

Universidade de São Paulo
Instituto de Biociências
Departamento de Genética e Biologia Evolutiva

Felippe Lourenço Claro

GYMNOTUS CARAPO E *GYMNOTUS SYLVIUS* (TELEOSTEI:
GYMNOTIDAE): UMA ABORDAGEM CITOGENÉTICO-
MOLECULAR.

São Paulo

2008

Felippe Lourenço Claro

GYMNOTUS CARAPO E *GYMNOTUS SYLVIUS* (TELEOSTEI:
GYMNOTIDAE): UMA ABORDAGEM CITOGENÉTICO-
MOLECULAR.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo,
para a obtenção de Título de Mestre em
Ciências, na Área de Genética e Biologia
Evolutiva.

Orientador(a): Lurdes Foresti de Almeida
Toledo

São Paulo
2008

Ficha Catalográfica

Claro, Felipe Lourenço

Gymnotus Carapo e *Gymnotus Sylvius* (Teleostei: Gymnotidae): Uma Abordagem Citogenético-Molecular.

97p.

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

1. Fusão Cromossômica 2. DNA repetitivo 3. DNA ribossômico 4. Heterocromatina 5. *Gymnotus*

I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Profª. Dra. Lurdes Foresti de Almeida Toledo
Orientadora

A uma pessoa que sempre esteve ao meu lado e que como eu sempre sonhou com esse momento.

Vó, essa é para você.

Só existem dois dias do ano em que nada pode ser feito,
o dia de ontem e o dia de amanhã
Portanto hoje é o dia certo
Sonhe, acredite e principalmente FAÇA.

Dalai Lama

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à FAPESP, ao CNPq e à CAPES pelo apoio financeiro, fundamental para o desenvolvimento do projeto de pesquisa.

À Prof^a. Lurdes Foresti de Almeida Toledo agradeço pelo estímulo à pesquisa, pela amizade e pelos grandes momentos que já passamos juntos nesses anos de trabalho.

A meus pais, minha tia, meu avô, minha avó (*in memorian*), meu irmão Juliano e a todos os membros de minha família, que direta ou indiretamente torceram e vivenciaram junto comigo essa incrível jornada de amadurecimento pessoal e intelectual.

À Ly, pelas incontáveis palavras de apoio, por me ouvir, me ajudar, me incentivar e por estar sempre ao meu lado. Não há nada que traduza melhor aquilo que posso te dizer agora do que, te amo.

À Vânia, Mari, Carol, Keila, Raquel e Pupis, nossa, quantas histórias pra contar hein?! Sem dúvida vivemos momentos inesquecíveis, os quais ficarão para sempre gravados em meu coração.

Ao nosso técnico Carlos, agradeço por todo o conhecimento que adquiri nesses anos de trabalho e que me dão a certeza de que ainda tenho muito a aprender.

À Susy, técnica do laboratório da Prof^a. Cris Arias agradeço por todos os conhecimentos que adquiri com você sobre Biologia Molecular.

À Toninha, técnica do laboratório da Prof^a. Mayana Zatz, agradeço pela grande ajuda na reta final de meu trabalho.

Aos professores, Alberto Ribeiro, Yatiyo Yassuda, Cris Miyaki, Cris Arias, Eduardo Gorab, Célia Koiffmann, Mayana Zatz, Ângela Morgante, Luciana Haddad e Eliana Dessen que direta ou indiretamente contribuíram com meu trabalho.

Às funcionárias do Departamento, Helenice, Deyse, Susi, Luzia e Genoveva, com as quais tive o prazer de conviver durante esse período.

Aos amigos do departamento, Marta, Waldir, Márcio, Valdir, Alayne, Alisson, Pedro Henrique, Chris, Christiane, Marcinha, Thiago, Andressa, Erica, Monize e Artur que de algum modo, me auxiliaram em meu trabalho.

Índice

Capítulo I – Introdução	9
<i>Abstract/Resumo</i>	9
1.1 Introdução	11
1.2 O Gênero <i>Gymnotus</i>	13
1.3 Objetivos	17
Capítulo II – Bandas R e Hibridação de Seqüências Teloméricas na detecção de Homeologias Cromossômicas	19
<i>Abstract/Resumo</i>	19
2.1 Introdução	20
2.2 Materiais e Métodos	21
2.3 Resultados	23
2.4 Discussão	28
Capítulo III – Hibridação <i>in situ</i> de Genes Ribossômicos 18S e 5S e Caracterização de Espaçador Não Transcrito (NTS) associado a região do gene ribossômico 5S	30
<i>Abstract/Resumo</i>	30
3.1 Introdução	31
3.2 Materiais e Métodos	33
3.3 Resultados	36
3.4 Discussão	42
Capítulo IV – Seqüências Repetitivas nas espécies <i>G. carapo</i> e <i>G. sylvius</i> e sua relação com a Heterocromatina	44
<i>Abstract/Resumo</i>	44
4.1 Introdução	46
4.2 Materiais e Métodos	48
4.3 Resultados	54
4.4 Discussão	81

Capítulo V – Considerações Finais

86

Referências Bibliográficas

89

Capítulo I

Introdução

ABSTRACT

Fishes present a great diversity in relation to their morphology, habitat and biology. They are found in lakes, rivers, estuaries and oceans, comprising more than 50% of the total number of known vertebrates. Cytogenetic and molecular aspects of the fish fauna have been extensively studied, providing information about their chromosomal relationships and also about the systematic status of several groups. These researches have focused on the description of both chromosomal number and formula as well as the presence of differentiated sex chromosomes, occurrence of B-chromosomes, patterns of heterochromatin distribution, localization of nucleolar organizer regions, restriction or replication banding profiles allowing to locate distinct classes of repetitive DNAs and to identify chromosomal homeologies in order to understand the karyotypic evolution in distinct groups. On the other hand, molecular studies have become of utmost importance in this group, providing essential data about phylogeny of many groups and about repetitive DNA regions and their role in the genome. The union between this approach and cytogenetics has favored a better comprehension about the evolutionary processes associated with visible alterations in specific sequences within the genome at both chromosomal and molecular levels. The genus *Gymnotus* is composed of representatives with peculiar biological features, which turn them suitable for studies in a variety of biology approaches. Genetic studies in this genus comprise karyotype characterization, analysis of polymorphic NORs, besides studies of molecular markers that, coupled with cytogenetics, have fostered molecular phylogenetic analyzes with inferences on their chromosomal evolution, which have led to a better understanding about the interrelationships in the group. In the present work, we carried out studies about the heterochromatic regions and the repetitive DNAs in this group for a better comprehension about the organization and localization of these sequences in the genome and identification

of potential molecular markers. Furthermore, studies related to the karyotype evolution in the species *G. carapo* and *G. sylvius*, location of ribosomal genes and molecular analysis of both 5S ribosomal gene and its non-transcribed spacer were performed to provide a better comprehension about the evolution of this gene family in *Gymnotus*.

RESUMO

Os peixes apresentam uma grande diversidade quanto a sua morfologia, seus habitats e também sua biologia. São encontrados em lagos, córregos, estuários e oceanos, constituindo assim mais de 50% do número total das espécies de vertebrados conhecidas atualmente. Essa fauna tem sido objeto de um número expressivo de estudos citogenéticos e moleculares, tendo-se já conhecimento não só das relações cromossômicas, mas também da sistemática de vários grupos. Essas pesquisas têm investigado não somente o número e fórmula cromossômica, mas também a presença de cromossomos sexuais diferenciados, presença de cromossomos supranumerários, padrões de distribuição da heterocromatina, localização das regiões organizadoras de nucléolo, padrões de bandamento de restrição e replicação, permitindo a localização de diferentes classes de DNAs repetitivos, bem como a identificação de homeologias cromossômicas que auxiliam a compreensão da evolução cariotípica dos grupos. Os estudos moleculares, por sua vez, têm se tornado cada vez mais importantes nesse grupo e têm fornecido dados fundamentais não só no que diz respeito à filogenia dos grupos, como também em relação a regiões repetitivas do DNA e sua importância no genoma. A união dessa área com a Citogenética tem permitido uma maior e melhor compreensão sobre os processos evolutivos associados às alterações de seqüências específicas do genoma visíveis tanto a níveis cromossômicos, quanto moleculares. O gênero *Gymnotus* (Teleostei: Gymnotiformes) inclui representantes com características biológicas peculiares, o que os torna objeto de estudo de diversas áreas da Biologia. Estudos sobre o gênero incluem sua caracterização cariotípica, estudo das regiões organizadoras de nucléolo (RONs) polimórficas, bem como estudos envolvendo marcadores moleculares, os quais conjuntamente com a Citogenética permitiram a análise de filogenética molecular, com inferência na evolução cromossômica, permitindo uma melhor compreensão das relações dentro do gênero. No presente trabalho foram levados a

efeito estudos sobre as regiões heterocromáticas e os DNAs repetitivos desse grupo, para uma melhor compreensão da organização e localização dessas seqüências no genoma e a identificação de possíveis marcadores moleculares. Foram efetuados ainda, estudos envolvendo a evolução cariotípica das espécies *G. carapo* e *G. sylvius*, localização de genes ribossômicos e análise molecular do gene ribossômico 5S juntamente com seu espaçador não transcrito, propiciando uma melhor compreensão da evolução dessa família gênica em *Gymnotus*.

1.1 Introdução

Os peixes apresentam uma grande diversidade quanto a sua morfologia, seus habitats e também sua biologia. São encontrados em lagos, córregos, estuários e oceanos, constituindo assim mais de 50% do número total das aproximadamente 54.711 espécies de vertebrados conhecidas atualmente (Nelson, 2006).

BRUM (1994) mostra que, considerando todos os ambientes aquáticos do planeta, estima-se que existam cerca de 23.000 espécies de peixes, das quais 15.000 espécies pertenceriam à fauna de peixes marinhos enquanto que aproximadamente 8.000 pertenceriam à fauna de peixes de água doce. Recentemente, NELSON (2006) estima em 27.977 o número de espécies válidas de peixes descritas e, REIS (2003), afirma que a fauna de água doce da região neotropical é a maior do planeta, tendo já sido descobertas 4475 espécies. Essa fauna tem sido objeto de um número expressivo de estudos citogenéticos e moleculares, tendo-se já conhecimento não só das relações cromossômicas de vários grupos, mas também de sua sistemática.

Os estudos citogenéticos em espécies de peixes neotropicais tiveram um grande desenvolvimento nos vinte últimos anos, principalmente no Brasil. Essas pesquisas têm investigado não somente o número e fórmula cromossômica, mas também a presença de

cromossomos sexuais diferenciados, presença de cromossomos supranumerários, padrões de distribuição da heterocromatina e localização das regiões organizadoras de nucléolo. Recentemente foram descritos padrões de bandamentos de restrição que permitiram além uma melhor compreensão das classes de heterocromatina (Maistro *et al.*, 2001), atuaram como indicativo da existência de diferentes classes de DNAs altamente repetitivos (Cau *et al.*, 1992). Os bandamentos de replicação por sua vez têm sido fundamentais neste estudo, apesar da dificuldade da obtenção de padrões claros, pois eles têm possibilitado a visualização de homeologias cromossômicas, bem como a identificação de fusões/fissões fornecendo assim, evidências sobre a evolução cromossômica em espécies próximas (Daniel-Silva & Almeida Toledo, 2005).

Os estudos moleculares, por sua vez, têm se tornado cada vez mais, importantes, e têm fornecido dados fundamentais não só no que diz respeito à filogenia dos grupos. A associação desses estudos com a Citogenética tem permitido uma maior e melhor compreensão sobre os processos evolutivos que estão associados às alterações visíveis tanto a níveis cromossômicos, quanto moleculares, de seqüências específicas do genoma. O DNA repetitivo apresenta-se então, como um marcador molecular e cromossômico importante, uma vez que a utilização de diversas técnicas e abordagens tem fornecido uma gama de informações que têm ajudado a elucidar o papel evolutivo e estrutural dessa porção do genoma dos eucariotos (Andreato, 2002). Em alguns casos, como ocorre com o DNA ribossômico e algumas seqüências não transcritas, seqüências têm sido utilizadas como excelentes marcadores citológico-moleculares, tanto para a identificação de espécies, como para estudos evolutivos (Wasko *et al.*, 2001). Por outro lado, um dos principais focos do estudo do DNA repetitivo atualmente envolve seqüências que possam estar diretamente

associadas a regiões heterocromáticas, as quais podem atuar, por exemplo, na diferenciação de cromossomos sexuais heteromórficos (Parise-Maltempi *et al.*, 2007).

