014) realizaram a hibridação *in situ* e verificaram a colocalização de cinco sequências pertencentes às famílias multigênicas (DNAr 18S, DNAr 5S, H2B, H2A e H3) na espécie *Rachycentron canadum*. A associação de H1 e DNAr 5S foi descrito em espécies de *Astyanax* (Hashimoto et al., 2011), em *Astyanax fasciatus* (Pansonato-Alves et al., 2013b) e populações de *Bathygobius soporator* (Lima-Filho et al., 2012). O mapeamento cromossômico das histonas H1, H3 e H4 também foi realizado na espécie

Astyanax bockmanni, onde encontraram sintonia das histonas e do DNAr 5S no par cromossômico 2 (Silva et al., 2013). Em algumas espécies de invertebrados, estudos têm demonstrado uma associação comum de genes de histonas e ribossomais (Andrews et al., 1987; Cabrero et al., 2009; Roehrdanz et al., 2010; Novotná et al., 2011; Cabral-de-Mello et al., 2011; Mandrioli & Manicardi, 2013).

A relação de clusters cromossômicos portando sítios de DNAr e histonas colocalizados atrelada a um prejuízo transcricional requer cuidados. Apesar da colocalização, os sítios podem estar adjacentes na fibra cromatínica (de Barros et al., 2011) ou, mesmo que intercalares (Roehrdanz et al., 2010), funcionam corretamente. Roehrdanz et al. (2010) demonstraram a organização do cluster histônico em insetos e, em alguns casos, os genes adjacentes estão em direções opostas, fato que poderia auxiliar a montagem de sua maquinaria transcricional.

Neste contexto, o sequenciamento de DNA e a hibridação *in situ* de histonas H1 parcial, H1+ERV, H3 e H4 abordam uma visão integrada entre a localização cromossômica e a possibilidade de genes órfãos variantes no genoma de Parodontidae. A confirmação das sequências variantes para a H1, a organização dos clusters e, a confirmação da localização cromossômica atrelados aos dados das bibliotecas genômicas de *Apareiodon* sp., devem auxiliar no entendimento da estrutura e função destes genes em peixes neotropicais.

5.3.5. Agradecimentos

Os autores agradecem ao Ministério do Meio Ambiente / Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA / MMA / SISBIO No. 15117-1; 10538-1) pela autorização para recolher as amostras biológicas. Este estudo foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

(CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Secretaria de Ciência e Tecnologia do Estado do Paraná (SETI) e Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná (Fundação Araucária).

5.3.6. Referências

- Andrews, M.T.; Vaughn, J.C.; Perry, B.A.; Bagshaw, J.C. (1987). Interspersion of histone and 5S RNA genes in *Artemia*. **Gene**. 51(1):61–67.
- Barzotti, R.; Pelliccia, F.; Bucciarelli, E.; Rocchi, A. (2000). Organization, nucleotide sequence, and chromosomal mapping of a tandemly repeated unit containing the four core histone genes and a 5S rRNA gene in an isopod crustacean species. **Genome**. 43:341-345.
- Bellafronte, E.; Schemberger, M.O.; Moreira-Filho, O.; Almeida, M.C.; Artoni, R.F.; Margarido, V.P.; Vicari, M.R. (2011). Chromosomal markers in Parodontidae: analysis of new and reviewed data with phylogenetic inferences. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**. 21:559-570.
- Bertollo, L.A.C.; Takahash, C.S.; Moreira-Filho, O. (1978). Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Revista Brasileira de Genética**. v. 1, n. 2, p. 103-120.
- Blanco, D.R.; Bertollo, L.A.C.; Lui, R.L.; Vicari, M.R.; Margarido, V.P.; Artoni, R. F.; Moreira-Filho, O. (2012). A new technique for obtaining mitotic chromosome spreads from fishes in the field. **Journal of Fish Biology**. 81:351-357.
- Braastad, C.D.; Hovhannisyan, H.; van Wijnen, A.J.; Stein, J.L.; Stein, G.S. (2004). Functional characterization of a human histone gene cluster duplication. **Gene**. 342:35-40.

- Cabral-de-Mello, D.C.; Moura, R.C.; Martins, C. (2010). Chromosomal mapping of repetitive DNAs in the beetle *Dichotomius geminatus* provides the first evidence for an association of 5S rRNA and histone H3 genes in insects, and repetitive DNA similarity between the B chromosome and A complement. **Heredity**. 104:393-400.
- Cabral-de-Mello, D.C.; Cabrero, J.; López-León, M.D.; Camacho, J.P.M. (2011). Evolutionary dynamics of 5S rDNA location in acridid grasshoppers and its relationship with H3 histone gene and 45S rDNA location. **Genetica**. 139:921–31.
- Cabrero, J.; López-León, M.D.; Teruel, M.; Camacho, J.P.M. (2009). Chromosome mapping of H3 and H4 histone gene clusters in 35 species of acridid grasshoppers. **Chromosome Research**. 17(3):397–404.
- Childs, G.; Maxson, R.; Cohn, R.H.; Kedes, L. (1981). Orphans: dispersed genetic elements derived from tandem repetitive genes of eucaryotes. **Cell**. 23:651-663.
- Childs, G.; Nocente-McGrath, C.; Lieber, T.; Holt, C.; Knowles, J.A. (1982). Sea Urchin (*Lytechinus pictus*) Late-Stage Histon H3 and H4 Genes: Characterization and Mapping of a Clustered but Nontandemly Linked Multigene Family. **Cell**. 31: 383-393.
- Colgan, D.; McLauchlan, A.; Wilson, G.; Livingston, S. (1998). Histone H3 and U2 snRNA DNA sequences and arthropod molecular evolution. **Australian Journal of Zoology**. 46:419–437.
- Corpet, F. (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. **Nucleic Acids Research**. 16(22):10881-90.
- Costa, G.W.W.F.; Cioffi, M.B.; Bertollo, L.A.C.; Molina, W.F. (2014). Unusual Dispersion of Histone Repeats on the Whole Chromosomal Complement and Their Colocalization with Ribosomal Genes in *Rachycentron canadum* (Rachycentridae, Perciformes). **Cytogenetic and Genome Research**. 144(1):62-7.

- da Silva, M.; Matoso, D.A.; Vicari, M.R.; Almeida, M.C.; Margarido, V.P.; Artoni, R.F. (2011). Repetitive DNA and Meiotic Behavior of Sex Chromosomes in *Gymnotus pantanal* (Gymnotiformes, Gymnotidae). **Cytogenetic and Genome Research**. 135(2):143-9.
- de Barros, A.V.; Szczepanski, T.S.; Cabrero, J.; Camacho, J.P.M.; Vicari, M.R.; Artoni R.F. (2011). Fiber FISH reveals different patterns of high-resolution physical mapping for repetitive DNA in fish. **Aquaculture**. 323:47-50.
- Destrée, O.H.; Hoenders, H.J.; Moorman, A.F.; Charles, R. (1979). Histones of *Xenopus laevis* erythrocytes. Purification and characterization of the lysine-rich fractions. **Biochimica et Biophysica Acta**. 577(1):61–70.
- Doyle, J.J & Doyle, J.L. (1990). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**. 19:11-15.
- Eirín-López, J.M.; González-Tizón, A.M.; Martínez, A.; Méndez, J. (2002). Molecular and evolutionary analysis of mussel histone genes (*Mytilus* spp.): Possible evidence of an “orphon” origin for H1 histone genes. **Journal of Molecular Evolution**. 55:272–283.
- Eirín-López, J.M.; Ruiz, M.F.; González-Tizón, A.M.; Martínez, A.; Sánchez, L.; Méndez, J. (2004). Molecular evolutionary characterization of the mussel *Mytilus* histone multigene family: first record of a tandemly repeated unit of five histone genes containing an H1 subtype with “orphon” features. **Journal of Molecular Evolution**. 58:131-144.
- García-Souto, D.; Pérez-García, C.; Morán, P.; Pasantes, J.J. (2015). Divergent evolutionary behavior of H3 histone gene and rDNA clusters in venerid clams. **Molecular Cytogenetics**. 8:40.

- Hajkova, P.; Ancelin, K.; Waldmann, T.; Lacoste, N.; Lange, U.C.; Cesari, F.; Lee, C.; Almouzni, G.; Schneider, R.; Surani, M.A. (2008). Chromatin dynamics during epigenetic reprogramming in the mouse germ line. **Nature**. 452:877–881.
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**. 41:95-98.
- Hankeln, T & Schmidt, E.R. (1993). Divergent evolution of an “orphan” histone gene cluster in *Chironomus*. **Journal of Molecular Biology**. 234:1301–1307.
- Hashimoto, D.T.; Ferguson-Smith, M.A.; Rens, W.; Foresti, F.; Porto- Foresti, F. (2011). Chromosome mapping of H1 histone and 5S rRNA gene clusters in three species of *Astyanax* (Teleostei, Characidae). **Cytogenet Genome Research**. 134:64–71.
- Hashimoto, D.T.; Ferguson-Smith, M.A.; Rens, W.; Prado, F.D.; Foresti, F.; Porto- Foresti, F. (2012). Cytogenetic mapping of H1 histone and ribosomal RNA genes in hybrids between catfish species *Pseudoplatystoma corruscans* and *Pseudoplatystoma reticulatum*. **Cytogenet Genome Research**. 139:102–106.
- Hatanaka, T & Galetti Jr., P.M. (2004). Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). **Genetica**. 122:239-244.
- Heintz, N.; Zernik, M.; Roeder, R.G. (1981). The structure of the human histone genes: clustered but not tandemly repeated. **Cell**. 24: 661-668.
- Hentschel, C.C & Birnstiel, M.L. (1981). The organization and expression of histone gene families. **Cell**. 25:301–313.
- Levan, A.; Fredga, K.; Sandberg, A.A. (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**. 52:201-220.

- Lima-Filho, P.A.; Cioffi, M.Bello.; Bertollo, L.A.C.; Molina, W.F. (2012). Chromosomal and morphological divergences in Atlantic populations of the frillfin goby *Bathygobius soporator* (Gobiidae, Perciformes). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. 434-43:63–70.
- Mandrioli, M & Manicardi, G.C. (2013). Chromosomal mapping reveals a dynamic organization of the histone genes in aphids (Hemiptera: Aphididae). **Entomología**. 1:e2, 1-9.
- Martins, C & Galetti Jr., P.M. (1999). Chromosomal localization of 5S DNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). **Chromosome Research**. 7:363-367.
- Molgaard, H.V.; Perucho, M.; Ruiz-Carrillo, A. (1980). Histone H5 messenger RNA is polyadenylated. **Nature**. 283 (5746):502-504.
- Nagel, S & Grossbach, U. (2000). Histone H1 genes and histone gene clusters in the genus *Drosophila*. **Journal of Molecular Evolution**. 51(3):286-98.
- Nagoda, N.; Fukuda, A.; Nakashima, Y.; Matsuo, Y. (2005). Molecular characterization and evolution of the repeating units of histone genes in *Drosophila americana* : coexistence of quartet and quintet units in a genome. **Insect Molecular Biology**. 14:713–717.
- Novotná, J.; Havelka, J.; Starý, P.; Koutecký, P.; Vítková, M. (2011). Karyotype analysis of the Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* (Kurdjumov) (Hemiptera: Aphididae) reveals a large X chromosome with rRNA and histone gene families. **Genetica**. 139:281–289.
- Oliveira, N.L.; Cabral-de-Mello, D.C.; Rocha, M.F.; Loreto, V.; Martins, C.; Moura, R.C. (2011). Chromosomal mapping of rDNAs and H3 histone sequences in the grasshopper *rhammatocerus brasiliensis* (acrididae, gomphocerinae): extensive

- chromosomal dispersion and co-localization of 5S rDNA/H3 histone clusters in the A complement and B chromosome. **Molecular Cytogenetics**. 4:24.
- Pansonato-Alves, J.C.; Serrano, E.A.; Utsunomia, R.; Scacchetti, P.C.; Oliveira, C.; Foresti, F. (2013a). Mapping five repetitive DNA classes in sympatric species of *Hypostomus* (Teleostei: Siluriformes: Loricariidae): analysis of chromosomal variability. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**. 23:477-489.
- Pansonato-Alves, J.C.; Hilsdorf, A.W.S.; Utsunomia, R.; Silva, D.M.Z.A.; Oliveira, C.; Foresti, F. (2013b). Chromosomal Mapping of Repetitive DNA and Cytochrome C Oxidase I Sequence Analysis Reveal Differentiation among Sympatric Samples of *Astyanax fasciatus* (Characiformes, Characidae). **Cytogenetic and Genome Research**. 141:133-142.
- Pendás, A.M.; Morán, P.; García-Vázquez, E. (1994). Organization and chromosomal location of the major histone cluster in brown trout, Atlantic salmon and rainbow trout. **Chromosoma**. 103:147-152.
- Pérez-García, C.; Morán, P.; Pasantes, J.J. (2014). Karyotypic diversification in *Mytilus mussels* (Bivalvia: Mytilidae) inferred from chromosomal mapping of rRNA and histone gene clusters. **BMC Genetics**. 15:84.
- Pineau, P.; Henry, M.; Suspène, R.; Marchio, A.; Dettai, A.; Debruyne, R.; Petit, T.; Lécu, A.; Moisson, P.; Dejean, A.; Wain-Hobson, S.; Vartanian, J.P. (2005). A universal primer set for PCR amplification of nuclear histone H4 genes from all animal species. **Molecular Biology and Evolution**. 22:582-588.
- Pinkel, D.; Straume T.; Gray, J.W. (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 83:2934-2938.

- Rebordinos, L.; Cross, I.; Merlo, A. (2013). High evolutionary dynamism in 5S rDNA of fish: state of the art. **Cytogenetic Genome Research**. 141:103–113.
- Roehrdanz, R.; Heilmann, L.; Senechal, P.; Sears, S.; Evenson, P. (2010). Histone and ribosomal RNA repetitive gene clusters of the boll weevil are linked in a tandem array. **Insect Molecular Biology**. 19:463–471.
- Schemberger, M.O.; Bellafronte, E.; Nogaroto, V.; Almeida, M.C.; Schühli, G.S.; Artoni, R.F.; Moreira-Filho, O.; Vicari, M.R. (2011). Differentiation of repetitive DNA sites and sex chromosome systems reveal closely related group in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes). **Genetica**. 139:1499-1508.
- Schemberger, M.O.; Oliveira, J.I.N.; Nogaroto, V.; Almeida, M.C.; Artoni, R.F.; Cestari, M.M.; Moreira-Filho, O.; Vicari, M.R. (2014). Construction and characterization of a repetitive DNA library in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes): A genomic and evolutionary approach to the degeneration of the W sex chromosome. **Zebrafish**. 11(6):518-527.
- Schienman, J.E.; Lozovskaya, E.R.; Strausbaugh, L.D. (1998). *Drosophila virilis* has atypical kinds and arrangements of histone repeats. **Chromosoma**. 107:529–539.
- Shimada, T.; Okihama, Y.; Murata, C.; Shukuya, R. (1981). Occurrence of H1o-like protein and protein A24 in the chromatin of bullfrog erythrocytes lacking histone 5. **Journal of Biological Chemistry**. 256(20):10577-10582.
- Silva, D.M.Z.A.; Pansonato-Alves, J.C.; Utsunomia, R.; Daniel, S.N.; Hashimoto, D.T.; Oliveira, C.; Porto-Foresti, F.; Foresti, F. (2013). Chromosomal organization of repetitive DNA sequences in *Astyanax bockmanni* (Teleostei, Characiformes): dispersive location, association and co-localization in the genome. **Genetica**. 141:329–336.

- Simpson, R.T. (1978). Structure of chromatosome, a chromatin particle containing 160 base pairs of DNA and all the histones. **Biochemistry**. 17:5524-5531.
- Symonová, R.; Majtánová, Z.; Sember, A.; Staaks, G.B.O.; Bohlen, J.; Freyhof, J.; Rábová, M.; Ráb, P. (2013). Genome differentiation in a species pair of coregonine fishes: an extremely rapid speciation driven by stress-activated retrotransposons mediating extensive ribosomal DNA multiplications. **BMC Evolutionary Biology**. 13:42.
- Vicente, V.E.; Bertollo, L.A.C.; Valentini, S.R.; 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.
- Ziemniczak, K., Traldi, J. B., Nogaroto, V., Almeida, M. C., Artoni, R. F., Moreira-Filho, O., Vicari, M. R. (2014). *In situ* localization of (GATA)_n and (TTAGGG)_n repeat DNAs and W sex chromosome differentiation in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes). **Cytogenetic and Genome Research**. 144:325-332.

5.3.7. Figuras e Tabelas

Tabela 1. Espécies estudadas e locais de amostragem. As espécies são mantidas no Museu de Zoologia do Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura da Universidade Estadual de Maringá (NUPELIA) e no Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP).

Espécies	Rio/Estado	Bacia Hidrográfica	Nº de		Total
			♀	♂	
<i>A. piracicabae</i>	Rio Mogi-Guaçu, SP	Alto Paraná	12	12	24
<i>P. nasus</i>	Rio Mogi-Guaçu, SP	Alto Paraná	10	10	20
<i>Apareiodon</i> sp.	Rio Laranjinha, PR	Alto Cinzas / Paranapanema / Alto Paraná	9	10	19
<i>P. hilarii</i>	Rio São Francisco, MG	São Francisco	12	19	31
<i>A. affinis</i>	Rio Piracicaba, SP	Piracicaba / Tietê / Alto Paraná	10	8	18
<i>A. ibitiensis</i>	Rio Passa Cinco, SP	Alto Paraná	9	7	16

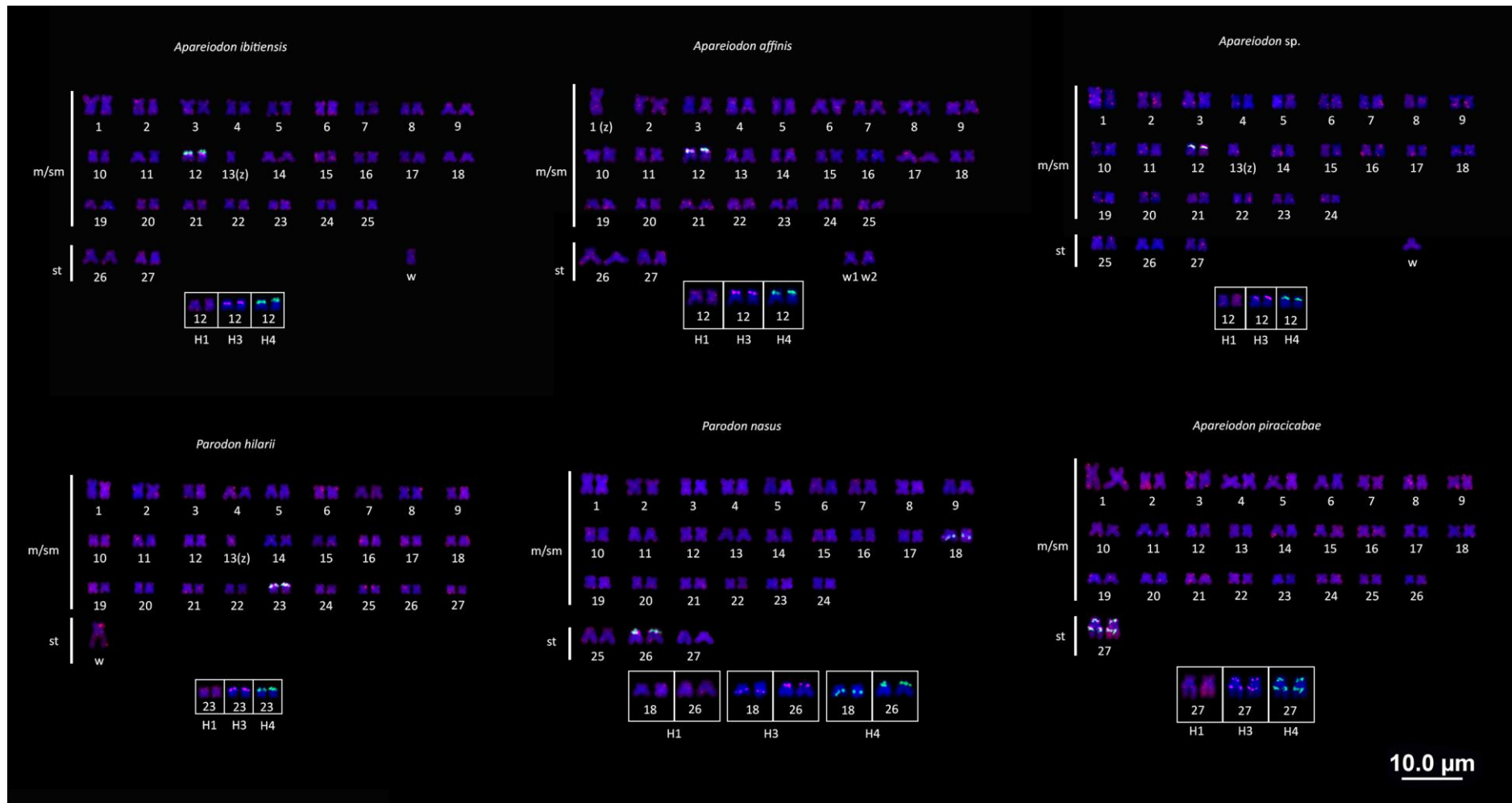


Figura 2. Cariótipos das espécies de Parodontidae submetidas à FISH com sondas de histonas H1+ERV (com o elemento transponível ERV1-2 FCa-I) (sinais vermelhos), H3 (sinal lilás) e H4 (sinal verde). Os cromossomos em destaque mostram os sítios das três sequências separadamente.