1.2 O Gênero *Gymnotus*

Pertencente à família Gymnotidae, ordem Gymnotiformes, o gênero *Gymnotus* compreende espécies com características biológicas peculiares, que tornam os representantes desse gênero objetos de estudo em diversas áreas da Biologia, com destaque para as áreas de Genética (Almeida-Toledo, 1978), Ecologia (Westby, 1975) e Fisiologia (Bennet & Grundfest, 1959). Os animais pertencentes a esse gênero caracterizam-se por possuírem escamas ciclóides, boca superior, maxila inferior conspícua, ausência das nadadeiras dorsal, pélvica, adiposa e caudal; possuem a nadadeira anal com base alongada e composta de mais de 200 raios, utilizada na locomoção primária, diferindo da maioria dos peixes, e são fracamente elétricos (Fig. 1.1). Possuem hábitos noturnos, permanecendo escondidos durante o dia entre raízes, pedras e locas nas margens dos rios e córregos, comumente, de águas turvas. São animais territoriais e agressivos, e possuem um regime alimentar onívoro. O gênero apresenta a mais ampla distribuição dentro da ordem Gymnotiformes (Fig. 1.2), incluindo animais presentes desde a América do Sul, Rio La Plata na Argentina (35° S) até a América do Norte, nas imediações do México no Rio San Nicholas em Chiapas (18° N), sendo especialmente abundante na região amazônica (Maggo-Leccia, 1994). O gênero *Gymnotus* inclui 18 espécies válidas comumente conhecidas como sarapó, representando o gênero mais diverso dentre os Gymnotiformes. As relações filogenéticas com relação ao gênero *Gymnotus* ainda são pouco compreendidas nos níveis de diversidade e variação intraespecífica. Quanto à caracterização citogenética, *G. sylvius* apresenta $2n=40$ cromossomos, *G. inaequilabiatus* e *G. pantherinus* $2n=52$ e *G.*

carapo $2n=54$, evidenciando uma variação significativa no número cromossômico das espécies, aliado a um elevado grau de conservação cariotípica (Fernandes-Matioli, *et al.*, 1998).

Os trabalhos referentes ao gênero *Gymnotus*, abordaram inicialmente a Citogenética do grupo, envolvendo a caracterização cariotípica da espécie *G. carapo* (Foresti *et al.*, 1984), bem como um estudo sobre o polimorfismo das regiões organizadoras de nucléolo em três famílias da ordem Gymnotiformes, dentre as quais a família Gymnotidae (Foresti *et al.*, 1981), sendo ambos os trabalhos bases fundamentais para estudos futuros no gênero *Gymnotus*. Posteriormente, um estudo envolvendo diversas espécies do gênero foi levado a efeito, permitindo a verificação de um elevado grau de conservadorismo intra-específico quanto ao padrão de bandas C (Fernandes-Matioli & Almeida-Toledo, 1996) bem como um estudo detalhado sobre o polimorfismo das RONS (Fernandes-Matioli, *et al.*, 1997). Nesse último, foram identificados três tipos distintos de RONS, encontradas em cinco combinações diferentes, o que permitiu identificar na espécie *G. carapo*, um padrão de ocorrência ainda não encontrado em peixes. Análises em diferentes espécies do gênero *Gymnotus*, utilizando marcadores moleculares, foram também levadas a efeito, com o intuito de trazer maiores esclarecimentos em relação à filogenia, até então pouco clara, ou por vezes, mal interpretada quando apoiada apenas nos dados citogenéticos. Tal abordagem permitiu que Fernandes-Matioli (1999) descrevesse, com o auxílio de dados moleculares associados a dados morfométricos, uma nova espécie de *Gymnotus*, *G. sylvius*, bem como desenvolvesse estudos envolvendo a diversidade e distribuição geográfica das espécies (Fernandes-Matioli, *et al.*, 2000). Posteriormente, uma análise conjunta dos dados citogenéticos e os dados moleculares permitiram uma análise filogenética molecular, com inferências sobre a evolução cromossômica do grupo (Fernandes-Matioli *et al.*, 2001),

fornecendo assim dados importantes para a compreensão das relações dentro do gênero *Gymnotus*.

No presente estudo, foi efetuada a análise do padrão de bandas R juntamente com a hibridação de seqüências teloméricas, com o objetivo de identificar evidências de rearranjos cromossômicos e, portanto, possíveis eventos de evolução cromossômica no gênero *Gymnotus*. Paralelamente às análises citogenéticas, foi efetuado o isolamento de DNAs satélites e sua subsequente localização cromossômica, o que permitiu um melhor entendimento de seu papel estrutural. Esses dados podem, adicionalmente, auxiliar na construção de mapas genômicos das espécies analisadas e o estabelecimento ou corroboração de relações filogenéticas, através da detecção de marcadores cromossômicos específicos (Oliveira & Wright, 1998; Andreato, 2002). De modo análogo, a análise molecular do gene ribossômico 5S deve garantir novos dados que poderão fornecer marcadores para as espécies, permitindo ainda uma melhor compreensão da evolução dessa família gênica no gênero *Gymnotus*.

A coleta dos exemplares foi feita nas principais bacias do Estado de São Paulo (Fig. 1.3) e a abordagem utilizada não identificou variação entre as populações.



Figura 1.1: Exemplos do gênero *Gymnotus*. a) *G. carapo* b) *G. sylvius*.



Figura 1.2: Mapa evidenciando ampla distribuição dos Gymnotiformes nas Américas do Sul e Central (Albert & Campos-da-Paz, 1998).



Figura 1.3: Mapa evidenciando pontos de coleta no Estado de São Paulo.

1.3 Objetivos

O presente trabalho visa ao estabelecimento de possíveis homeologias cromossômicas entre *Gymnotus carapo* e *Gymnotus sylvius* e à identificação de possíveis regiões marcadoras nos cromossomos dessas espécies. Esse estudo compreende: obtenção de bandas R; a caracterização de possíveis marcadores cromossômicos para as espécies, utilizando o DNA satélite e o espaçador não transcrito do gene ribossômico 5S.

São objetivos específicos do projeto:

- ✓ Aplicação do Bandamento R juntamente com a hibridação *in situ* de seqüências teloméricas para verificação de possíveis rearranjos cromossômicos (Capítulo 2);
- ✓ Localização de seqüências de DNA ribossômico 5S e 18S pela técnica de FISH, bem como identificar a partir do espaçador não transcrito do DNA ribossômico 5S novos possíveis marcadores para as espécies em estudo (Capítulo 3);
- ✓ Identificação de possíveis marcadores moleculares para as espécies em estudo, pelo tratamento do DNA genômico com enzimas de restrição (Capítulo 4);

- ✓ Localização de seqüências de DNA repetitivo no genoma das espécies *G. carapo* e *G. sylvius*, pela técnica de FISH, a partir de sondas obtidas no presente estudo (Capítulo 4).
- ✓ Seqüenciamento e hibridação em membrana de nylon do DNA satélite obtido através do tratamento com endonucleases de restrição, para determinação de sua composição e organização genômica (Capítulo 4);

Os estudos nos Gymnotiformes, de modo geral, são ainda muito incipientes quando os comparamos com a diversidade desse grupo. Espera-se que a análise proposta neste trabalho, além de ampliar o repertório metodológico e o conhecimento sobre o gênero *Gymnotus*, sirva como base para estudos futuros, permitindo assim o desenvolvimento de novas hipóteses que ajudarão a compreender de modo mais abrangente não só o gênero, mas também os Gymnotiformes.

CAPÍTULO II

Bandas R e Hibridação de Seqüências Teloméricas na detecção de Homeologias Cromossômicas

ABSTRACT

Incorporation banding pattern (R-bands) has proved to be an important option for the identification of homologous chromosomes in fish, as an alternative to the traditional G-banding methods, which fail in producing satisfying results in most of analyzed species. This approach, associated with the hybridization of telomeric sequences, permits to identify chromosomal rearrangements, useful as indicators of karyotypic evolution within the group. In the present work, both R-banding and telomere-sequence hybridization were carried out in order to determine the possible relationships between the species *G. carapo* and *G. sylvius*. The results obtained from hybridization with telomere sequences, coupled with the chromosomal homeologies detected by R-banding, showed that *G. carapo* and *G. sylvius* present a common ancestor, also corroborated by similarities among three chromosomal pairs, putatively conserved in both species, and that *G. sylvius* has undergone a recent process of centric fusion along the evolutionary history.

RESUMO

O padrão de bandas por incorporação (Bandas R) surgiu como uma importante opção para a identificação de cromossomos homólogos em peixes, em substituição aos métodos tradicionais como o bandamento G, os quais não haviam trazido resultados satisfatórios na maioria das espécies analisadas. Essa abordagem associada à hibridação de seqüências teloméricas permite a identificação de rearranjos cromossômicos, atuando como indicativos da evolução cariotípica do grupo. Nesse trabalho foram levadas a efeito a hibridação de seqüências teloméricas e o bandamento R para determinação das relações existentes entre as espécies *G. carapo* e *G. sylvius*. Os resultados obtidos a partir da

hibridação de seqüências teloméricas, aliados às homeologias cromossômicas detectadas pelo Bandamento R, mostraram que as espécies *G. carapo* e *G. sylvius* possuíram um ancestral comum, fato corroborado pelas similaridades observadas em três pares cromossômicos, que se mostraram conservados em de ambas as espécies, e que *G. sylvius* sofreu um processo de fusão cêntrica recente ao longo de sua história evolutiva.

2.1 Introdução

O padrão de bandas por incorporação da 5-bromo-2'-deoxiuridina (5-BrdU) (Bandamento R) surgiu como uma importante opção para a identificação de cromossomos homólogos em peixes (Almeida-Toledo *et al.*, 1988), uma vez que os métodos mais tradicionais de diferenciação longitudinal, como as Bandas G, não haviam sido satisfatórios na maioria das espécies analisadas (Almeida-Toledo, 1986). Nessa técnica administra-se *in vivo* 5-bromo-2'-deoxiuridina (5-BrdU), a qual substituirá a Timidina durante um período restrito da fase S, tornando mais claras as regiões onde houve incorporação. Em peixes, tal técnica garantiu que não só a identificação cariotípica pudesse ser aprimorada, mas também o estudo de unidades de replicação nos cromossomos e a detecção de possíveis rearranjos cromossômicos, fornecendo assim indícios de evolução na estrutura cromossômica (Almeida-Toledo, 1988; Daniel-Silva & Almeida-Toledo 2005), sendo essa abordagem muito utilizada para estudos evolutivos nos mais diversos grupos (Diberadino & Iannuzzi, 1981; Dutrillaux, 1979).

Recentemente, a hibridação *in situ* com seqüências teloméricas forneceu novas evidências para a evolução cromossômica, uma vez que os telômeros são regiões de extrema importância para manutenção da estabilidade e integridade cromossômica (Kipling, 1995). De modo geral, apresentam repetições em cadeias pouco elaboradas, com forte predominância da seqüência TTAGGG. Rearranjos que levam à fusão cêntrica de dois

cromossomos acrocêntricos, formando um único metacêntrico, as fusões Robertsonianas, podem ocorrer quando há depleção da seqüência telomérica ou alterações nas proteínas associadas a essas regiões. A ocorrência desse processo se dá quando os telômeros não são mais reconhecidos como tal, mas sim como quebras nas moléculas de DNA, o que leva à ativação da maquinaria de reparo da célula ocasionando assim a fusão dessas regiões. Em alguns grupos de vertebrados, verifica-se a ocorrência de tais fusões sem perda da seqüência telomérica, tendo como resultado a presença de sítios teloméricos intersticiais (ITS) detectáveis por FISH, em regiões próximas ao centrômero, fato que é associado à possível inativação dos telômeros (Meyne *et al.*, 1990). Em peixes, a análise de distribuição dessas seqüências (TTAGGG)_n determinou que, de modo geral, elas encontravam-se restritas às regiões terminais e apenas em alguns casos, pode-se verificar a presença de sítios teloméricos intersticiais (ITS), delineando assim, tanto processos de fusão cromossômica recente (Holmquist & Dancis, 1979), como evidências de rearranjos cromossômicos envolvendo as seqüências teloméricas (Phillips & Reed, 1996).