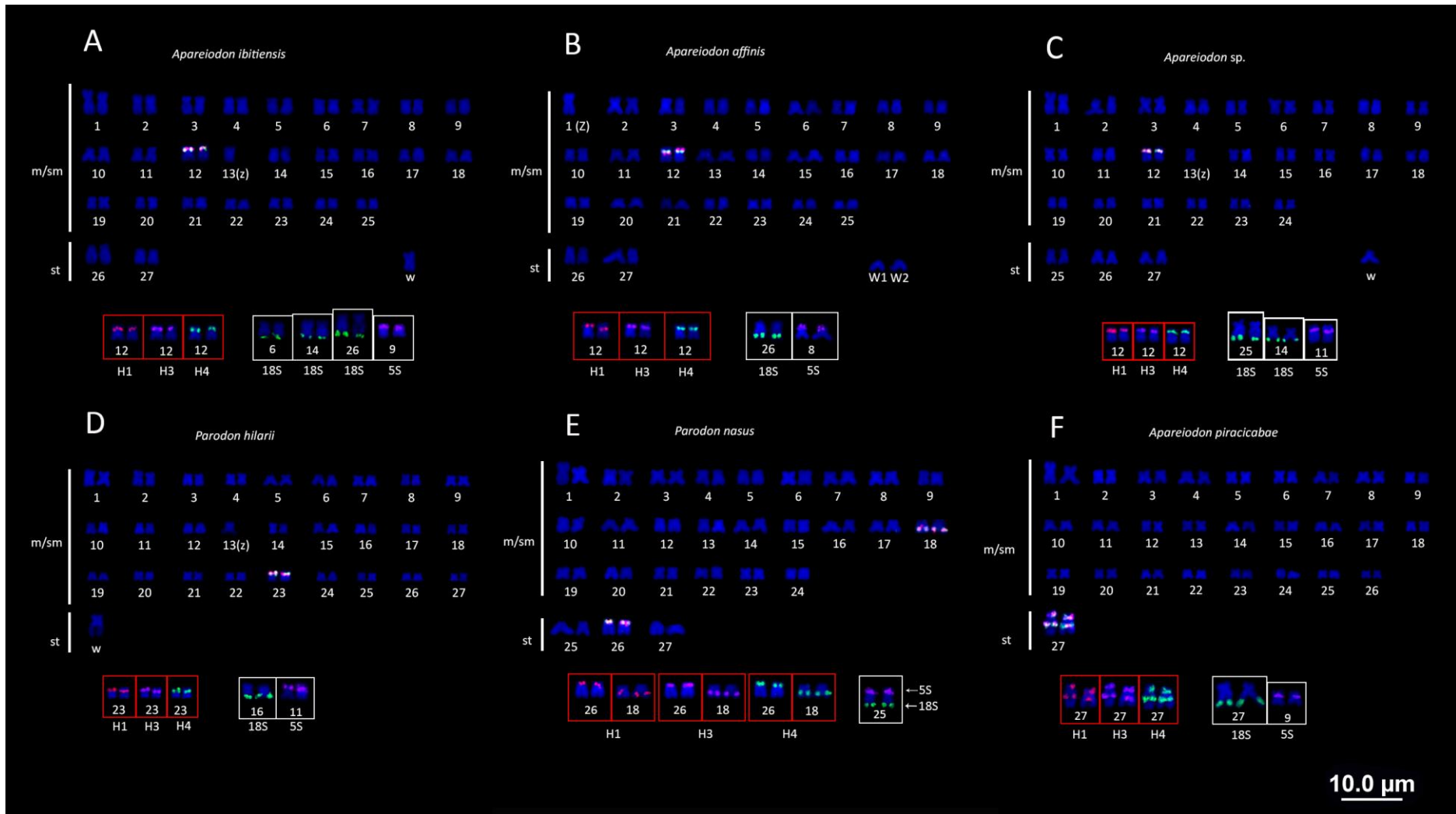


Figura 3. Cariótipos das espécies de Parodontidae submetidas à FISH com sondas de histonas H1 parcial (sem o elemento transponível ERV1-2 FCa-I) (sinal vermelho), H3 (sinal lilás) e H4 (sinal verde). Os cromossomos no destaque vermelho mostram os sítios das três sequências separadamente. Os cromossomos no destaque branco evidenciam os cromossomos portadores do DNAr 18S (sinal verde) e DNAr 5S (sinal lilás). Em A. *piracicabae* (F), o par 27 além dos sítios das histonas também possui o DNAr 18S.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo com a localização *in situ* das expansões (GATA)_n e (TTAGGG)_n demonstraram que Parodontidae apresenta uma diversificação cromossômica associada ao movimento de sequências repetitivas no genoma. Estes dados, quando comparados com a literatura, fornecem evidências indiretas de que a repetição (GATA)_n está associada com modificações da cromatina no cromossomo W de Parodontidae, que pode estar relacionado com o controle de expressão de genes e determinação sexual.

Com os resultados obtidos do mapeamento cromossômico de 16 microssatélites, foi possível inferir sobre uma intensa invasão e acúmulo dessas sequências nas regiões terminais dos cromossomos de Parodontidae. Ainda, foi verificada a atuação destes microssatélites nas regiões de diferenciação dos cromossomos sexuais, promovendo a erosão genética e heterocromatização.

O sequenciamento de DNA e a hibridação *in situ* de histonas H1 parcial, H1+ERV, H3 e H4 abordam uma visão integrada entre a localização cromossômica e a possibilidade de genes órfãos variantes no genoma de Parodontidae. A confirmação das sequências variantes para a H1, a organização dos clusters e, a confirmação da localização cromossômica atrelados aos dados das bibliotecas genômicas de *Apareiodon* sp., devem auxiliar no entendimento da estrutura e função destes genes em peixes neotropicais.

Os resultados obtidos neste estudo foram importantes para uma maior compreensão do papel dos DNAs repetitivos na família Parodontidae, sendo que o mapeamento de sequências repetitivas é essencial para a genômica integrativa e podem auxiliar estudos futuros relacionados ao sequenciamento genômico de Parodontidae.

7. ANEXOS

Anexo 1 - Licença permanente para coleta de material zoológico MMA/IBAMA/SISBIO



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Licença permanente para coleta de material zoológico

Número: 15117-1		Data da Emissão: 26/03/2008 18:25
Dados do titular		
Registro no Ibama: 2537361	Nome: Marcelo Ricardo Vicari	CPF: 952.846.480-72
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA		CNPJ: 80.257.355/0001-08

Observações, ressalvas e condicionantes

1	A participação de pesquisador(a) estrangeiro(a) nas atividades previstas nesta autorização depende de autorização expedida pelo Ministério de Ciência e Tecnologia (CNPq/MCT).
2	A licença permanente não é válida para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção, e b) manutenção de espécimes de fauna silvestre em cativeiro; c) recebimento ou envio de material biológico ao exterior, e d) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna. A restrição prevista no item d não se aplica às categorias Reserva Particular do Patrimônio Natural, Área de Relevante Interesse Ecológico e Área de Proteção Ambiental constituídas por terras privadas.
3	O pesquisador titular da licença permanente, quando acompanhado, deverá registrar a expedição de campo no Sisbio e informar o nome e CPF dos membros da sua equipe, bem como dados da expedição, que constarão no comprovante de registro de expedição para eventual apresentação à fiscalização.
4	Esta licença permanente não exime o seu titular da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
5	Esta licença permanente não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais, esportivos ou para realização de atividades inerentes ao processo de licenciamento ambiental de empreendimentos.
6	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular da necessidade de atender ao disposto na Instrução Normativa Ibama nº 27/2002, que regulamenta o Sistema Nacional de Anilhamento de Aves Silvestres.
7	O pesquisador titular da licença permanente será responsável pelos atos dos membros da equipe (quando for o caso).
8	O órgão gestor de unidade de conservação estadual, distrital ou municipal poderá, a despeito da licença permanente e das autorizações concedidas pelo Ibama, estabelecer outras condições para a realização de pesquisa nessas unidades de conservação.
9	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
10	O titular da licença permanente deverá apresentar, anualmente, relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias após o aniversário de emissão da licença permanente.
11	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo Ibama e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
12	A licença permanente será válida enquanto durar o vínculo empregatício do pesquisador com a instituição científica a qual ele estava vinculado por ocasião da solicitação.
13	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico.
14	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constante de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexplotação.

Táxons autorizados

#	Nível taxonômico	Táxon(s)
1	ORDEM	Characiformes, Cypriniformes, Synbranchiformes, Perciformes, Siluriformes, Gymnotiformes
2		

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA	Citogenética de Peixes
2	Museu Nacional da Universidade Federal do Rio de Janeiro	coleção

Este documento (Licença permanente para coleta de material zoológico) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 61434795



Página 1/2

Anexo 2 – Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Ponta Grossa.



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAL

CARTA DE APROVAÇÃO

Processo CEUA – 013/2014

Protocolo UEPG – 2855/2014

Título – “Caracterização de genes relacionados a diferenciação gonadal e elementos transponíveis: modelo em peixes Neotropicais”. **Interessado** – *Prof. Dr. Marcelo Vicari*

Data de Entrada – 21/02/2014

Resultado: Aprovado

Data/Prazo – 21/05/2014 a 20/05/2016

Considerações

Prezado Professor,

Em relação a utilização de animais no protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade, a CEUA deliberou pela sua aprovação pela aprovação, por dois anos, do uso de 30 (trinta) peixes.

- APROVADO.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Maria Marta Loddi
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA-UEPG

Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748, CEP 84.030-900 Campus Universitário em Uvaranas
Ponta Grossa – Paraná
Bloco da Reitoria - anexo a PROPEP
Fone: (042) 3220-3264

Anexo 3 - Obtenção de cromossomos mitóticos – tratamento “*in vivo*”

A obtenção de cromossomos mitóticos foi realizada seguindo a técnica de preparações diretas (Bertollo et al., 1978). Na região intra-abdominal no animal injetou-se uma solução aquosa de colchicina 0,025%, na proporção de 1 ml/100 g de peso. Os peixes foram mantidos em aquário bem aerado durante 50-60 minutos, posteriormente foram anestesiados com benzocaína diluída a 0,01%, e sacrificados. Retirou-se a porção do rim anterior e dissociada com uma seringa desprovida de agulha em cerca de 10 ml de solução hipotônica (KCl 0,075 M). O tecido dissociado foi incubado em estufa a 37°C durante 25-30 minutos, depois re-suspendido com auxílio de uma pipeta Pasteur e transferido para tubo de centrífuga. Adicionou-se neste tubo 1ml de fixador (3 partes de metanol para 1 de ácido acético glacial), o material foi novamente re-suspendido várias vezes, centrifugado durante 10 minutos, a 900 rpm e depois descartado o sobrenadante. Após a centrifugação adicionou-se 5-7 ml do mesmo fixador, re-suspendido e centrifugado por mais 10 minutos a 900 rpm, este passo foi repetido 2 vezes. Descartou-se o sobrenadante e adicionou uma quantidade de fixador para que se obtivesse uma suspensão celular moderadamente concentrada (geralmente de 0,5 a 1,0 ml), re-suspendido e armazenado em freezer para posterior utilização.

Para confecção de lâminas foram gotejados cerca de 150 microlitros da suspensão celular, com uma pipeta Pasteur. A lâmina estava limpa, levemente inclinada, com uma película d'água a 60°C, de tal forma que a água escorresse e permitisse que o material ficasse aderido sobre a lâmina. O material foi então deixado secar ao ar e corado com solução de Giemsa a 5 %, em tampão fosfato pH=6,8 durante 6-8 minutos.

Anexo 4. Obtenção de cromossomos mitóticos – tratamento “*in vitro*”

Alternativamente, os cromossomos foram obtidos segundo o protocolo descrito por Foresti *et al.* (1993), onde fragmentos do rim foram colocados em 10 mL de solução salina de Hanks, em uma placa de Petri, dissociando bem o material. Posteriormente, a suspensão celular obtida foi transferida para um tubo de centrifuga, utilizando uma pipeta de Pasteur. Em seguida, adicionou-se de 1 – 2 gotas de solução de Colchicina 0,016 %, misturando-a bem com o material. O material foi então transferido para estufa a 36 °C, por 30 minutos e centrifugado durante 10 minutos, a 500 – 800 rpm. O sobrenadante foi desprezado e adicionados 10 mL de solução hipotônica (KCl 0,075 M), misturando bem o material com uma pipeta Pasteur. Transferiu-se esse material novamente para estufa a 36 °C, por mais 30 minutos. Posteriormente, adicionou-se cerca de 6 gotas de fixador (metanol; ácido acético – 3:1) misturado-as com o material repetidas vezes, deixando-o descansar por 5 minutos. O material foi centrifugado por 10 minutos a 500 – 800 rpm. O sobrenadante foi desprezado e, em seguida, adicionado 10 mL de fixador, misturando-o com o material repetidas vezes. Seguiu-se nova centrifugação, por 10 minutos e repetida à fixação por mais duas vezes. O sobrenadante foi desprezado e o material diluído no fixador, de forma a se obter uma suspensão celular com material cromossômico fixado. Por fim, o material foi pingado sobre lâminas bem limpas e aquecidas ao redor de 25 – 30 °C. Após a secagem ao ar, seguiu-se a coloração do material com solução Giemsa 5 %, em tampão fosfato (pH 6,8), durante 5 – 8 minutos, lavagem em água destilada e secagem ao ar.

Anexo 5. Obtenção de cromossomos mitóticos – tratamento em campo

Foi utilizado o protocolo descrito por Blanco et al. (2012) para espécimes que não puderam ser transportados para o laboratório para o processamento. Os animais foram submetidos ao tratamento convencional com Colchicina (injeção intraperitoneal de solução de Colchicina 0,025%) e mantidos vivos por 30 - 45 minutos. Subsequentemente, os animais foram sacrificados. Porções do rim anterior foram removidas e dissociadas em solução hipotônica (KCl 0,075M), com o auxílio de seringas hipodérmicas. A suspensão celular resultante foi transferida para tubos de centrífuga e mantida em temperatura ambiente (26 - 28°C) por 30 minutos. Após a incubação, 2mL de fixador (metanol : ácido acético – 3:1) foram adicionados ao tubo e homogeneizados com o auxílio de uma pipeta Pasteur. Os tubos foram mantidos em refrigeração até chegarem no laboratório, onde foram submetidos a fixações, conforme descrito por Bertollo et al. (1978).

Anexo 6. Reação de mini preparação plasmidial (kit “Illustra PlasmidPrep Mini Spin” (GE Healthcare))

Transferir a cultura para tubo de 1,5 mL e centrifugar 16.000 g por 30 s. Descartar o sobrenadante e re-centrifugar toda a cultura restante. Adicionar 175 uL do Lysis Buffer type 7 e vortexar para desmanchar o precipitado. Adicionar 175 uL do Lysis Buffer type 8 e inverter vagarosamente o tubo 5 vezes. Adicionar 350 uL do Lysis Buffer type 9 e inverter vagarosamente até o precipitado se tornar claro. Centrifugar 16.000 g por 4 min. Colocar um ilustra plasmid mini column em um tubo coletor e adicionar o sobrenadante à coluna. Centrifugar 16.000 g por 30 s e descartar o que passou no tubo coletor. Adicionar 400 uL de wash buffer type 1 à coluna e centrifugar 16.000g por 1 min. Descartar o tubo coletor e o seu conteúdo. Transferir a coluna para um novo tubo de 1,5 mL e adicionar 100 uL do elution buffer type 4, deixar 30 s a temperatura ambiente e centrifugar 16.000 g por 30 s.

Anexo 7. Reação de amplificação das histonas

As reações foram realizadas para um volume final de 25µl, contendo 100-200 ng de DNA genômico, 0,2µM de cada primer, 0,16 mM de dNTPs, 1U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen®), 1,5mM de cloreto de magnésio, 1x tampão da reação (200 mM Tris, pH 8.4, 500 mM KCl). As condições do ciclo de PCR foram: 95°C por 5 minutos, 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 52°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto e 20 segundos, com posterior ciclo de extensão final de 72°C por 7 minutos.

Anexo 8. Reação de amplificação da sequência (GATA)_n e DNA telomérico (TTAGGG)_n

A reação de amplificação de cada DNA repetitivo em tubos isolados foi composta por 1x Taq Reaction buffer (200 mM Tris pH 8.4, 500 mM KCl), 40 µM dNTPs, 2 mM MgCl₂, 2 U of Taq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, USA), 0.2 µM primers (GATA)₇ e (TATC)₇ para o tubo de PCR GATA e; 0.2 µM primers (TTAGGG)₅ e (CCCTAA)₅ para a amplificação da sequência telomérica. A PCR foi feita em dois ciclos. A primeira amplificação foi realizada com baixa estringência: 4 min a 94 °C, 12 ciclos de 1 min a 94 °C, 45 s a 52 °C e 1 min 30 s a 72 °C; seguido por 35 ciclos de alta estringência: 1 min a 94 °C, 1 min 30 s a 60 °C e 1 min 30 s a 72 °C. Os produtos da PCR foram confirmados gel de agarose 1%, onde foram obtidos arrastos entre 1000 – 2000 bp.

Anexo 9. Marcação de sondas por nick translation, kit dig-nick translation mix (Roche Applied Science)

As reações de nick translation seguiram as orientações do fabricante. Pipetar os seguintes componentes em tubo de 1,5 ml no gelo: x μ l água qsp; x μ l sonda (equivalente a concentração de 1000 μ g/ μ l); 4 μ L mix de digoxigenin nick translation; completar para o volume total de 20 μ l; permanecer durante 1 hora e 30 minutos a 15° C; interromper aquecendo por 15 minutos a 65° C.

Anexo 10. Marcação de sondas por nick translation, kit biotin-nick translation mix (Roche Applied Science)

As reações de nick translation seguiram as orientações do fabricante. Pipetar os seguintes componentes em tubo de 1,5 ml no gelo: x μ l água qsp; x μ l sonda (equivalente a concentração de 1000 μ g/ μ l); 4 μ L mix de biotin nick translation; completar para o volume total de 20 μ l; permanecer durante 1 hora e 30 minutos a 15° C; interromper aquecendo por 15 minutos a 65° C.

Anexo 11. Marcação de sondas por nick translation, kit BioNick™ Labeling System (Invitrogen)

As reações de nick translation seguiram as orientações do fabricante. Pipetar os seguintes componentes em tubo de 1,5 ml no gelo: 5 µl 10X dNTP Mix; x µl (1 µg) de DNA ; x µl de água destilada para completar 45 µl; 5 µl 10X Enzyme Mix; permanecer durante 1 hora a 16° C; adicionar 5 µl de Stop Buffer; adicionar 5 µl de acetato de sódio (3M) gelado; adicionar 100 µl de etanol 100% gelado; misturar invertendo o tubo; pode-se deixar overnight no freezer ou 1 hora a -80 ° C; centrifugar a 14.000 rpm durante 10 minutos; descartar o sobrenadante; deixar o tubo na estufa a 37 ° C até secar; adicionar 20 µl de destilada e autoclavada.

Anexo 12. Marcação de sonda por PCR

Marcação das histona H1, H3 e H4

A PCR foi realizada contendo 100-200 ng de DNA genômico, 1 x tampão da reação, 2 mM MgCl₂, 40 μM dATP, dGTP e dCTP, 28 μM dTTP, 12 μM digoxigenina 11 dUTP (H1) ou biotina 16 dUTP (Roche Applied Science) (H4), ou ainda o fluorocromo Alexa Fluor 594 (Life Technologies) (H3), 0.2 μM de cada primer e 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen). O programa da reação foi: desnaturação inicial por 5 min a 95 °C, 30 ciclos de 95 °C por 30 s, 52 °C por 45 s, 72 °C por 1 min e 20 s e, extensão final a 72 °C por 7 min.

Marcação de DNAr 5S

50 ng/ μl de molde, 1 x tampão da reação, 2 mM MgCl₂, 40 μM dATP, dGTP e dCTP, 28 μM dTTP, 12 μM fluorocromo Alexa Fluor 594 (Life Technologies), 0.3 μM 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 1 min, 51 °C por 45 s, 72 °C por 2 min e 20 s e, extensão final a 72 °C por 5 min.

Anexo 13. Hibridação *in situ* fluorescente (FISH)

O procedimento geral da FISH seguiu o descrito por Pinkel et al. (1986). Os produtos das reações de marcação de sonda, por “nick translation”, foram precipitados com acetato de potássio e mantido em etanol por 16 horas (*overnight*) a -20°C. Posteriormente, as sondas foram centrifugadas por 15 minutos a 13000 rpm, sendo descartado o sobrenadante, na continuidade o DNA marcado foi seco em estufa a 37°C.