O presente estudo tem por objetivos, através do bandamento R e da hibridação *in situ* de seqüências teloméricas a detecção de possíveis rearranjos cromossômicos envolvendo as espécies *G. carapo* e *G. sylvius*, bem como verificar a possível presença de sinais teloméricos intersticiais, indicativos de um processo de fusão recente.

2.2 Materiais e Métodos

Bandamento de Replicação

Para a incorporação da 5-Bromodeoxiuridina, foram injetados 0,1ml/10g de massa corporal de solução de 5-BrdU a 25µg/ml, 5-6 horas antes do sacrifício dos animais. A preparação de cromossomos mitóticos foi realizada conforme Almeida-Toledo *et al.*,

(1993). Uma vez obtida a lâmina com a preparação, esta foi incubada por 20 minutos em solução de Hoescht a temperatura ambiente, seguindo-se um banho em 2xSSC e montagem entre lâmina e lamínula com 3 gotas de 2xSSC e exposta à luz UV por cerca de 1 hora e 30 minutos. Após esse período de exposição, a lâmina é incubada em solução de 2xSSC a 60°C por 20 minutos, seguida de coloração com Giemsa 1:30 por 10 minutos e seca ao ar para posterior análise.

Sondas Teloméricas

Para obtenção da sonda telomérica, utilizamos os primers degenerados (TTAGGG)₅ e (CCCTAA)₅, de modo que na reação de PCR os mesmos atuem como *templates* para si mesmos e, portanto a cada ciclo temos o aumento no tamanho do fragmento. A reação de PCR para um volume de 100µl é feita com 50mM KCl, 10mM Tris-HCl (pH 8.3), 1.5mM MgCl₂, 200µM de cada dNTP, 0.1µM de cada primer e 2U de *Taq* Polimerase. A amplificação consiste primeiramente em 10 ciclos, sendo 1 minuto a 94°C, 30 segundos a 55°C e 1 minuto a 72°C, seguido de 30 ciclos sendo 1 minuto a 94°C, 30 segundos a 60°C, 90 segundos a 72°C e um passo final de 5 minutos a 72°C. Após a realização da PCR os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo para verificação do tamanhos. Feito isso, os produtos foram marcados com biotina, com utilização do kit BioNick (Invitrogen) para realização do FISH. Para tal utilizamos 1µg de DNA para marcação, 5µl de mix de enzimas, 5µl de dNTP mix e quantidade suficiente de água destilada para completar o volume para 45µl. A reação foi incubada por 1 hora a 16°C e após esse período foram adicionados 5µl de tampão de parada. Passamos à precipitação da sonda, a qual consistiu na adição de 1/10 em volume de acetato de sódio

3M e 2 volumes de etanol absoluto, misturando-se, gentilmente, por inversão do tubo. Os passos seguintes foram: incubar por 15 minutos a -70°C e centrifugar em seguida por 10 minutos a 15000rpm; retirar o sobrenadante e ressuspender em solução de hibridação na concentração desejada para uso ou em água para estoque.

2.3 Resultados

Bandas de Replicação e Hibridação de Seqüências Teloméricas

A incorporação do 5-BrdU nas espécies *Gymnotus carapo* e *Gymnotus sylvius* corroborou a hipótese de fusão cromossômica, a qual foi levantada após a realização da hibridação *in situ* de seqüências teloméricas, em ambas as espécies, evidenciando marcações intersticiais dessas seqüências na espécie *G. sylvius* (Fig. 2.1) e nenhuma marcação de mesma natureza em *G. carapo* (Fig 2.2).

Foi possível propor, através da análise comparativa dos bandamentos de ambas as espécies, correspondências no padrão de bandas nas seguintes regiões cromossômicas: par GC21 corresponde ao par GS19, par GC7 corresponde ao par GS6, par GC8 corresponde ao par GS7, pares GC22 e GC27 correspondem às regiões p e q respectivamente do par GS18, pares GC18 e GC20 correspondem às regiões p e q respectivamente do par GS2 (Fig. 3.5).

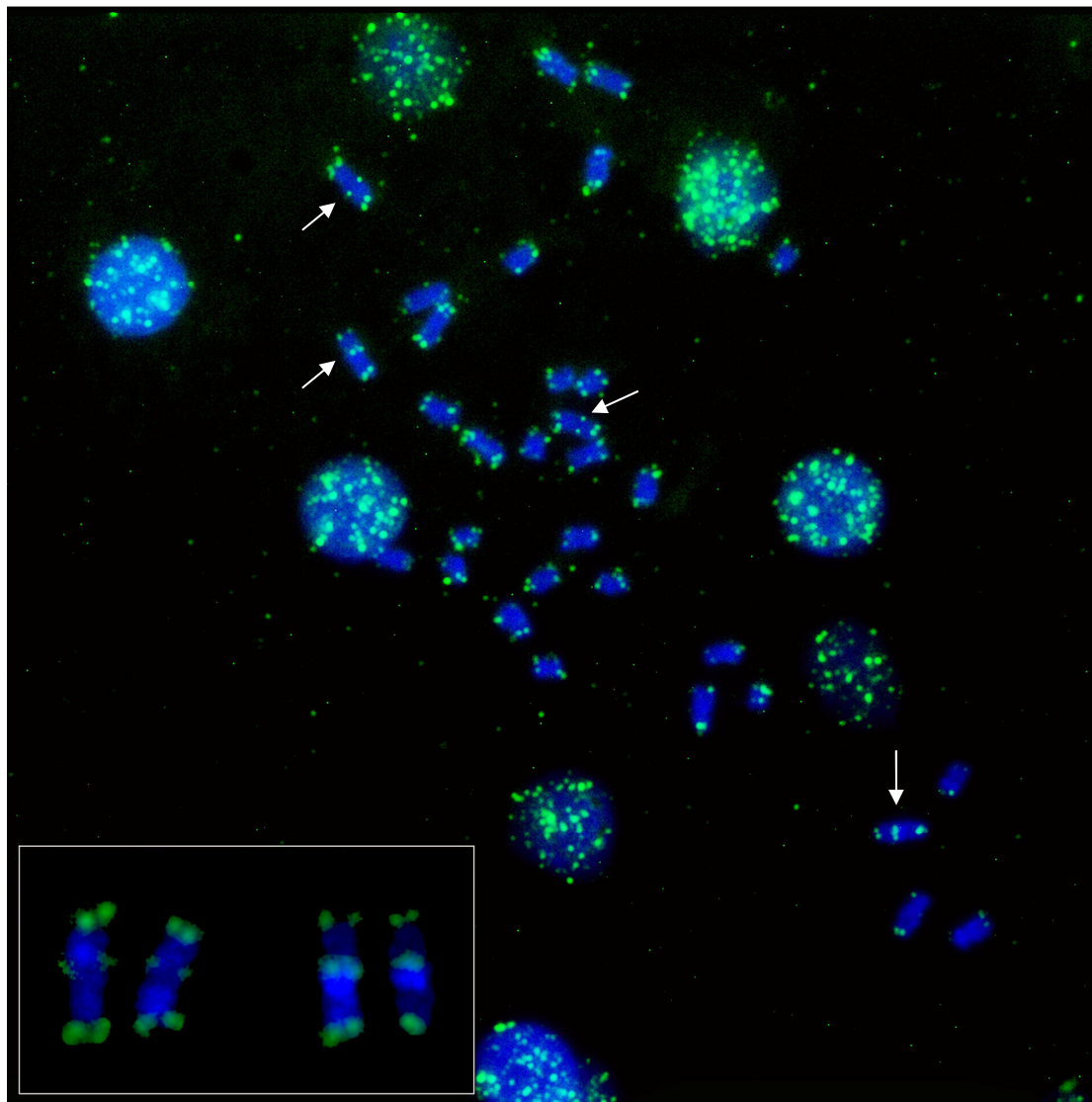


Figura 2.1: Hibridação *in situ* com sonda telomérica para a espécie *Gymnotus sylvius*. No detalhe, pares cromossômicos portadores da fusão. Setas indicam regiões com marcações intersticiais.

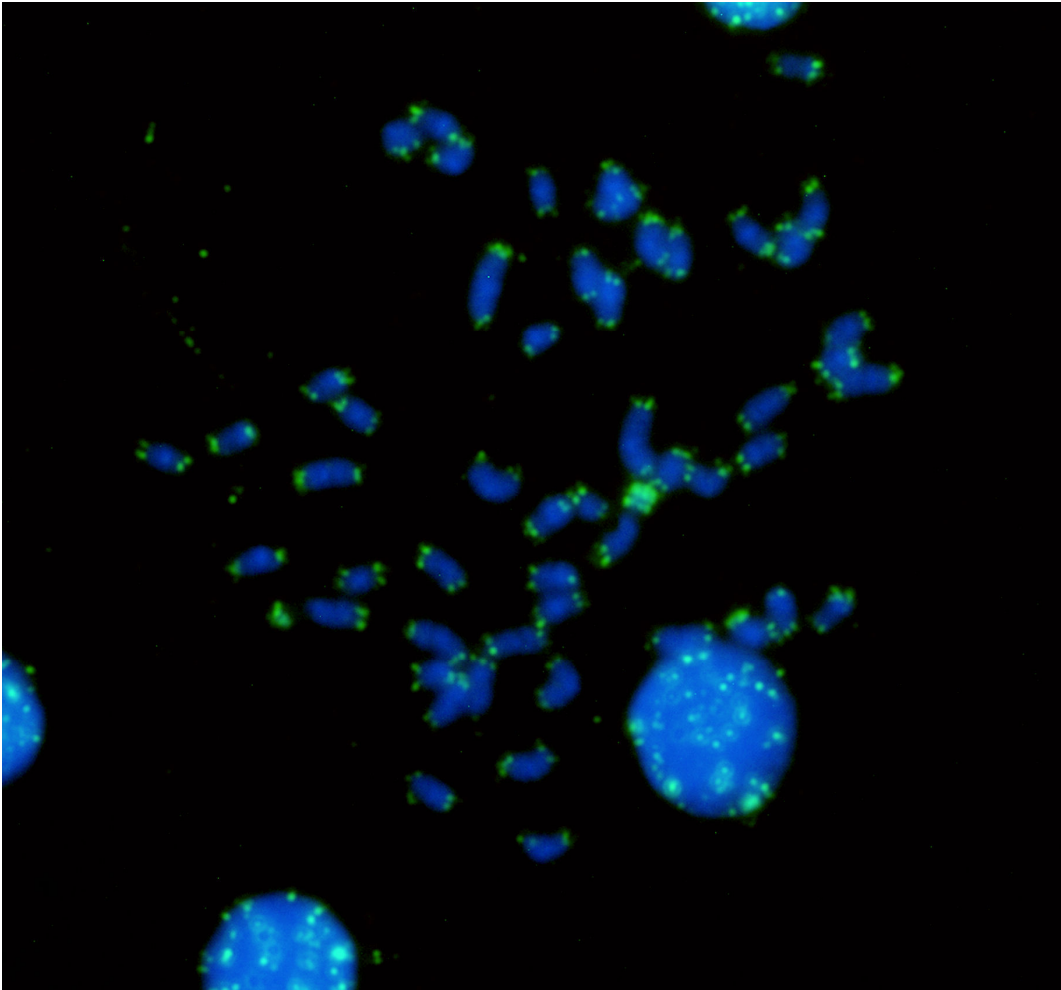


Figura 2.2: Hibridação *in situ* utilizando-se sonda telomérica para a espécie *Gymnotus carapo*.