A. Preparação da solução de hibridação

Em todas as FISH, a mistura de hibridação consistiu de: 200 µl formamida (50% de formamida); 80 µl sulfato de sextrano 50% (concentração final de 10%); 40 µl de 20x *saline salt citrate* - SSC (concentração final 2x SSC); 80 µl de H₂O qsp, perfazendo um volume total de 400 µl, aos quais foram adicionados 1 µg da sonda 1 (DNA marcado com biotina) + 1 µg da sonda 2 (DNA marcado com digoxigenina 11 dUTP), (Double FISH). A estringência destas misturas de hibridação foi de 77 %. Em seguida, a solução de hibridação foi transferida para um banho fervente, durante 10 minutos, para desnaturação do DNA e, imediatamente após, para um recipiente com gelo, impedindo a renaturação por choque térmico.

B. Preparação das lâminas (lavagens pré-hibridação)

As lâminas, contendo as preparações cromossômicas, foram lavadas em tampão fosfato (*phosphate buffer saline*-PBS), por 5 minutos, em temperatura ambiente e desidratadas em uma série de etanol a 70 v/v, 85 v/v e 95 v/v, 5 minutos em cada incubação. A seguir, foram tratadas com solução de RNase (100 µg/ml) durante 1 hora, em câmara úmida a 37°C, lavadas duas vezes em solução de 2xSSC, por 10 minutos e em PBS, por 5 minutos. Em seguida a fixação com formaldeído 1 %/ PBS 1x / MgCl₂ 50mM, por 10 minutos, à temperatura ambiente, lavagem em PBS 1x por 5 minutos e desidratação em série de etanol a 70 v/v, 85 v/v e 95 v/v, 5 minutos cada incubação. As

lâminas foram então tratadas com formamida 70 % dissolvida em 2x SSC, a 70°C, por 5 minutos e novamente desidratadas em série de etanol gelado a 70 v/v, 85 v/v e 95 v/v, 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 2x SSC pH 7,0. Decorrido este tempo, as lâminas foram lavadas com solução de 2x SSC pH 7,0 por 20 minutos. Em seguida foram lavadas em Tween 20, por 5 minutos, incubação em 90 µl de tampão *non fat dry milk* (NFDM) a 5 %, por 15 minutos em câmara úmida e duas lavagens com Tween 20, cinco minutos cada. Para a detecção das sondas, foram colocados sobre as lâminas uma mistura de 100 µl de tampão NFDM contendo 1:1000 de avidina-FITC (Fluoresceína Isotil Cianato-avidina conjugada) a 0,25 µg/ml e 5:1000 de anti digoxigenina rodamina a 1 µg/ml; permanecendo por 1 h 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 v/v, 85 v/v e 95 v/v, 5 minutos em cada banho. Os cromossomos foram contra corados com 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI - 0,2 µg/ml) diluído em uma solução “antifade” (Fluka).

D. Análises dos resultados

As preparações cromossômicas convencionais e com hibridização *in situ* fluorescente foram analisadas em microscópio de campo claro e epifluorescência Zeiss Axio Imager A2 acoplado ao software ZEISS pro 2011 em Câmera Zeiss AxioCam MRm de Captura Monocromática com sensor CCD e resolução de 1.4 megapixels (Carl Zeiss®). As imagens foram selecionadas para organizar os cariótipos, onde os cromossomos foram recortados usando o software Adobe Photoshop, versão CS6, e organizados em pares de homólogos em classes e ordem decrescente de tamanho. Os

cromossomos foram classificados em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a) de acordo com Levan et al. (1964).

Anexo 14. Extração de DNA

Extração de DNA genômico e mitocondrial foi realizada a partir de tecidos sólidos (fígado ou músculo), utilizando o protocolo adaptado de Doyle e Doyle (1990), retirou um pequeno pedaço 15mm³ do fígado ou músculo do animal e foi colocado em um microtubo; adicionou 360µl de tampão (NaCl 5 M, EDTA 0,5 M, TRIS-HCl 1 M) sem CTAB (brometo de cetil-trimetilamônio); acrescentou 13 µl de proteinase K (10mg/mL), 5 µl de β-mercaptoetanol e 240 µl de CTAB (brometo de cetil-trimetilamônio) 5% cristalizado, posteriormente incubou em banho-maria a 55°C, overnight ou até digerir totalmente o tecido. Após este período adicionou-se 600 µl de clorofórmio e agito-se por 5 minutos em *vortex* suave, em seguida centrifugou a 8000 rpm por 5 minutos e retirou o sobrenadante transferindo-o para um novo tubo; adicionou-se 600 µl de etanol absoluto e armazenar a – 20 °C por 2 horas ou overnight. Posteriormente centrifugou-se a 14.000 rpm por 15 minutos e descartou o sobrenadante. Deixou somente *opellet*. Em seguida lavou o *pellet* com 500 µl de etanol a 70 v/v, sem agitar. Centrifugou por 2 minutos a 14.000 rpm e retirou o sobrenadante. Armazenou em estufa a 37 °C. Posteriormente, adicionou 5µl de RNase e colocou 1 hora na estufa a 37 °C. Em seguida foi inativado a RNase a 65 °C por 15 minutos e foi armazenado no freezer.

Anexo 15 - Purificação do produto da PCR pelo kit da GE healthcare - illustraGFX PCR DNA

A purificação seguiu o protocolo do Kit Illustra GFX PCR DNA and GelBand Purification (GE Healthcare). O protocolo consistiu na adição de 500µl de capture buffer type3 à 100 µl de amostra (10 µg) e centrifugação por 30 segundos a 16.000 rcf. Posteriormente, coletou o líquido do fundo do tubo que contém a amostra, transferiu para a microSpin Collumn e centrifugou por 30 segundos a 16.000 rcf. Na sequência, descartou todo o conteúdo do tubo coletor, mantendo a microSpin Collumn. Em seguida, adicionou 500µl de Wash buffer type1, centrifugou por 30 segundos a 16.000 rcf, descartou o conteúdo do tubo coletor e centrifugou novamente por 20 segundos a 16.000 rcf. Posteriormente, transferiu a microSpin Collumn para um microtubo novo e deixou evaporar o álcool a 70° C por 3 minutos. Após, adicionou 25µl do tampão type 6 a 70°C, aguardou 1 minuto e centrifugou por 1 minutos a 16.000 rcf. Coletou-se a solução que passou pela coluna e estocou a – 20 °C.

In situ Localization of (GATA)_n and (TTAGGG)_n Repeated DNAs and W Sex Chromosome Differentiation in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes)

Kaline Ziemniczak^a Josiane B. Traldi^a Viviane Nogaroto^b Mara C. Almeida^b
Roberto F. Artoni^b Orlando Moreira-Filho^a Marcelo R. Vicari^b

^aDepartamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, and ^bPrograma de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, Brazil

Key Words

Chromatin modification · Female-specific region · Karyotype evolution · W gene erosion

Abstract

The family Parodontidae presents a conserved diploid number of 54 chromosomes and different stages associated with ZW sex chromosome differentiation. For the great majority of species in this family it was proposed that the karyotypic diversification is mostly due to repetitive DNA mobility and accumulation. In this study, 2 repetitive probes, (GATA)_n and (TTAGGG)_n, were used to assess probable mechanisms of chromosome diversification, especially those related to molecular differentiation of the W chromosome. Results showed that the (GATA)_n sequence is involved in the differentiation of the W chromosome female-specific region of Parodontidae and that it is accumulated in diverse autosomes. The (TTAGGG)_n repeat is part of the vertebrate telomere, and the presence of interstitial telomeric sites may help to identify chromosome rearrangements. However, in Parodontidae, no interstitial telomeric sites were detected. This study shows plasticity in the amount of the (GATA)_n repeat in Parodontidae that may be involved in chromatin modifications and transcriptional control of the W chromosome, and the role of repetitive DNAs in genomic diversification in this fish family is discussed.

© 2015 S. Karger AG, Basel

Different classes of DNA are part of the chromosome structure in eukaryotes [Sumner, 2003]. Besides the non-repetitive DNA, some sequences are repeated hundreds to million times in the chromosome complement [Timberlake, 1978]. These repetitive DNAs are classified according to their main characteristics and include multi-gene families, noncoding tandem repeats (satellites, minisatellites, and microsatellites), and dispersed repeats known as transposons and retrotransposons [Sumner, 2003].

The accumulation and mobility of repetitive sequences in the genome promote chromosome differentiation with an important role in karyotype evolution [Wichman et al., 1991; Hamilton, 1992; Pucci et al., 2014]. The microsatellite (GATA)_n was described as the larger component of the satellite DNA Bkm (banded krait minor) and is found widely distributed within eukaryotes [Epplen et al., 1982; Singh et al., 1984; Milani and Cabral-de-Mello, 2014]. This sequence is related to molecular differentiation of sex chromosomes in a lot of vertebrates [Epplen et al., 1982, 1988; Singh et al., 1984; Nanda et al., 1990; Subramanian et al., 2003], and it is suggested that (GATA)_n repeats may have a functional meaning in the biology of sex chromosomes and speciation [Subramanian et al., 2003]. Associated with a wide distribution in eukaryotic genomes, the simple sequence repeat (GATA)_n can be used as a DNA consensus sequence for binding the tran-

Table 1. Species studied and sampling locations of 8 Parodontidae species

Species	River, state	Hydrographic basin	Males	Females	Total
<i>A. piracicabae</i>	Rio Mogi-Guaçu, SP	Alto Paraná	12	14	26
<i>A. hasemani</i>	Rio São Francisco, MG	São Francisco	8	11	19
<i>A. ibitiensis</i>	Rio Corumbataí, SP	Alto Paraná	2	3	5
<i>A. affinis</i>	Rio Passa-Cinco, SP	Alto Paraná	22	8	30
<i>Apareiodon</i> sp.	Rio Verde, PR	Alto Paraná	5	8	13
<i>P. cf. pongoensis</i>	Rio Araguaia, GO	Araguaia	11	8	19
<i>P. nasus</i>	Rio Mogi-Guaçu, SP	Alto Paraná	10	10	20
<i>P. hilarii</i>	Rio Passa-Cinco, SP	Alto Paraná	19	12	31

The species were kept at the Museu de Zoologia of Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura of Universidade Estadual de Maringá (NUPELIA) and at the Museu de Zoologia of Universidade de São Paulo (MZUSP).

SP = São Paulo state; MG = Minas Gerais state; PR = Paraná state; GO = Goiás state.

scription factor family GATA-binding proteins [Orkin et al., 1998]. Members of the GATA protein family (GATA1–6) function as lineage-specific transcription factors in a number of cell types in the hematopoietic system [Chen et al., 2012]. Yet, other studies showed expression of sex- and tissue-specific Bkm-binding proteins (BBP) in snake ovaries and mouse testes [Singh et al., 1994a]. In the latter, BBP was associated with testis-specific decondensation of the Y chromosome. This protein is different from the GATA family of transcription factors of the hematopoietic system as it binds to (GATA)_n repeats [Singh et al., 1994b]. Besides the transcription factor binding site function, Subramanian et al. [2003] reported the distribution of (GATA)_n repeats along chromosomes and their close proximity to matrix-associated regions as possible demarking chromatin domains for a coordinated expression of genes.

Another repetitive DNA, the minisatellite (TTAGGG)_n, a structural component of vertebrate telomeres, proved to be helpful in explaining certain types of chromosome rearrangements [Slijepcevic, 1998]. In fish, Ocalewicz [2013] reported that in 80 species the (TTAGGG)_n sequence was localized in situ to the telomere, and 42% presented additional telomeric hybridization signals far from the chromosome end (internal or interstitial telomeric sites, ITS). The localization of these ITS confirmed Robertsonian fusions [Rosa et al., 2012; Traldi et al., 2013; Errero Porto et al., 2014], but ITS can also be inserted in interstitial positions by telomerase or transposed to repair the ruptures in double-stranded DNA [Nergadze et al., 2007].

The neotropical fish family Parodontidae (genera *Parodon*, *Apareiodon*, and *Saccodon*) presents a conserved diploid number of 54 chromosomes with little variation in karyotype formula of most of its representatives but with

great variation of chromosome markers, showing an enormous interspecific diversity [Bellafronte et al., 2011; Schemberger et al., 2011]. Within this family, some species are homomorphic in relation to the presence of sex chromosomes, whereas other species present ZZ/ZW systems at different stages of accumulation of repetitive DNA [Schemberger et al., 2011, 2014]. Here, we report our analysis of the distribution patterns of (GATA)_n and (TTAGGG)_n repeats in different Parodontidae genomes to verify chromosome rearrangements focusing on the W chromosomes.

Material and Methods

Eight species of the Parodontidae family were analyzed (*A. piracicabae*, *A. hasemani*, *A. ibitiensis*, *Apareiodon* sp. Verde river population, *A. affinis*, *P. cf. pongoensis*, *P. nasus*, and *P. hilarii*), and their sampling locations are listed in table 1. Proceedings of animal handling were performed according to the Ethics Committee on Animal Experimentation (process number 13/2014) of the Universidade Estadual de Ponta Grossa (Brazil). Chromosome preparations were obtained by the air-drying method from renal cells [Bertollo et al., 1978] with modifications [Blanco et al., 2012].

In this study, 3 kinds of repetitive probes were used: the microsatellite (GATA)_n, the minisatellite (TTAGGG)_n, and the DNA satellite of Parodontidae pPh2004 [Vicente et al., 2003]. The pPh2004 probe was only used to facilitate the correct identification of chromosomes, since this probe has been described in other studies [Bellafronte et al., 2011; Schemberger et al., 2011]. (GATA)_n and (TTAGGG)_n expansions were synthesized by PCR. Amplification of the (GATA)_n probe was performed with primers (GATA)₇ and (TATC)₇, while the (TTAGGG)_n probe was amplified using the primers (TTAGGG)₅ and (CCCTAA)₅, both in the absence of a DNA template, according to the proposed procedure for obtaining the general sequence of the vertebrate telomere [Ijdo et al., 1991]. The amplification reaction of each DNA repeat in isolated tubes was performed using 1× Taq Reaction buffer (200 mM Tris, pH 8.4, 500 mM KCl), 40 μM dNTPs, 2 mM MgCl₂, 2 U Taq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, Calif., USA), and 0.2 μM

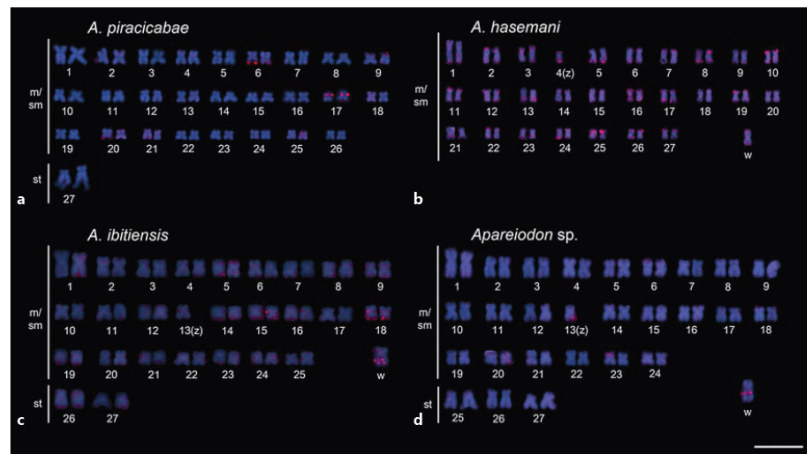


Fig. 1. FISH of female specimens of Parodontidae using the (GATA)n probe. The (GATA)n signals are shown in red (rhodamine) and the DAPI-counterstained chromosomes are shown in blue. **a** *A. piracicabae*. **b** *A. hasemani*. **c** *A. ibitiensis*. **d** *Apareiodon* sp. Scale bar = 5 μ m.

of each corresponding primer. The PCR specifications followed 2-step cycles. The first amplification was performed with low stringency: 4 min at 94°C, 12 cycles of 1 min at 94°C, 45 s at 52°C, and 90 s at 72°C. Then it was followed by 35 cycles of high stringency: 1 min at 94°C, 90 s at 60°C, and 90 s at 72°C. PCR products were confirmed by 1% agarose gel electrophoresis which showed bands of 1–2 kb. (GATA)n and (TTAGGG)n amplifications were marked with digoxigenin 11-dUTP by nick translation (Dig Nick Translation mix, Roche Applied Science, Mannheim, Germany) following the manufacturer's instructions. The satellite pPh2004 probe, contained in a vector and obtained by plasmid mini-preparation, was marked with biotin 16-dUTP by nick translation (Biotin Nick Translation mix, Roche Applied Science) according to the manufacturer's instructions.

FISH was performed under high-stringency conditions (2.5 ng/ μ l probe, 50% formamide, 2 \times SSC, 10% dextran sulfate for 18 h at 37°C) according to the method of Pinkel et al. [1986]. Signal detection was performed using an anti-streptavidin antibody conjugated to Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Carlsbad, Calif., USA) and an anti-digoxigenin antibody conjugated to rhodamine (Roche Applied Science). The chromosomes were counterstained with 0.2 μ g/ml of 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) in Vectashield mounting medium (Vector, Burlingame, Calif., USA) and analyzed using an Olympus BX41 epifluorescence microscope equipped with a DP71 digital image capture system (Olympus, Tokyo, Japan). The chromosomes were identified using the system proposed by Levan et al. [1964] and classified as metacentric (m), submetacentric (sm), or subtelocentric (st). To determine the (GATA)n and (TTAGGG)n localizations, approximately 50 metaphases of different specimens of each species were analyzed.

Results

The 8 species studied presented 2n = 54 chromosomes with differences related to the sex chromosomes. In *A. piracicabae*, heteromorphic sex chromosomes are absent, in *P. cf. pongoensis* and *P. nasus*, the presence of a protosex chromosome system (pair 13) was identified, and *A. hasemani*, *A. ibitiensis*, *Apareiodon* sp. and *P. hilarii* showed the ZZ/ZW heteromorphic system, while *A. affinis* presents the ZZ/ZW₁W₂ system (figs. 1, 2) [Schemberger et al., 2011; Bellafronte et al., 2012].

FISH with the (GATA)n probe revealed the presence of this repetitive element dispersed throughout the chromosomes, forming little clusters in some regions of the 8 species studied (figs. 1, 2). In this analysis, no significant intra- or interindividual variation of FISH signals and loci numbers were detected except for those related to sex chromosome heteromorphism. In *A. piracicabae*, besides the loci dispersed throughout the karyotype, clusters of (GATA)n could be detected in pairs 2, 6, 9, 17, 20, 21, 25, and 27 (fig. 1a). In *A. hasemani*, little clusters were detected in terminal or subterminal regions of all chromosomes, including the Z and W chromosomes (fig. 1b). In *A. ibitiensis* and *Apareiodon* sp., little clusters of (GATA)n were detected in addition to an interstitial

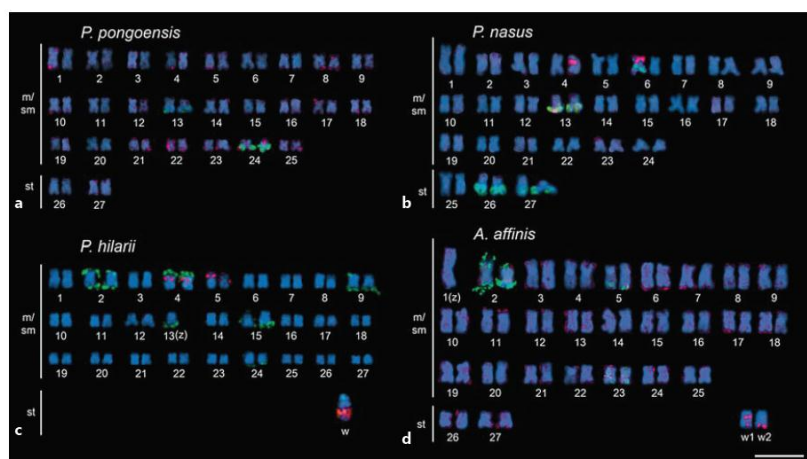


Fig. 2. FISH of female specimens of Parodontidae using the (GATA)n probe. The (GATA)n signals are shown in red (rhodamine), the probe pPh2004 in green (FITC), and the DAPI-counterstained chromosomes are shown in blue. **a** *P. pongoensis*. **b** *P. nasus*. **c** *P. hilarii*. **d** *A. affinis*. Scale bar = 5 μ m.

marking which was more evident on the long arm of the W chromosome (fig. 1c, d). *P. cf. pongoensis* and *P. nasus*, besides the signals on the autosomes, present a little cluster of (GATA)n in the terminal region of the short arm of pair 13, the proto-sex chromosomes (fig. 2a, b). *P. hilarii* presented dispersed (GATA)n loci, almost imperceptible, in the Z chromosome and the autosomes but had evident blocks in pairs 4 and 5 and in the interstitial region of the long arm of the W chromosome (fig. 2c). In *A. affinis*, the (GATA)n probe hybridized to the terminal region of autosomes and, more evident, to blocks of the W₁ and W₂ sex chromosomes (fig. 2d). The probe (TTAGGG)n detected the terminal sites in all chromosome complements with different signal intensities in the 8 species studied, and no ITS were detected in approximately 50 metaphases analyzed for each species (fig. 3).