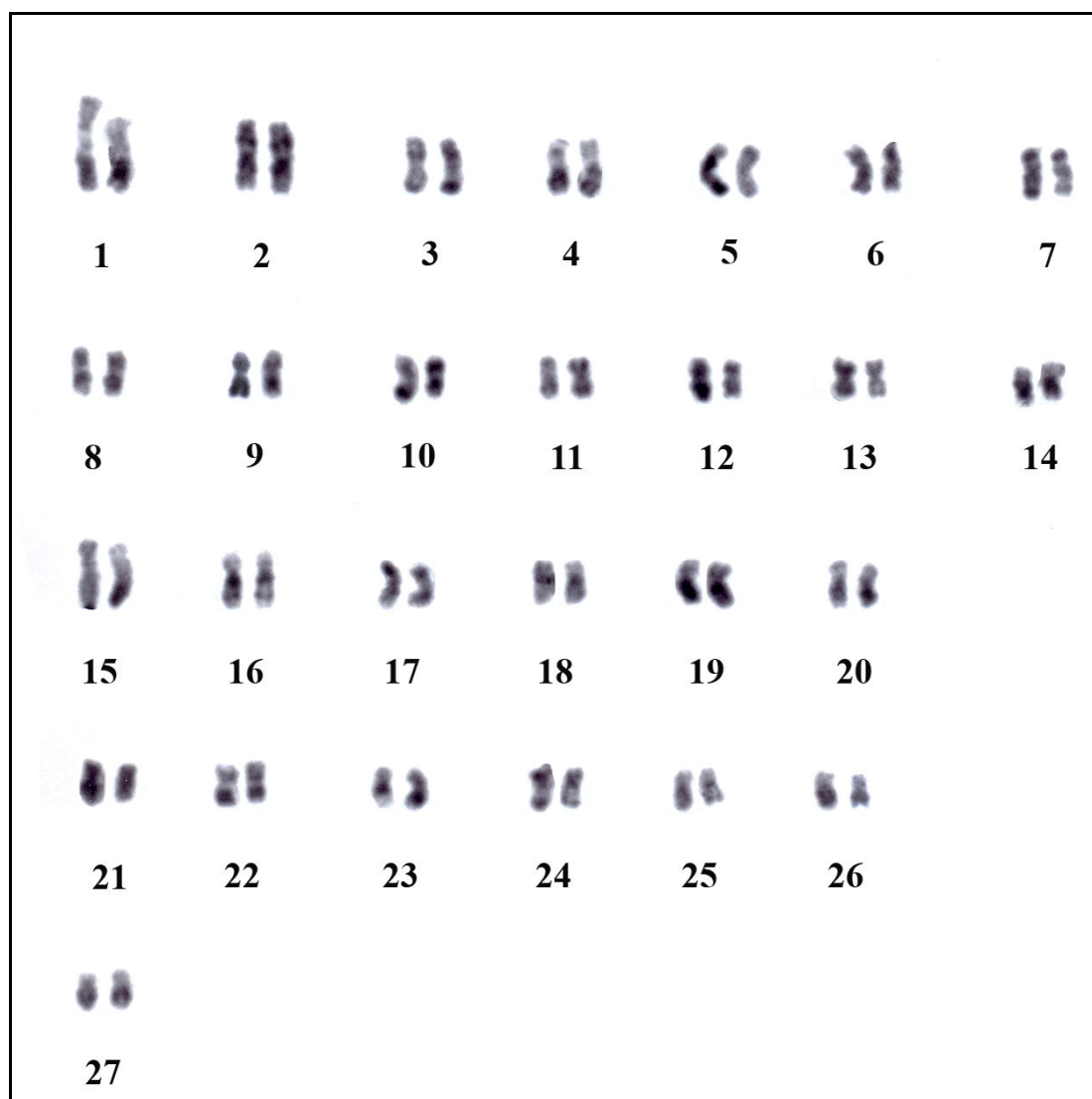


Figura 2.3: Padrão de bandas após incorporação de 5-BrdU, nos cromossomos de *Gymnotus carapo*.

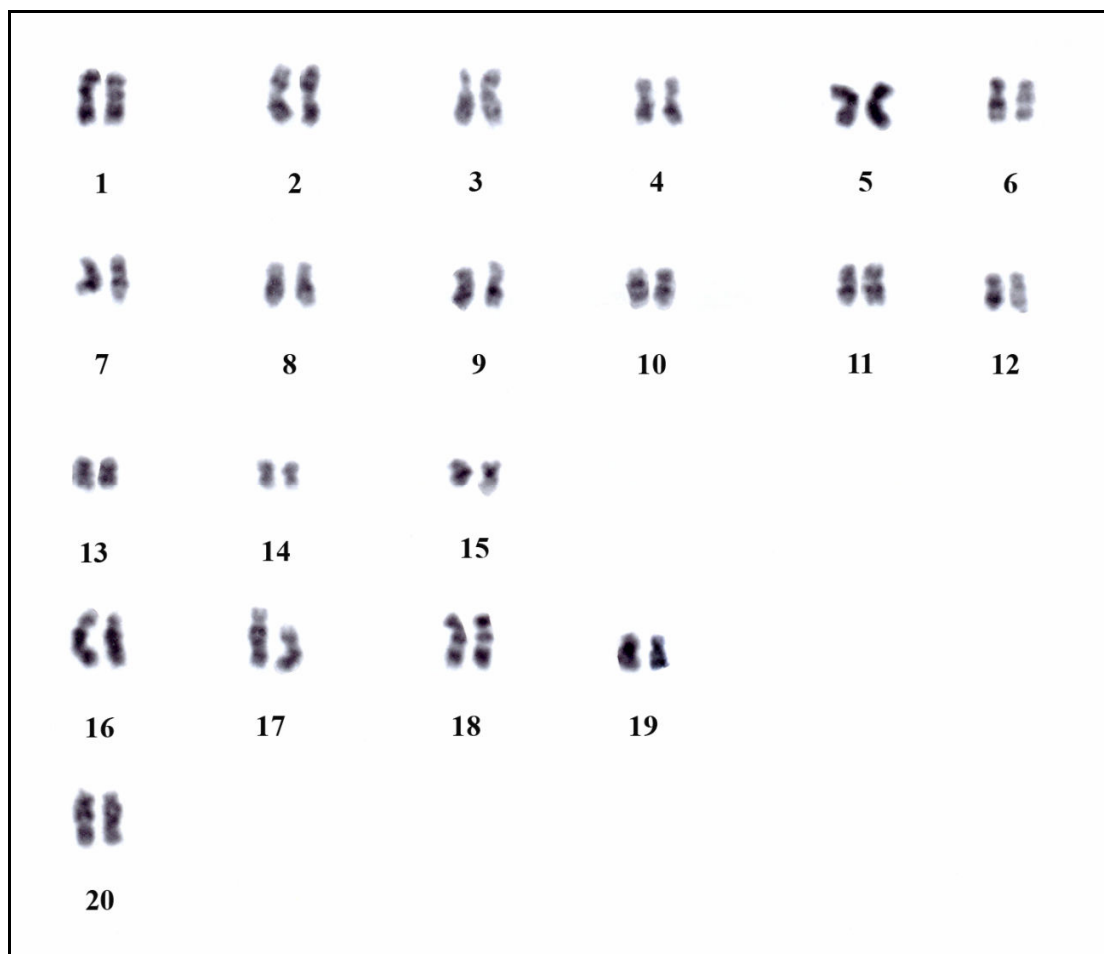


Figura 2.4: Padrão de bandas após incorporação de 5-BrdU, nos cromossomos de *Gymnotus sylvius*.

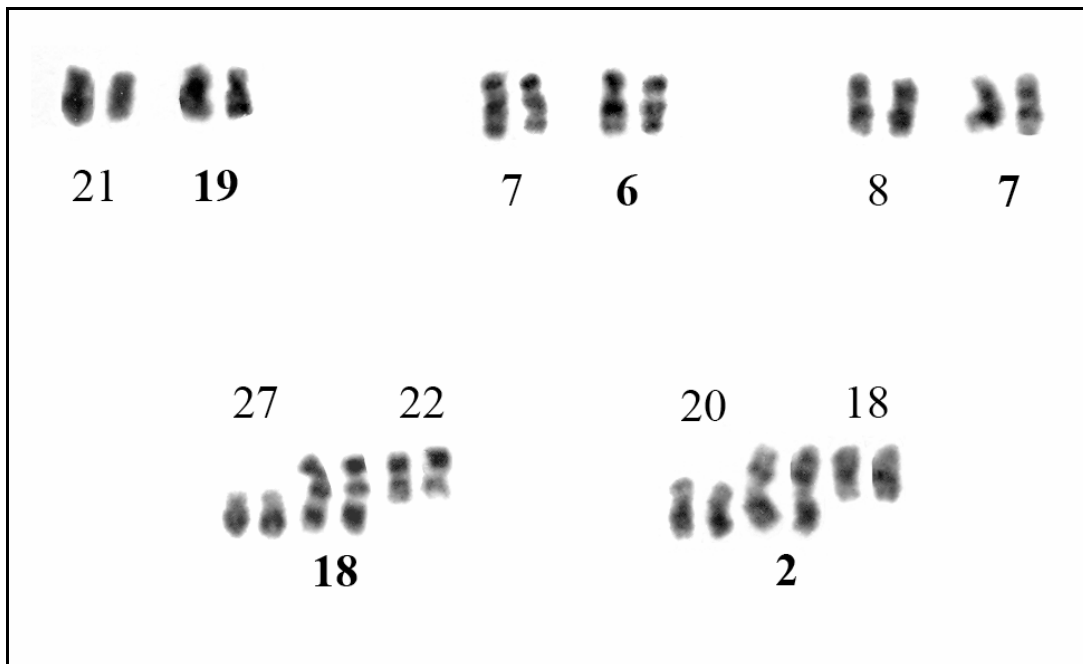


Figura 2.5: Comparação de padrão de bandas após incorporação de 5-BrdU, nos cromossomos de *Gymnotus carapo* e *Gymnotus sylvius*. Números indicam os pares cromossômicos de *G. carapo* e números em negrito os pares cromossômicos de *G. sylvius*.

2.4 Discussão

A hibridação *in situ* com seqüências teloméricas evidenciou em *G. sylvius* espécie de menor número cromossômico ($2n=40$), sinais intersticiais em dois pares cromossômicos, um indício de ocorrência de fusão cromossômica sem a perda das seqüências teloméricas, evento cuja ocorrência pode ser resultado da inativação de proteínas associadas a essa região (Zakian, 1995), alteração na estrutura da cromatina (Slijepcevic *et al.*, 1997), ou mesmo a inativação da telomerase (Blasco *et al.*, 1997), todas associadas direta ou indiretamente com a inativação do telômero. O fato de as seqüências ainda serem detectadas, além de indicar a presença de fusão, evidencia que esse processo é recente, uma vez que não houve depleção das seqüências ao longo da história evolutiva da espécie *G. sylvius*. Entretanto existe ainda a possibilidade de tal resultado não ser uma fusão verdadeira, uma vez que seqüências degeneradas similares aos telômeros já foram encontradas em regiões centroméricas de mamíferos (Shampay *et al.*, 1995), as quais podem não ser distinguidas de seqüências teloméricas normais pelas técnicas mais comuns, fato

que demonstra o quão delicada é a real identificação de fusões verdadeiras, sendo necessária a utilização de abordagens amplas para a confirmação de tais resultados.

A identificação de rearranjos cromossômicos, e, portanto o estudo da evolução cromossômica, pode também ser feita utilizando o bandamento R, o qual estará associado ao padrão de replicação, sendo essa uma técnica que permite a identificação de cromossomos homólogos em diferentes espécies (Dutrilau, 1979). Tal abordagem foi adotada para confirmação do resultado obtido pela hibridação *in situ* de seqüências teloméricas. Apesar de o gênero *Gymnotus* não possuir cromossomos marcadores, como é o caso dos Characiformes (Scheel, 1973), os resultados obtidos pelo Bandamento R permitiram a proposta da ocorrência de homeologias entre cinco pares de cromossomos da espécie *G. sylvius* e sete pares da espécie *G. carapo*. Deste total, três pares cromossômicos em cada espécie apresentaram correspondência completa entre suas bandas, indicativo de que esses cromossomos foram provavelmente herdados de um ancestral comum e não sofreram mudanças detectáveis desde então, fato também verificado em espécies de outros grupos (Hellmer *et al.*, 1991; Daniel-Silva & Almeida-Toledo, 2005). Aliada a esse resultado foi possível a verificação de similaridade entre dois pares cromossômicos de *G. sylvius*, com quatro pares cromossômicos da espécie *G. carapo*, que nesse caso correspondem aos braços curtos ou longos da espécie *G. sylvius*, provavelmente originados a partir de uma fusão cêntrica, a qual obrigatoriamente ocorreu após a separação do ancestral comum.

Os dados obtidos permitiram, portanto, a compreensão de parte da evolução cariotípica do gênero *Gymnotus*, garantindo um ponto de partida para trabalhos futuros e demonstrando que a utilização do Bandamento R e a hibridação *in situ* de seqüências teloméricas, podem fornecer bons marcadores para estudos comparativos entre espécies próximas.

Capítulo III

Hibridação *in situ* de Genes Ribossômicos 18S e 5S e Caracterização Molecular do Espaçador Não Transcrito associado à região do gene ribossômico 5S

ABSTRACT

The ribosomal genes have been widely used in studies about nucleolar organizer regions, favoring the establishment of relationships hypotheses among some fish species. The non-transcribed spacer associated with the 5S ribosomal gene, due to its fast evolutionary rate, comprises a large number of informative sites, thereby, being successfully used in evolutionary analyses of closely related species. *In situ* hybridization experiments to locate 18S and 5S ribosomal genes, as well as molecular analysis of both 5S and NTS, were performed in order to identify putative markers for the studied species. The results allowed us to corroborate previous available data about the 18S ribosomal DNA, i.e., a single locus and presence of sequence size heteromorphism. With regards to the 5S ribosomal DNA, it was possible to verify the occurrence of multiple sites in the species *G. carapo*, a feature not shared with *G. sylvius*, which presented just a single locus bearing such gene family. Furthermore, still in relation to the 5S ribosomal gene, it was possible to detect a SINE-like transposable element, analogous to that reported for the species *Danio rerio*, being this the first description of SINE sequence within the genus *Gymnotus*.

RESUMO

Os genes ribossômicos têm sido amplamente empregados principalmente no estudo de regiões organizadoras de nucléolo permitindo o estabelecimento de hipóteses de relacionamento entre algumas espécies de peixes. O espaçador não transcrito associado ao gene ribossômico 5S, por ter sua evolução muito rápida apresenta uma boa quantidade de sítios informativos, sendo, portanto, utilizado com sucesso em estudos evolutivos entre

espécies próximas. Foram levadas a efeito hibridações *in situ* para localização dos genes ribossômicos 18S e 5S, bem como foi realizada análise molecular do gene ribossômico 5S juntamente com seu NTS a fim de identificar possíveis marcadores para as espécies em estudo. Os resultados obtidos permitiram corroborar dados oriundos da literatura acerca do DNA ribossômico 18S, o qual está presente em um único locus e apresenta heteromorfismos no tamanho de sua seqüência. Com relação ao DNA ribossômico 5S foi possível verificar a existência de sítios múltiplos para a espécie *G. carapo*, característica não compartilhada com a espécie *G. sylvius* a qual apresentou apenas um locus para essa família gênica. Ainda associado ao gene ribossômico 5S foi possível verificar a existência de um elemento transponível do tipo SINE, análogo àquele descrito para a espécie *Danio rerio*, sendo essa a primeira descrição de uma seqüência do tipo SINE descrita para o gênero *Gymnotus*.

3.1 Introdução

Nos eucariotos superiores, os genes ribossomais são organizados em duas famílias multigênicas, cujos genes apresentam taxas de repetição moderadas. A primeira delas, representada pelo DNA ribossômico 45S, consiste na unidade transcricional que codifica para os rRNAs 18S, 5.8S, 28S e um espaçador intergênico não transcrito (IGS), enquanto a segunda codifica para o rRNA 5S. Comumente encontrada separada em relação à primeira, a família multigênica do rDNA 5S não está associada à formação do nucléolo, entretanto existem casos em que ela pode ser encontrada intercalada entre outras famílias multigênicas, como entre os genes de histonas e o próprio rDNA 45S (Drouin & Moniz de Sá, 1995).

No campo da Citogenética, o rDNA 45S tem sido indireta e conjuntamente estudado com as regiões organizadoras de nucléolo. Uma importante característica verificada no estudo das RONS em peixes se dá no fato de seu número e posição serem específicos para cada espécie ou mesmo para uma população estudada, caráter que tem sido utilizado com

relativo sucesso no estabelecimento de hipóteses de relacionamento entre alguns grupos de peixes (Phillips *et al.*, 1989). Tradicionalmente as RONS têm sido localizadas através da técnica de incorporação por nitrato de prata, porém tal técnica permite detectar apenas as RONS que permaneceram ativas na intérfase anterior, uma vez que o nitrato de prata associa-se somente às proteínas envolvidas no processo de produção dos ribossomos e não ao rDNA em si (Miller, *et al.*, 1976). Novas metodologias permitiram a identificação das RONS através de fluorocromos como a Cromomicina A₃, a qual cora regiões do DNA ricas em GC, indicando em peixes as RONS ativas ou inativas (Amemiya & Gold, 1986). Entretanto essa técnica também apresenta desvantagens, uma vez que regiões heterocromáticas, as quais não possuem o DNA ribossômico 18S podem se apresentar coradas, levando a resultados falsos positivos (Phillips & Reed, 1996). A técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH), por sua vez, permitiu uma localização ainda mais precisa das RONS, independente de sua atividade de transcrição. Dentre os genes componentes da família do rDNA 45S, o rDNA 18S é aquele mais comumente empregado como sonda para sua localização cromossômica em peixes, sendo que tal técnica para identificação das RONS tem se tornado cada vez mais comum, confirmando e ampliando os resultados obtidos em outras técnicas (Oliveira, 1999).

Composto de inúmeras repetições em tandem o rDNA 5S é formado por uma região altamente conservada do DNA, com aproximadamente 120pb, seguida de um espaçador não transcrito (NTS) de tamanho variável, cuja variação relaciona-se com a ocorrência de inserções/deleções, pequenas repetições ou a presença de pseudogenes (Wasko, *et al.*, 2001). A região do NTS, quando comparada com a parte transcrita, possui uma evolução muito rápida, apresentando, uma maior quantidade de sítios informativos, sendo, portanto, utilizada com sucesso em estudos evolutivos entre espécies próximas (Baum & Johnson,

2007). A família do gene ribossômico 5S é um dos melhores exemplos de evolução concertada, na qual todas as unidades evoluíram como uma única, levando a um alto grau de identidade entre todas as cópias (Nei & Rooney, 2005). Dessa forma, o rDNA 5S mostra-se como uma excelente ferramenta na compreensão da evolução destas famílias multigênicas, bem como, devido a sua intensa dinâmica evolutiva, pode atuar como um marcador genético entre espécies e populações (Martins, 2000).

Até o momento, poucos estudos acerca do DNAr 18S e 5S, bem como a análise molecular de seu NTS foram levados a efeito na família Gymnotidae, permanecendo disponíveis na literatura apenas estudos referentes à citogenética do grupo. Diante disso, pode-se afirmar que é necessária a utilização de análises citogenético-moleculares nas espécies pertencentes à família Gymnotidae, auxiliando a compreensão da evolução dessa família gênica.

3.2 Material e Métodos

Obtenção da Sonda Ribossômica 18S

Para obtenção da sonda ribossômica 18S foram utilizados os primers NS1 (5'-GTAGTCATATGCTTGCTC-3) e NS8 (5'-TCCGCAGGTTACCTACGGA-3). A reação de PCR para um volume de 25 μ l é feita com 50mM KCl, 10mM Tris-HCl (pH 8.3), 1.5mM MgCl₂, 200 μ M de cada dNTP, 0.1 μ M de cada primer e 2U de *Taq* Polimerase. A amplificação consiste em primeiramente 4 minutos a 94°C (desnaturação), seguido de 25 ciclos sendo 50 segundos a 94°C, 60 segundos a 58°C, 60 segundos 72°C e um passo final de 10 minutos a 72°C. Após a realização da PCR os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo para verificação do tamanho dos produtos. Uma vez verificada a amplificação, uma nova reação de PCR foi

realizada a fim de incorporar na sonda a fluoresceína-12-dUTP, fornecendo uma sonda já marcada, pronta para uso. A reação é realizada com os mesmos parâmetros, com exceção da concentração de dTTP, a qual é mantida em 100 μ M, para que o restante possa ser substituído pela fluoresceína-12-dUTP. Posterior à marcação, foi realizada a digestão da sonda por enzimas de restrição a fim de que o fragmento tenha tamanho ideal para realização da hibridação *in situ*.

Obtenção da Sonda Ribossômica 5S

Para realização da PCR utilizaram-se os primers 5'-TACGCCCGATCTCGTCCGATC-3' e 5'-CAGGCTGGTATGGCCGTAAGC-3, os quais foram desenvolvidos para a região de rDNA de truta arco-íris (Komiya & Takemura 1979). A reação de PCR para um volume de 25 μ l foi realizada com temperaturas distintas para cada espécie, sendo de 62°C para *Gymnotus carapo* e de 64°C para *Gymnotus sylvius*, concentração de Mg²⁺ variando de 1 a 2.5mM, 110ng de DNA total, 10pmol de cada primer, 5U de *Taq* Polimerase, 0.3mM de dNTP mix, 10x de tampão *Taq* Polimerase KCl, 10x de tampão *Taq* Polimerase (NH₄)₂SO₃, para um volume final de reação de 50 μ l. O programa desenvolvido correspondeu a: 5 minutos a 94°C (desnaturação); 30 ciclos de 1 minuto a 95°C, 30 segundos com a temperatura específica para cada espécie, como descrito acima, 1 minuto 72°C e por fim 10 minutos a 72°C (extensão). Posteriormente os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

Reação de seqüenciamento para as amostras de DNA ribossômico 5S

As amostras obtidas após PCR do DNA ribossômico 5S eluído foram seqüenciadas para verificação da composição e identificação da região codificadora de gene ribossômico,

bem como sua região NTS, que é específica e que deverá fornecer dados acerca da proximidade das espécies em estudo. Para realização da reação de seqüenciamento utilizamos o kit BigDye® Terminator v1. 1 Cycle Sequencing Kit e uma quantidade de DNA correspondente a 10ng para os fragmentos com tamanho até 500pb e 15ng para fragmentos entre 500-1000pb, conforme instruções no próprio kit de seqüenciamento. A reação em si consiste em: 2µl do tampão de reação (5X), 0.1µM de um dos primers, 1µl do mix de reação e o volume de água suficiente para completar o volume para 10µl. O ciclo consiste em 1 minuto a 96°C (desnaturação) seguido de 25 ciclos sendo 10 segundos a 96°C, 5 segundos a 50°C e 4 minutos a 60°C. Os produtos dessa reação são então precipitados em um mix, o qual contém 2750µl de Etanol absoluto, 110µl de glicogênio (1mg/ml) e 110µl de Acetato de Sódio 1M. Aos 10µl da reação de Big Dye, são adicionados 15µl do mix de precipitação, seguido de uma incubação de 15 minutos no escuro, seguido de centrifugação a 4000rpm por 30 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante é descartado e adicionado 50µl de etanol 70% as amostras e é realizada nova centrifugação a 4000rpm. O sobrenadante é mais uma vez descartado e as amostras secas em a 95°C por 1 minuto. As amostras foram então encaminhadas para seqüenciamento.

Hibridação in situ das sondas de DNA ribossômico 5S e 18S

Pré-tratamento das lâminas:

- ✓ Incubação das metáfases em 30µl de RNase A 100µg/µl sob lamínula em câmara úmida a 37°C por uma hora;
- ✓ Incubação com 0.0005% de pepsina em 10mM HCl por dois minutos a 37°C;
- ✓ Realizar duas lavagens em 1xPBS, uma delas com a adição de 50mM de MgCl₂ por cinco minutos cada;

- ✓ Pós fixação por seis minutos em PBS contendo 50mM de $MgCl_2$ e 1% de Formaldeído;
- ✓ Desidratação das lâminas em série alcoólica (70%, 80% e 100%) por 3 minutos.

Desnaturação e hibridação das seqüências:

- ✓ Desnaturar a sonda por 10 minutos em solução de hibridação contendo 60% Formamida, 25% 2xSSC e 15% Tween 20 e em seguida mantê-la em gelo até o uso;
- ✓ Desnaturar as lâminas em Formamida 70 por 2 minutos;
- ✓ Desidratação das lâminas em série alcoólica (70%, 80% e 100%) por 3 minutos;
- ✓ Aplicar na lâmina 10 μ l da solução de hibridação (10ng/ μ l), cobrir com lamínula e levar à estufa a 37°C *overnight*.