Discussion

Molecular differentiation and gene erosion in the evolution of sex chromosomes involve the accumulation of repetitive DNAs and transposable elements (TEs) [Steinemann and Steinemann, 2005; Schemberger et al., 2014].

Although the general mechanism of sequence accumulation is well understood by visualization of the heterochromatic fraction in heteromorphic sex chromosomes, in most species there is a lack of knowledge what kind of repetitive sequences are present and what is their relation with the localization of chromatin domains and the control of gene expression [Subramanian et al., 2003].

The family Parodontidae has been used in studies of sex chromosome differentiation, investigating the invasion of repetitive sequences and the increase in W chromosome size [Centofante et al., 2002; Rosa et al., 2006; Vicari et al., 2006; Bellafronte et al., 2009, 2011, 2012; Schemberger et al., 2011, 2014]. In this study, in situ localization of the (GATA)n sequence revealed the accumulation of this microsatellite in proto-sex and sex chromosomes of 7 species: *A. hasemani*, *A. ibitiensis*, *Apareiodon* sp., *P. hilarii*, *A. affinis*, *P. cf. pongoensis*, and *P. nasus*. The (GATA)n signals were compared with C-banding descriptions of these species [Bellafronte et al., 2011]. The autosomal (GATA)n accumulation sites cannot be correlated to heterochromatic regions, except to some minor terminal regions. On the other hand, the (GATA)n signals on the Z and W chromosomes are located in heterochromatic blocks. For *A. piracicabae*, which does not have hetero-

morphic sex chromosomes, dispersion of this sequence throughout several chromosomes of the complement without a preferential allocation to specific sites cannot indicate a probable proto-sex chromosomes pair. In another study, the localization of these simple repetitions has allowed the detection of molecular and structural differences between sex chromosomes apparently homomorphic in *Poecilia reticulata* [Nanda et al., 1990].

Chromosome painting with the heterochromatic fraction of the W chromosome of *Apareiodon* sp., named *WAp* probe, in combination with the DNA satellite *pPh2004* probe, established pair 13 as the proto-sex chromosome pair in *P. pongoensis* and *P. nasus* [Schemberger et al., 2011]. In these 2 species, the localization of the (GATA)_n repeat showed a small cluster in the heterochromatic region of the short arm of pair 13. This little cluster is also present in the heterochromatic region of the Z chromosome of species that have sex chromosome heteromorphism. On the other hand, the (GATA)_n repeat accumulates increasingly in the W chromosome in species with sex chromosomes. Within the species studied, *A. hasemani* has a W chromosome with lower molecular differentiation, with heterochromatic bands in the short arm and the terminal region of the long arm [Bellafronte et al., 2012].

The localization of the (GATA)_n sequence in terminal regions of both arms of the W chromosome shows the presence of this DNA microsatellite in the beginning of differentiation and heteromorphism of the W chromosome. Yet, the accumulation of (GATA)_n is evident in species that have bigger W chromosomes and hence more molecular differentiation (*A. ibitiensis*, *Apareiodon* sp., *P. hilarii*) and in *W*₁ and *W*₂ chromosomes of the multiple sex chromosome system of *A. affinis*. In a similar example in the *Poecilia* genus, the size of the heterochromatic region of the Y chromosome differs markedly among strains and correlates with the total length of the respective Y, which may be attributed to differential amplification or deletion of constitutive heterochromatin. Yet, it was suggested that sex chromosome-linked color patterns and other sexually selected genes in *Poecilia* are important for maintaining the observed structural polymorphism of sex chromosomes [Nanda et al., 2014].

In some fish species, studies with (GATA)_n repeats showed a dispersed localization throughout the chromosomes without any kind of preferential accumulation [Cross et al., 2006; Úbeda-Manzanaro et al., 2010; Traldi et al., 2013]. Although some (GATA)_n clusters were detected in chromosomes of Parodontidae, especially in the sex chromosomes, an extensive number of dispersed cop-

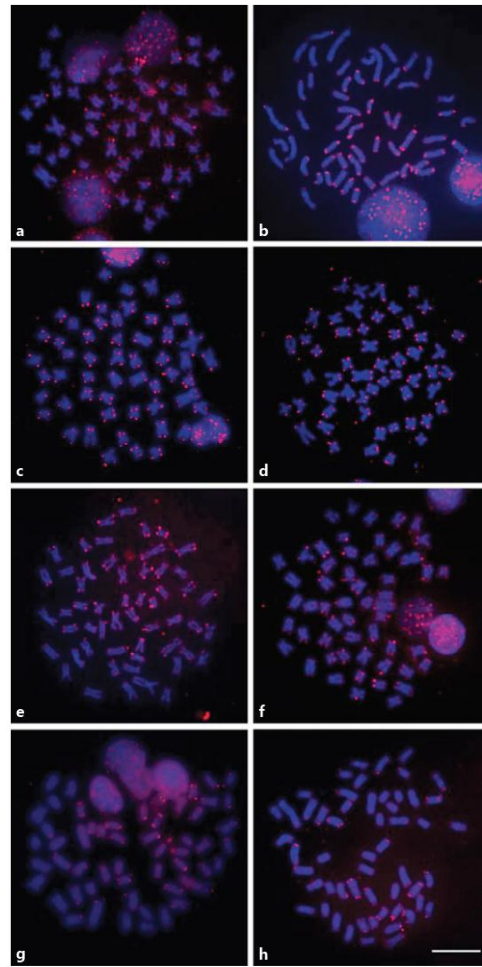


Fig. 3. FISH of metaphases of female specimens of Parodontidae using the (TTAGGG)_n probe labeled in red (rhodamine). **a** *A. piracicabae*. **b** *A. hasemani*. **c** *A. ibitiensis*. **d** *Apareiodon* sp. **e** *P. pongoensis*. **f** *P. nasus*. **g** *P. hilarii*. **h** *A. affinis*. Scale bar = 5 μm.

ies in the karyotype is evident. It is known that microsatellite repeats are often present in the sequences of TEs or interspersed non-repetitive DNA sequences [Schäfer et al., 1986; Coates et al., 2009]. In this process, the dispersed

copies of (GATA) n in Parodontidae may be the consequence of transposable events when tandem repeats hitchhike within mobile elements, as seen in other organisms [Wilder and Hollocher, 2001; López-Giráldez et al., 2006; Coates et al., 2009]. However, dispersion of the (GATA) n sequence in euchromatic regions of Parodontidae autosomes could be intergenic, suggesting that they may possess, in association with the matrix-associated region, a function to regulate the entire domain defined by these sequences, as proposed for humans [Subramanian et al., 2003]. (GATA) n is the main part of the DNA consensus sequence to bind the transcription factor family (GATA1–6), acting in cells of the hematopoietic system [Chen et al., 2012].

In some species, the major concentration of (GATA) n in sex chromosomes was related to the activity of chromatin decondensation [Singh et al., 1994a; Viger et al., 1998; Priyadarshini et al., 2003]. In snakes and mice, BBP activity was reported to be at its peak by the onset of spermatogenesis and oocyte development, corresponding to the decondensation of W and Y chromosomes, respectively [Singh et al., 1994a]. GATA-4, another member of the same family of transcription factors present in the gonads of the mouse and specifically expressed in Sertoli cells in testes and granulosa cells in the ovaries, has been assumed to be involved in early gonadal development and sexual dimorphism [Viger et al., 1998]. Also, in the sea snake *Enhydrina schistosa*, where the W chromosome is divided in 2 separate parts, W_1 and W_2 , both decondense simultaneously [Singh et al., 1979], indicating their common regulation. *A. affinis* also presented (GATA) n sequences in W_1 and W_2 chromosomes as a possible function in sexual development of Parodontidae.

Most Parodontidae species keep $2n = 54$ chromosomes with a little variation in the karyotypic formula: $54 m/ms$ to $48 m/ms + 6 st$ [Bellafronte et al., 2011]. In this context, Schemberger et al. [2011] inferred that chromosome variation in the family Parodontidae is mostly due to the movement of DNA satellite sequences and TEs. The presence of ITS in fusion points and/or translocations is an event relatively common in fish [Ocalewicz, 2013]. In numerous events of chromosome rearrangements, telomeres can be completely lost or in low copy numbers [Slijepcevic, 1998]. The localization of the probe (TTAGGG) n only in terminal portions of chromosomes in 8 Parodontidae species suggests the absence of fusions and translocations in karyotypic evolution of this family, reinforcing the viability of the proposition of Schemberger et al. [2011]. In *A. affinis*, the origin of multiple ZZ/ZW $_1$ W $_2$ sex chromosome systems is assigned to chromosome fissions and

pericentric inversions or chromosome translocations [Moreira-Filho et al., 1980; Schemberger et al., 2011]. Even in this species, there is no evidence of ITS which indicates non-homologous chromosome exchange.

On the other hand, Schemberger et al. [2014] isolated a C_0t-1 library for repetitive DNA in Parodontidae and verified a great amount of satellite and TE repetitive sequences, including those related to molecular degeneration of the W chromosome. These data show that the pseudo-autosomal region of the W chromosome is composed of the long arm of the Z chromosome and the short arm of the W chromosome, which harbors the DNA satellite pPh2004 in the genus *Parodon*. In the female-specific region (FSR) of the Parodontidae W chromosome, there is an accumulation of satellite and TE sequences that are not exclusive to sex chromosomes. The expansion of (GATA) n identified in this study is located in an interstitial region of the FSR. The proximal region of FSR is composed of a DNA satellite (sat1WP). In the terminal region, an extensive amount of TE Helitron was verified and, in its whole extension, the FSR is invaded by degenerated TEs of different classes [Schemberger et al., 2014]. Thus, molecular differentiation and erosion of genetic activity of the W chromosome in Parodontidae occurred by accumulation of repetitive sequences of different kinds and classes, which may form domains in the chromatin and have a relation to the expression control of genes present in sex chromosomes and sexual determination.

Thus, this study shows the in situ localization of (GATA) n and (TTAGGG) n expansions in Parodontidae, in which there is chromosome diversification associated with the movement of repetitive sequences in the genome. These data, when compared to the literature, provide indirect evidence that the (GATA) n repeat is associated with chromatin modifications in the W chromosome of Parodontidae which can be related to the control of gene expression and sexual determination.