Lavagens e detecção do sinal para sondas com marcação direta:

- ✓ Lavar por cinco minutos em 2xSSC a 70°C;
- ✓ Lavar em solução TNT [100mM Tris-HCl (pH 7.5), 150mM NaCl, 0.05% Tween 20] por 5 minutos para detecção;
- ✓ Desidratar as lâminas por 3 minutos em série alcoólica (70%, 80% e 100%);
- ✓ Secar ao ar;
- ✓ Aplicar 20 μ l de antifade com DAPI para análise.

3.3 Resultados

Hibridação in situ das sondas de DNA ribossômico 5S e 18S

Para a espécie *G. carapo*, no que diz respeito à sonda de DNA ribossômico 5S, foram obtidos 14 sinais de hibridação (Fig. 3.1), em sua maioria em regiões pericentroméricas, enquanto que para *G. sylvius* verificamos a presença de apenas 2 sinais (Fig. 3.2). A sonda de DNA ribossômico 18S, forneceu apenas 2 sinais de hibridação em ambas as espécies (Fig. 3.3).

O seqüenciamento do gene ribossômico 5S forneceu algumas diferenças em relação a sua seqüência, tanto na região codificante desse gene, quanto em seu NTS, quando comparadas entre si e com dados disponíveis na literatura. Uma pesquisa no Genbank envolvendo a região funcional parcialmente amplificada com 74pb do gene ribossômico 5S, demonstrou que esta se apresenta muito conservada, variando apenas em poucas bases na região *upstream* quando comparada com seqüências obtidas para grupos distintos. Contudo, um alinhamento das seqüências entre as espécies em estudo demonstrou que as mesmas apresentam-se de forma idêntica (Fig. 3.4). O espaçador não transcrito (NTS), por sua vez, foi amplificado apresentando 510 pb, com pequenas diferenças entre as espécies em estudo, sendo o índice de similaridade entre as seqüências de aproximadamente 82,62%. O NTS, de modo geral, apresenta uma baixa ocorrência de elementos repetitivos, sendo a mais comum mononucleotídeos com tamanhos que podem variar de duas a doze repetições. Podem ainda ser encontradas seqüências mais complexas as quais se apresentam repetidas ao longo de todo o NTS, entretanto de forma distribuída e não formando blocos como mini ou microssatélites, como é o caso das seqüências TATA, identificadas para ambas as espécies. Com relação às diferenças referentes presentes no NTS, é possível observar que as mesmas correspondem basicamente a *indels* que podem variar de uma a oito bases e substituições pontuais ao longo da seqüência. Foi ainda feita uma busca no genbank utilizando-se a seqüência do NTS, entretanto não foi possível encontrar similaridades com nenhuma seqüência até hoje depositada nesse banco de dados. Em contrapartida, uma análise realizada com o programa *RepeatMasker* para a seqüência do gene ribossômico 5S juntamente com seu NTS, permitiu a identificação de um elemento transponível do tipo SINE (*Short Interspersed Nuclear Element*) associado ao gene ribossômico 5S de ambas as espécies. Analisando-se as seqüências identificadas, verificou-se que elas possuem

diferenças em apenas 1 base, garantindo uma similaridade extremamente alta de aproximadamente 98%. Quando comparadas com o SINE3-1 identificado em *Danio rerio*, são observadas alterações pontuais em sua seqüência, caracterizada por transversões/transições e inserções/deleções o que resulta em uma similaridade de aproximadamente 83% (Fig. 3.5).

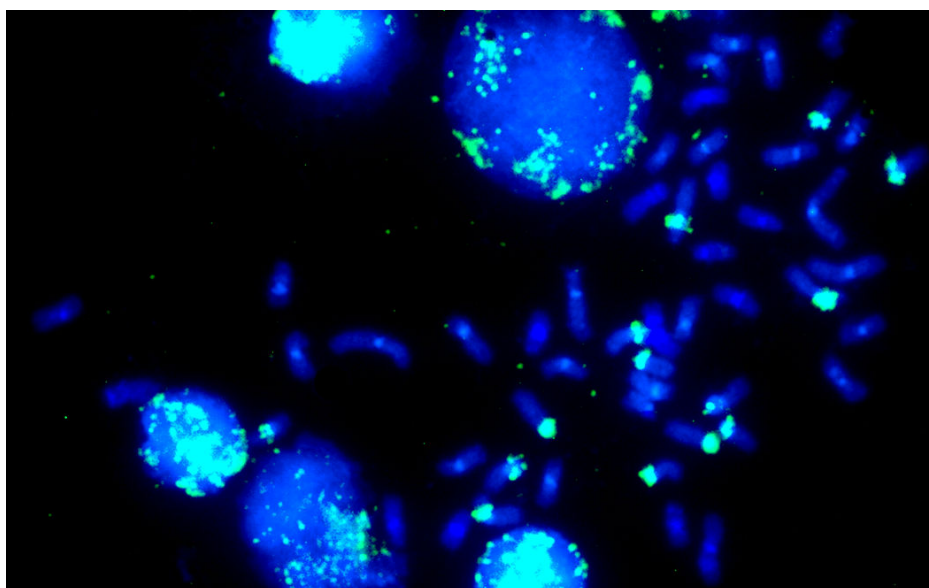


Figura 3.1: Hibridação *in situ* da sonda ribossômica 5S apresentando marcações em sete pares cromossômicos para a espécie *Gymnotus carapo*.

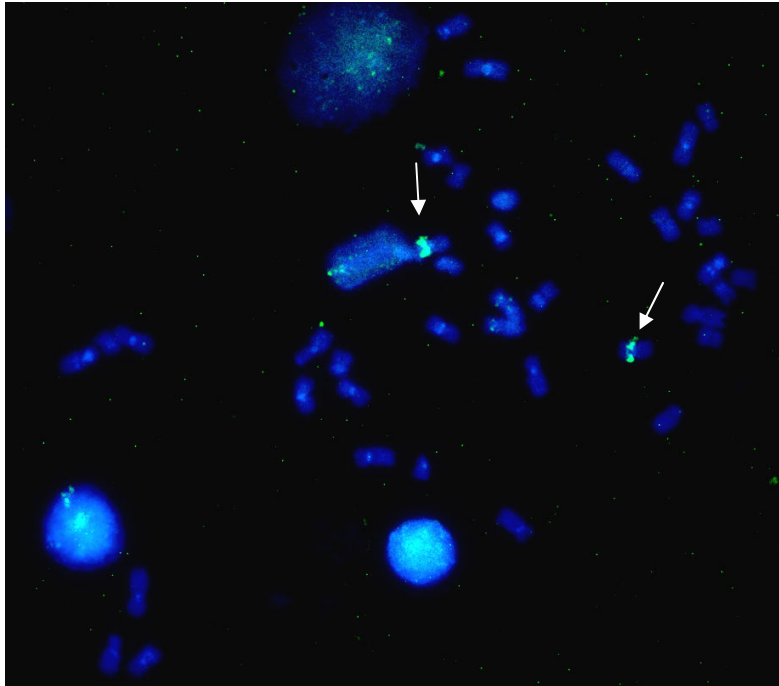


Figura 3.2: Hibridação *in situ* da sonda ribossômica 5S apresentando marcação em apenas 1 par cromossômico para a espécie *Gymnotus sylvius*. Setas indicam os sítios de hibridação.

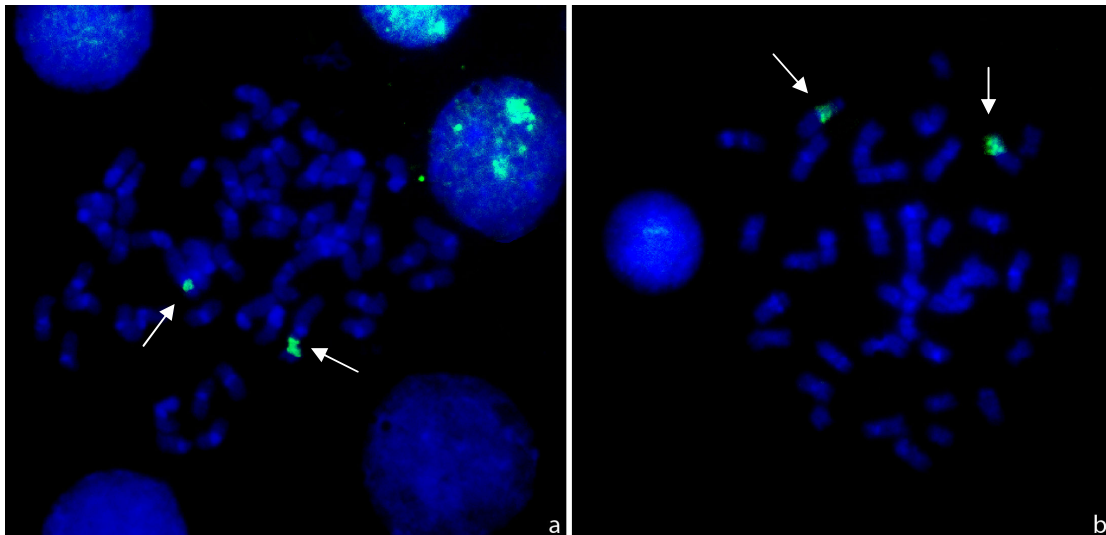


Figura 3.3: Hibridação *in situ* da sonda ribossômica 18S apresentando marcações em apenas 1 par cromossômico. a) *G. carapo* b) *G. sylvius*. Setas indicam os sítios de hibridação.


```

                                     <-5S|NTS->
          10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
5SGS  TGGAGCTAAGCAGGGTCGGGCTGGTTAGTACTTGGATGGGAGACCGCCTGGGAATACCAGGTGCTGTAAGCTTTTCATATTTGACACTTTTCTCTTACT
5SGC  .....G..

          110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
5SGS  ATTTTGCTCCTTTATTTTTTTTA--TTTCTTTCAT-----TCATGCACTCACTCATGCACTCATTTCATTTCATTA----TTTCGTTCCCTTATTTT
5SGC  .....AA.....A...ACGCGCTC...CT.....CA...A.....C.....CTTCC...A...AT.C.....

          210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
5SGS  TTTTTTTTATAT--AAAAAAGAAAATTGGCCCTT-CATGGCACTTGGCATCCATCTAACAAAACCTGGCGATTGTATGTGGGAG-CGCTGGGATTGTCC
5SGC  ...C...TG..CAA.....A...A.TT.....T..G.-.-...A.C...-...A...C.G.T.G.T..AAG..A...G.G.C.C...T..T...

          310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
5SGS  TCTGTTTGT---ACGGAACGTATACATTTAATTATCTCCCCCTTACGTAGTTGGGAAGAAGCAACCTACCTTTTCTCTCGCTATAGCTCCTGGGATA
5SGC  .G...G...GTGGA.....T.A.CT.-.....T.TC.....C..G.A..G.....-.....GCT.....

          410     420     430     440     450     460     470     480     490     500
5SGS  ATTATCCCATACAAAAGCTTAATATGATTTTAAAAACACATC--TGCCTGCATAT-GCTGAGAGGGATGTGGCGTTAAATGGAATGAAAAGGAAGGA
5SGC  .....TATA.T.....G.....CC..T.....T.....C.....CA.....

          510     520     530     540     550     560     570     580
5SGS  AAACACCGGCACACGAACCTTCTATCAAATGTTATCCGTCCGAGAA-GCTACGGTGTGCCTTAAAA-GCTGGTTTTTCACAGCC-ATC-
5SGC  .....-.....T.G.....A-C.....-.....G.....A...G

```

Figura 3.4: Alinhamento de duas seqüências de DNA ribossômico de *Gymnotus sylvius* e *Gymnotus carapo*, contendo parte do gene ribossômico 5S e seu NTS. Pontos significam bases idênticas, traços indicam *indels*. Elementos TATA encontram-se sublinhados.



Figura 3.5: Alinhamento do gene ribossômico 5S e a região inicial do elemento SINE 3. Nucleotídeos conservados estão destacados em preto e seqüência responsável pelo término da transcrição realizada pela DNA polimerase III encontra-se sublinhada. As regiões controladoras internas, Box A, IE e Box B do promotor da DNA polimerase III para o gene ribossômico 5S estão identificadas logo abaixo da seqüência.

3.4 Discussão

A hibridação *in situ* do gene ribossômico 18S corroborou dados previamente obtidos para coloração por nitrato de prata (Fernandes-Matioli, 1996), confirmando a existência de apenas um único locus para essa família gênica nas espécies *G. carapo* e *G. sylvius*. Pode-se observar também uma pequena variação nos tamanhos dos sítios entre cromossomos homólogos, fato comum nos vertebrados, incluindo os peixes (Foresti *et al.*, 1981), polimorfismo esse, já detectado no gênero *Gymnotus* (Fernandes-Matioli, 1997).

A hibridação *in situ* do gene ribossômico 5S, por sua vez, evidenciou uma interessante diferença entre as espécies em estudo. Em *G. sylvius* foram detectados apenas 2 sítios para essa família gênica, enquanto que para a espécie *G. carapo* esse número se mostrou sete vezes maior, totalizando quatorze sítios encontrados. A ocorrência de sítios 5S dispersos tem sido descrita em diversos organismos (Rosenthal & Doering, 1983; Nelson & Honda, 1985) e tem sido detectada em diversas espécies de peixes (Móran *et al.*, 1996; Fujiwara *et al.*, 1998; Martins & Galetti, 1999). Nota-se, portanto, uma não conservação do padrão de distribuição dos sítios do gene ribossômico 5S entre as espécies, fato que pode estar associado a rearranjos cromossômicos (capítulo 2), os quais podem estar associados à perda desses genes em *G. sylvius*, espécie com menor número cromossômico ($2n=40$). Estudos futuros com outras espécies do gênero são necessários para que seja possível delinear a dinâmica evolutiva dessa família gênica.

O seqüenciamento do gene ribossômico 5S, juntamente com seu NTS, permitiu uma análise criteriosa das seqüências as quais, além de indicarem algumas diferenças entre as espécies com relação a seu NTS, permitiram a localização de um elemento transponível associado a essa família gênica. Diferentemente aos dados disponíveis na literatura, o NTS de ambas as espécies não apresentou variações significativas ou mesmo permitiu a identificação de famílias de seqüências associadas a essa região do genoma (Martins & Wasko, 2004), entretanto uma busca na base de dados GeneBank com as seqüências oriundas do NTS não detectou similaridade com nenhuma outra, o que pode ser um indício de que tais seqüências possam atuar como marcadores moleculares eficientes para o gênero *Gymnotus*. Não foi possível a identificação de elementos repetitivos ao longo da seqüência do NTS, entretanto foi possível a localização de elementos TATA, os quais estão comprovadamente associados à

regulação da expressão do gene ribossômico 5S em mamíferos (Nederby-Nielsen *et al.*, 1993), sendo encontrados três elementos TATA na espécie *G. sylvius* e apenas dois na espécie *G. carapo*, indício de que o gene ribossômico 5S é funcional em ambas as espécies. Como já mencionado anteriormente, foi possível identificar um elemento transponível do tipo SINE na região que corresponde ao gene ribossômico 5S, através de uma análise comparativa das seqüências obtidas e a base de dados *Repbase*. Tal similaridade inclui uma característica fundamental ao SINE, que se refere ao sinal que atua como terminador da transcrição da polimerase III, determinado pela seqüência final do gene ribossômico 5S GCTT-3' e o início de seu espaçador 5'-TTCG, o que corresponde ao sítio GCTTTTCG (Paule & White, 2000). Nas espécies em estudo, tal seqüência possui alteração em sua última base (GCTTTCA), o que poderia levar ao não reconhecimento desse sítio pela polimerase III o que levaria a transcrição até a região terminal do SINE. Aliado a esse fato foi possível identificar as três regiões que constituem o promotor interno para a polimerase III para o gene ribossômico 5S, apresentando alta similaridade com as seqüências descritas para o elemento SINE3, fato que pode estar associado à transcrição desse elemento, necessária para a transposição (Sajdak, *et al.*, 1998). Não foi possível identificar seqüências terminais similares a elementos transponíveis do tipo CR1 (retrotransposon), tal qual verificado em *D. rerio* (Terai *et al.*, 1998), indicativo de que a região amplificada para ambas as espécies, corresponda à seqüência parcial deste SINE, uma vez que a região terminal provavelmente conterá a seqüência que será fundamental no processo de transposição desse elemento, fato já verificado em *D. rerio* (Kapitonov & Jurka, 2003). Com base nesses dados, portanto, podemos sugerir que as regiões amplificadas do gene ribossômico 5S e seu NTS, correspondem a um elemento do tipo SINE análogo ao SINE3 descrito em *Danio rerio*, sendo essa a primeira descrição de um elemento transponível para gênero *Gymnotus*. Novos estudos com abordagens mais específicas são fundamentais para que a seqüência do SINE seja descrita, permitindo assim uma caracterização completa desse elemento transponível no gênero *Gymnotus*.

Capítulo IV

Seqüências Repetitivas nas espécies *G. carapo* e *G. sylvius* e sua relação com a Heterocromatina

ABSTRACT

The genome of eukaryotes, despite of its complexity, can be generally subdivided into two major groups. The first is composed of single-copy sequences, representing a considerable portion of the functional genes, whereas the second group comprises the repetitive sequences, which represent a great part of the genome in several eukaryotes. The latter has been widely studied in a range of animal and plant groups, assuring a better comprehension about the evolutionary behavior of these sequences playing a major role as taxonomic, cytogenetic and molecular markers as well. Total DNA digestion in the species *G. carapo* and *G. sylvius* was carried out for the identification of molecular markers as well as to verify their relationship with heterochromatic regions. The present data allowed us to determine that the isolated sequences present a great diversity, with low similarity indexes, and are formed by microsatellites, which might serve, if polymorphic, as populational markers. In situ hybridization of these sequences revealed, in some cases, a direct relationship with heterochromatic regions, acting as an important component; however, in general, a disperse pattern of distribution was detected. Moreover, it was possible to identify another sequence in *G. carapo* with a high similarity with the terminal portion of the SINE-like element, what might indicate that such isolated sequence should contain a part of this element. The hybridization pattern was also disperse; nonetheless, some accumulation of this element is observed in some chromosomes, leading to a distinct hybridization pattern in relation to the other sequences, and thus providing another evidence that such sequence should correspond to a transposable element and not only to a repetitive DNA segment. The verification of occurrence and genome organization of the sequences showed that all presented a low occurrence within the genome, where smaller sequences presented a higher complexity, not tandemly organized and

associated with larger sequences while the isolated large sequences were patchily distributed along the genome.

RESUMO

O genoma dos organismos eucariotos, apesar de sua grande complexidade, pode ser subdividido, de modo geral em dois grandes grupos. O primeiro é composto pelas seqüências de cópia única, as quais constituem uma porção considerável dos genes funcionais, enquanto o segundo engloba as seqüências de caráter repetitivo, fração considerável do genoma de muitos eucariotos. Essa porção do genoma tem sido amplamente estudada nos mais diversos grupos animais e vegetais, garantindo uma melhor compreensão dos modos de evolução das seqüências, bem como atuando como importantes marcadores taxonômicos, citogenéticos e moleculares. Foram levadas a efeito digestões do DNA total para as espécies *G. carapo* e *G. sylvius* para prospecção de marcadores moleculares, bem como verificar sua relação com regiões heterocromáticas. Os dados obtidos permitiram determinar que as seqüências isoladas apresentam grande diversidade, com índices de similaridades baixos, tendo como região constituinte, microssatélites, os quais podem atuar, caso polimórficos, como marcadores populacionais. A hibridação *in situ* das seqüências permitiu em alguns casos sua relação direta com regiões heterocromáticas, atuando como um componente importante, porém de modo geral foi detectado um padrão de distribuição disperso. Foi possível a identificação ainda em uma seqüência oriunda de *G. carapo* similaridade elevada com a região terminal um elemento do tipo SINE, o que pode indicar que essa seqüência isolada contenha parte desse elemento. O padrão de hibridação também se mostrou disperso, porém é verificado certo acúmulo desse elemento em alguns cromossomos, o que tornou seu padrão de hibridação distinto em relação às outras seqüências, fornecendo mais uma evidencia de que deva se tratar de um possível elemento transponível e não apenas um componente do DNA repetitivo. A verificação da ocorrência e organização genômica das seqüências determinou que todas apresentaram uma baixa ocorrência no genoma, porém sua organização genômica se mostrou distinta, sendo que, seqüências menores apresentaram maior complexidade, não estando organizadas em cadeias e associadas a seqüências de maior tamanho, enquanto que as seqüências isoladas de maior tamanho apresentaram-se pontuais no genoma.

4.1 Introdução

O genoma dos organismos eucariotos, apesar de sua grande complexidade, pode ser subdividido, em dois grandes grupos. O primeiro é composto pelas seqüências de cópia única, as quais constituem uma porção considerável dos genes funcionais, enquanto o segundo engloba as seqüências de caráter repetitivo, fração considerável do genoma de muitos eucariotos (Wagner *et al.*1993). A classe repetitiva, por sua vez, é composta tanto por seqüências funcionais, como é caso dos genes ribossomais, quanto por seqüências não codificantes, as quais podem ou estar dispersas no genoma, como no caso dos transposons, ou arranjadas em cadeia, como nos casos dos mini e microsatélites, com repetições curtas não maiores do que 64 bases e do DNA satélite, que envolve repetições complexas com tamanhos superiores a 100kb.

Os minissatélites têm sido amplamente empregados em estudos populacionais, uma vez que possuem um padrão particular em relação à quantidade e comprimento das cadeias repetidas, garantindo assim aplicações em mapeamento genômico, genética de populações e evolutiva, programas de seleção e melhoramento em estudos de ecologia e preservação de espécies (Harris e Wright, 1995). Os microsatélites por sua vez estão entre as seqüências com mais alta taxa de evolução, o que resulta em um grande polimorfismo, o que torna os loci de microsatélite marcadores extremamente úteis para o estudo genético dentro das espécies (O'Reilly & Wright 1995, Angers e Bernatchez, 1997).

Historicamente o DNA satélite tem sido utilizado para caracterizar qualquer região altamente repetitiva do genoma, a qual possa ser distinguida do restante de seu DNA através do processo de centrifugação em gradiente de densidade (Wagner *et al.*1993). Uma definição mais contemporânea dessa porção do genoma, diz que ela corresponde a uma unidade monomérica de poucas a até milhares de bases arranjadas em cadeias e

indistinguíveis em uma centrifugação diferencial. Sua organização envolve longas cadeias com até 100 Mb, encontradas principalmente na heterocromatina, próximas a centrômeros e telômeros (Charlesworth *et al.*, 1994), ou mesmo sendo específica como no caso do cromossomo W de *Leporinus* (Parise-Maltempi *et al.*, 2007). Essa porção do genoma tem sido amplamente estudada nos mais diversos grupos animais e vegetais, garantindo uma melhor compreensão dos modos de evolução das seqüências (Volobouev, *et al.*, 1995), bem como atuando como importantes marcadores taxonômicos, citogenéticos e moleculares (Koehler *et al.*, 1997, Yamada, *et al.*, 2005).

Dentre os Gymnotiformes, o gênero *Eigenmannia* é provavelmente o primeiro a ter sido estudado com enfoque no DNA repetitivo (Henning, 2007). Neste trabalho, foi verificada a relação entre os elementos repetitivos e a diferenciação morfológica do cromossomo X, o qual apresenta um grande bloco heterocromático, nas populações oriundas das bacias do Tietê e Paranapanema ($2n=38$ XX/XY) em comparação com a população mais próxima filogeneticamente (bacia do rio Mogi) com a qual apresenta elevada similaridade cariotípica, não apresentando esta, porém, cromossomos sexuais morfológicamente distintos.

Não há evidências de outras pesquisas em Gymnotiformes que tenham como enfoque o DNA repetitivo, o que demonstra a escassez de trabalhos para o grupo. O presente estudo visa à identificação e caracterização do DNA repetitivo em duas espécies do gênero *Gymnotus*, *G. carapo* e *G. sylvius*, verificando sua possível relação com a heterocromatina presente nas espécies e a detecção de possíveis marcadores moleculares.