Acknowledgements

The authors are grateful to the Ministério do Meio Ambiente/ Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA/MMA/SISBIO No. 15117) for the authorization to collect the biological samples. This study was financed by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Secretaria de Ciência e Tecnologia do Estado do Paraná (SETI), and Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná (Fundação Araucária).

References

- Bellafronte E, Vicari MR, Artoni RF, Margarido VP, Moreira-Filho O: Differentiated ZZ/ZW sex chromosomes in *Apareiodon ibitiensis* (Teleostei, Parodontidae): cytotaxonomy and biogeography. *J Fish Biol* 75: 2313–2325 (2009).
- Bellafronte E, Schemberger MO, Moreira-Filho O, Almeida MC, Artoni RF, et al: Chromosomal markers in Parodontidae: an analysis of new and reviewed data with phylogenetic inferences. *Rev Fish Biol Fish* 21: 559–570 (2011).
- Bellafronte E, Schemberger MO, Artoni RF, Moreira-Filho O, Vicari MR: Sex chromosome system ZZ/ZW in *Apareiodon hasemani* Eigenmann, 1916 (Characiformes, Parodontidae) and a derived chromosomal region. *Genet Mol Biol* 35: 770–776 (2012).
- Bertollo LA, Takahashi CS, Moreira-Filho O: Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Braz J Genet* 1: 351–357 (1978).
- Blanco DR, Bertollo LA, Vicari MR, Margarido VP, Artoni RF, Moreira-Filho O: A new technique for obtaining mitotic chromosome spreads from fishes in the field. *J Fish Biol* 81: 351–357 (2012).
- Centofante L, Bertollo LA, Moreira-Filho O: ZZ/ZW sex chromosome system in new species of the genus *Parodon* (Pisces, Parodontidae). *Caryologia* 54: 139–150 (2002).
- Chen Y, Bates DL, Dey R, Chen PH, Machado AC, et al: DNA binding by GATA transcription factor suggests mechanisms of DNA looping and long-range gene regulation. *Cell Rep* 2: 1197–1206 (2012).
- Coates BS, Sumerford DV, Hellmich II RL, Lewis LC: Repetitive genomic elements in a European corn borer, *Ostrinia nubilalis*, bacterial artificial chromosome library were indicated by bacterial artificial chromosome end sequencing and development of sequence tag site markers: implications for Lepidopteran genomic research. *Genome* 52: 57–67 (2009).
- Cross I, Merlo A, Manchado M, Infante C, Cañavate JP, Rebordinos L: Cytogenetic characterization of the *Solea senegalensis* (Teleostei: Pleurenctiformes: Soleidae): Ag-NOR, (GATA)_n, (TTAGGG)_n and ribosomal genes by one-color and two-color FISH. *Genetica* 128: 253–259 (2006).
- Epplen JT, McCarey JR, Sutou S, Ohno S: Base sequence of a cloned snake W-chromosome DNA fragment and identification of a male-specific putative mRNA in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 3798–3802 (1982).
- Epplen JT, Studer R, McLaren A: Heterogeneity in the *SXR* (sex-reversal) locus of the mouse as revealed by synthetic GAA probes. *Genet Res* 51: 239–246 (1988).
- Errero Porto F, de Rossi Vieira MM, Barbosa LM, Borin-Carvalho LA, Vicari MR, et al: Chromosomal polymorphism in *Rineloricaria lanceolata* Günther, 1868 (Loricariidae: Loricariinae) of the Paraguay basin (Mato Grosso do Sul, Brazil): evidence of fusions and their consequences in the population. *Zebrafish* 11: 318–324 (2014).
- Hamilton MJ, Hong GH, Wichman A: Intragenomic movement and concerted evolution of satellite DNA in *Peromyscus*: evidence from in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 60: 40–44 (1992).
- Ijdo JW, Wells RA, Baldini A, Reeders ST: Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)_n generated by PCR. *Nucl Acids Res* 19: 4780 (1991).
- Levan A, Fredga K, Sandberg AA: Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201–220 (1964).
- López-Giráldez F, Andres O, Domingo-Roura X, Bosch M: Analysis of carnivore microsatellites and their intimate association with tRNA-derived SINEs. *BMC Genomics* 7: 269 (2006).
- Milani D, Cabral-de-Mello DC: Microsatellite organization in the grasshopper *Abracris flavolineata* (Orthoptera: Acrididae) revealed by FISH mapping: remarkable spreading in the A and B chromosomes. *PLoS One* 9: e97956 (2014).
- Moreira-Filho O, Bertollo LA, Galetti PM Jr: Evidences for a multiple sex chromosome system with female heterogamety in *Apareiodon affinis* (Pisces, Parodontidae). *Caryologia* 33: 83–91 (1980).
- Nanda I, Feichtinger W, Schmid M, Schröder JH, Zischler H, Epplen JT: Simple repetitive sequences are associated with the differentiation of the sex chromosomes in the guppy fish. *J Mol Evol* 30: 456–462 (1990).
- Nanda I, Schories S, Tripathi N, Dreyer C, Haaf T, et al: Sex chromosome polymorphism in guppies. *Chromosoma* 123: 373–383 (2014).
- Nergadze SG, Santagostino MA, Salzano A, Mondello C, Giulotto E: Contribution of telomerase RNA retrotranscription to DNA double-strand break repair during mammalian genome evolution. *Genome Biol* 8: R260 (2007).
- Ocalewicz K: Telomeres in Fishes. *Cytogenet Genome Res* 141: 114–125 (2013).
- Orkin SH, Shivdasani RA, Fujiwara Y, McDevitt MA: Transcription factor GATA-1 in megakaryocyte development. *Stem Cells* 16: 79–83 (1998).
- Pinkel D, Straume T, Gray JW: Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 2934–2938 (1986).
- Priyadarshini P, Murthy BS, Nagaraju J, Singh L: GATA-binding protein expressed predominantly in the pupal ovary of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem Mol Biol* 33: 185–95 (2003).
- Pucci MB, Barbosa P, Nogaroto V, Almeida MC, Artoni RF, et al: Population differentiation and speciation in the genus *Characidium* (Characiformes: Crenuchidae): effects of reproductive and chromosomal barriers. *Biol J Linn Soc* 111: 541–553 (2014).
- Rosa KO, Ziemniczak K, Barros AV, Nogaroto V, Almeida MC, et al: Numeric and structural chromosome polymorphism in *Rineloricaria lima* (Siluriformes: Loricariidae): fusion points carrying 5S rDNA or telomere sequence vestiges. *Rev Fish Biol Fish* 22: 739–749 (2012).
- Rosa R, Bellafronte E, Moreira-Filho O, Margarido VP: Description of the ZZ/ZW sex chromosome system and localization of 5S and 18S rDNA genes in *Apareiodon* sp. (Pisces, Characiformes, Parodontidae). *Genetica* 128: 159–166 (2006).
- Schäfer R, Ali S, Epplen JT: The organization of the evolutionarily conserved GATA/GACA repeats in the mouse genome. *Chromosoma* 93: 502–510 (1986).
- Schemberger MO, Bellafronte E, Nogaroto V, Almeida MC, Schühli GS, et al: Differentiation of repetitive DNA sites and sex chromosome systems reveal closely related group in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes). *Genetica* 139: 1499–1508 (2011).
- Schemberger MO, Oliveira JI, Nogaroto V, Almeida MC, Artoni RF, et al: Construction and characterization of a repetitive DNA library in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes): a genomic and evolutionary approach to the degeneration of the W sex chromosome. *Zebrafish* 11: 518–527 (2014).
- Singh L, Purdom IF, Jones KW: Behaviour of sex chromosome associated satellite DNA in somatic and germ cells in snakes. *Chromosoma* 71: 167–181 (1979).
- Singh L, Phillips C, Jones KW: The conserved nucleotide sequences of Bkm, which define *Sxr* in the mouse, are transcribed. *Cell* 36: 111–120 (1984).
- Singh L, Wadhwa R, Naidu S, Nagaraj R, Ganesan M: Sex- and tissue-specific Bkm (GATA)-binding protein in the germ cells of heterogametic sex. *J Biol Chem* 269: 25321–25327 (1994a).
- Singh L, Panicker SG, Nagaraj R, Majumdar KC: Banded krait minor-satellite (Bkm)-associated Y-chromosome specific repetitive DNA in mouse. *Nucleic Acids Res* 22: 2289–2295 (1994b).
- Slijepcevic P: Telomeres and mechanisms of Robertsonian fusions. *Chromosoma* 107: 136–140 (1998).
- Steinemann S, Steinemann M: Retroelements: tools for sex chromosome evolution. *Cytogenet Genome Res* 110: 134–143 (2005).

- Subramanian S, Mishra RK, Singh L: Genome-wide analysis of Bkm sequences (GATA repeats): predominant association with sex chromosomes and potential role in higher order chromatin organization and function. *Bioinformatics* 19: 681–685 (2003).
- Sumner AT: Chromosomes: Organization and Function, pp 57–69 (Blackwell Science Ltd., Malden 2003).
- Timberlake WE: Low repetitive DNA content in *Aspergillus nidulans*. *Science* 202: 973–975 (1978).
- Traldi JB, Blanco DR, Vicari MR, Martinez JD, Lui RL, et al: Physical mapping of (GATA)_n and (TTAGGG)_n sequences in species of *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae). *J Genet* 92: 127–130 (2013).
- Úbeda-Manzanaro M, Merlo MA, Palazón JL, Cross I, Sarasquete C, Rebordinos L: Chromosomal mapping of the major and minor ribosomal genes, (GATA)_n and U2 snRNA gene by double-colour FISH in species of the Batrachoididae family. *Genetica* 138: 787–794 (2010).
- Vicari MR, Moreira-Filho O, Artoni RF, Bertollo LA: ZZ/ZW sex chromosome system in an undescribed species of the genus *Apareiodon* (Characiformes, Parodontidae). *Cytogenet Genome Res* 114: 163–168 (2006).
- Vicente VE, Bertollo LA, Valentini SR, Moreira-Filho O: Origin and differentiation of sex chromosome system in *Parodon hilarii* (Pisces, Parodontidae). Satellite DNA, G and C-banding. *Genetica* 119: 115–120 (2003).
- Viger RS, Mertineit C, Trasler JM, Nemer M: Transcription factor GATA 4 is expressed in a sexually dimorphic pattern during mouse gonadal development and is a potent activator of the MIS promoter. *Development* 125: 2665–2675 (1998).
- Wichman HA, Payne CT, Ryder OA, Hamilton MJ, Maltbie M, Baker RJ: Genomic distribution of heterochromatic sequences in equids: implications to rapid chromosomal evolution. *J Hered* 82: 369–377 (1991).
- Wilder J, Hollocher H: Mobile elements and the genesis of microsatellites in dipterans. *Mol Biol Evol* 18: 384–392 (2001).