4.2 Materiais e Métodos

Bandamento C

O bandamento C para as espécies foi realizado com lâminas sem nenhum tratamento. Colocam-se as lâminas em solução de Hidróxido de Bário 5% por cerca de 8 segundos e em seguida lava-se com água destilada. Em seguida a preparação é submetida a uma solução de HCl 1M por aproximadamente 15 segundos e deixada em solução de 2xSSC por 20 minutos, sendo todas as soluções mantidas em banho-maria a 60°C. Posteriormente a preparação é corada em solução de Giemsa 5% por 30 minutos para análise.

Extração do DNA Genômico

O DNA foi extraído de amostras de tecido de exemplares de *G. carapo* e *G. sylvius* de diversas localidades, de acordo com o seguinte protocolo de extração salina:

- ✓ Retirar uma amostra de fígado (em torno de 100mg);
- ✓ Em um tubo de 1,5ml homogeneizar bem a amostra em 400µl de tampão salino utilizando um pistilo de plástico;
- ✓ Adicionar 40µl de SDS 20% (concentração final de 2%) e 8µl de proteinase K (concentração final de 400µg/ml) e misturar bem;
- ✓ Incubar a 65°C por pelo menos 1 hora
- ✓ Tratar a amostra com RNAse 10mg/ml: adicionar 10µl de RNAse e deixar por 1 hora a 37°C
- ✓ Adicionar 300µl de NaCl 6M e levar ao vortex por 1 minuto em alta velocidade;
- ✓ Centrifugar por 30 minutos a 10.000 G;
- ✓ Transferir o sobrenadante para tubos limpos de 1,5ml;
- ✓ Adicionar o dobro de volume de isopropanol e misturar bem;

- ✓ Incubar a -20°C por 1 hora ou “overnight”;
- ✓ Centrifugar por 20 minutos a 10.000 G a 4°C ;
- ✓ Descartar o sobrenadante e lavar o “pellet” em etanol 70%, centrifugando por 10 minutos a 10.000 G;
- ✓ Secar o “pellet” e ressuspender em TE ou água estéril (50 μl)

Digestão do DNA Genômico por Enzimas de Restrição

O procedimento consistiu na utilização de uma quantidade fixa de 14 μg de DNA para cada enzima utilizada, a fim de obter a maior quantidade de produto possível para posterior eluição do gel. Para a digestão eram acrescentados 3,5 μl de enzima, 7 μl de seu respectivo tampão e o volume final ajustado para 70 μl . A incubação das amostras foi realizada a 37°C *overnight*. Para visualização, as amostras foram aplicadas em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo, juntamente com um marcador de peso molecular 1kb para determinação dos pesos moleculares das bandas a serem eluídas.

Eluição das Bandas Obtidas pela Digestão

Primeiramente a banda é recortada do gel de modo preciso, a fim de que juntamente com a seqüência de interesse, a presença de seqüências de outras naturezas, não constituintes do DNA repetitivo seja minimizada. Para a eluição das bandas utilizou-se o kit **Illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit GE** conforme protocolo fornecido pelo fabricante. Em todos os casos o DNA foi eluído em um volume maior, garantindo uma melhor recuperação do DNA a ser recuperado a partir do gel de agarose e posteriormente precipitado para 15 μl para prosseguimento com o procedimento de clonagem.

Clonagem das Bandas Eluídas

Uma vez realizada a eluição das bandas passamos então à clonagem dos fragmentos eluídos através do kit **Blunt-ended PCR Cloning Kit GE** conforme protocolo fornecido pelo fabricante. Primeiramente o produto de eluição é visualizado em gel de agarose 1% juntamente com o marcador de peso molecular **Low DNA Mass Ladder**, o qual permite tanto a quantificação do DNA, quanto a determinação do tamanho do inserto, passos fundamentais para a clonagem do fragmento. Ao final do procedimento 50µl de meio líquido contendo as bactérias já transformadas deverão ser espalhadas em uma placa de Agar contendo 50µg/ml de ampicilina, 15µg/ml de tetraciclina, 50mg/ml de X-gal e 4mM/ml IPTG e incubadas *overnight* a 37°C.

Para verificação da inserção do fragmento no plasmídeo utilizou-se a técnica de *toothpick*, na qual com o auxílio de uma ponteira estéril, toca-se a colônia e transferem-se as bactérias para um tubo com 50µl de água destilada. Incuba-se então a solução por 5 minutos em banho fervente para lisar as células e inativar as DNases. Centrifuga-se a solução por 1 minuto a 15000rpm e transfere-se o sobrenadante, a um novo tubo, o qual deverá ser mantido no gelo até o uso. A reação de PCR conterà 5mM dNTP mix, 2.5 pmol do primer M13 (forward e reverse), 10x tampão *Taq* DNA Polimerase e 2.5U *Taq* DNA Polimerase. O programa consiste em 5 minutos a 96°C seguidos de 29 ciclos de 45 segundos a 96°C, 45 segundos a 51°C, 1 minuto e 40 segundos a 72°C, seguidos ao final por 10 minutos a 72°C. Os produtos amplificados serão aplicados em gel de agarose 1%, com marcador de peso molecular de 1Kb, para verificação do tamanho esperado nas colônias que apresentaram o inserto.

Hibridação in situ das sondas de DNA repetitivo

Pré-tratamento das lâminas:

- ✓ Incubação das metáfases em 30µl de RNase A 100µg/µl sob lamínula em câmara úmida a 37°C por uma hora;
- ✓ Incubação com 0.0005% de pepsina em 10mM HCl por dois minutos a 37°C;
- ✓ Realizar duas lavagens em 1xPBS, uma delas com a adição de 50mM de MgCl₂ por cinco minutos cada;
- ✓ Pós fixação por seis minutos em PBS contendo 50mM de MgCl₂ e 1% de Formaldeído;
- ✓ Desidratação das lâminas em série alcoólica (70%, 80% e 100%) por 3 minutos.

Desnaturação e hibridação das seqüências:

- ✓ Desnaturar a sonda por 10 minutos em solução de hibridação contendo 60% Formamida, 25% 2xSSC e 15% Tween 20 e em seguida mantê-la em gelo até o uso;
- ✓ Desnaturar as lâminas em Formamida 70 por 2 minutos;
- ✓ Desidratação das lâminas em série alcoólica (70%, 80% e 100%) por 3 minutos;
- ✓ Aplicar na lâmina 10µl da solução de hibridação (10ng/µl), cobrir com lamínula e levar à estufa a 37°C *overnight*.

Lavagens e detecção do sinal para sondas com marcação direta:

- ✓ Lavar por cinco minutos em 2xSSC a 70°C;
- ✓ Lavar em solução TNT [100mM Tris-HCl (pH 7.5), 150mM NaCl, 0.05% Tween 20] por 5 minutos para detecção;
- ✓ Incubar por 5 minutos a 37°C com tampão TNB (100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.5% bloqueador)
- ✓ Incubar por 5 minutos a 37°C com FITC conjugado com Avidina (10µg/ml) em tampão TNB;

- ✓ Realizar 3 lavagens em 4xSST por 5 minutos;
- ✓ Incubar por 5 minutos a 37° em anti-avidina (5µg/ml) em TNB;
- ✓ Realizar 3 lavagens em 4xSST por 5 minutos;
- ✓ Incubar por 5 minutos a 37°C com FITC conjugado com Avidina (10µg/ml) em tampão TNB;
- ✓ Desidratar as lâminas por 3 minutos em série alcoólica (70%, 80% e 100%);
- ✓ Secar ao ar;
- ✓ Aplicar 30µl de antifade com DAPI para análise.

Southern Blotting

Para a realização da hibridação das seqüências de DNA repetitivo em membrana de Nylon e verificar sua organização genômica foram feitas digestões parciais e totais para cada seqüência hibridada. As digestões foram realizadas de modo que foram retiradas alíquotas após os tempos estipulados, iniciando a retirada no tempo zero, que corresponde ao momento em que as amostras foram colocadas em banho seco a 37°C, e posteriormente nos tempos de 15 minutos, 30 minutos, 1 hora e *overnight*. Após a digestão as amostras serão submetidas à eletroforese, a uma voltagem baixa de 50 volts. O gel é então posteriormente fotografado e é iniciado o processo de banhos para a transferência das amostras contidas no gel para a membrana de Nylon. São realizados 2 banhos de desnaturação em solução de NaOH (0,5M)/ NaCl (1,5M), seguidas de 2 lavagens de neutralização em solução de Tris (0,5M)/ NaCl (1,5M). Monta-se então o gel sobre uma pilha de papéis mata-borrão imersos em solução 10xSSC (1,5M NaCl/ 0,15M Citrato de Sódio) para realização da transferência por capilaridade, coloca-se a membrana previamente imersa em solução de 2xSSC e sobre ela uma folha de papel de filtro seguido de uma nova pilha de papéis mata borrão, os quais farão com que a

solução presente na cuba de transferência suba até a pilha seca, trazendo consigo as amostras e realizando a transferência para a membrana em um período de 12 a 14 horas.

Uma vez finalizada a transferência marcam-se os poços e a posição da membrana, seguido de dois banhos por 5 minutos em 2xSSC. Coloca-se a membrana entre duas folhas de papel de filtro e incuba-se por pelo menos 1 hora a 70°C, tornando-a apta à hibridação. A sonda radioativa utilizada para hibridação nas membranas foi marcada com o “kit” comercial “Random Primers DNA Labeling System”, da Invitrogen, conforme instruções da fabricante. As sondas foram marcadas separadamente, com nucleotídeos radiativos do tipo $\alpha^{32}\text{PdATP}$. Os nucleotídeos radiativos não-incorporados às sondas foram retirados das soluções com a utilização da coluna “ProbeQuant G-50 micro columns” (GE Healthcare), seguindo-se orientações do fabricante. A sonda foi utilizada imediatamente.

As membranas foram previamente preparadas para a hibridação, agitando-se cada uma individualmente, em garrafa apropriada, em forno de hibridação (Amersham) a 60°C, durante 1 hora, embebida numa solução de hibridação 0,5M Na_2HPO_4 /3,5% SDS. As sondas radioativas foram então desnaturadas com 1 volume de uma solução 0,2M NaOH/2% SDS e imediatamente acrescentada à solução de hibridação. As membranas permaneceram no forno de hibridação a 60°C, sob agitação, por aproximadamente 16 horas. Decorrido esse período, as membranas foram lavadas duas vezes em uma solução 40mM Na_2HPO_4 /2% SDS, a 60°C, sob agitação no forno de hibridação, por 15min, e em seguida foram colocadas à temperatura ambiente para secagem. As membranas foram então expostas em cassete apropriado, com filme diagnóstico Kodak X-Omat. O tempo de exposição das membranas variou de acordo com a intensidade da radiatividade da sonda.

4.3 Resultados

A digestão do DNA genômico pelas endonucleases de restrição *Alu* I e *Hae* III gerou bandas de diversos tamanhos, cuja variação, contabilizando-se ambas as espécies, permaneceu entre 170pb e 750pb. Para o processo de clonagem, a escolha das bandas foi realizada com base em duas características, o tamanho do fragmento gerado pela digestão, havendo preferência para escolha daqueles de menor tamanho e maior intensidade da banda, a qual é indicativa da quantidade de DNA presente e, portanto aquelas de maior intensidade garantiriam uma melhor margem de trabalho. Tal processo resultou na seleção de três bandas para cada espécie, sendo duas delas oriundas da digestão pela endonuclease *Alu* I (Fig. 4.1 e 4.2), com aproximadamente 600pb/400pb para *G. carapo* e 500pb/150pb para *G. sylvius* e uma oriunda da digestão pela endonuclease *Hae* III (Fig. 4.3 e 4.4), com aproximadamente 250pb para *G. carapo* e 750pb para *G. sylvius*. A clonagem dos fragmentos resultou em um número variável de colônias positivas (brancas), variação essa, associada ao tamanho dos fragmentos, tornando-se mais difícil a clonagem quanto maior o fragmento em questão. As colônias foram triadas por PCR através da técnica de *toothpick* (Fig. 4.5 e 4.6) para verificação da inserção dos fragmentos de interesse e como resultados foram obtidas para a espécie *G. carapo* 30 colônias para a endonuclease *Alu* I (fragmentos de maior e menor tamanho) e sete colônias para a endonuclease *Hae* III. Com relação à espécie *G. sylvius* foram obtidas 15 colônias para a endonuclease *Alu* I (fragmentos de maior e menor tamanho) e apenas uma para a endonuclease *Hae* III.

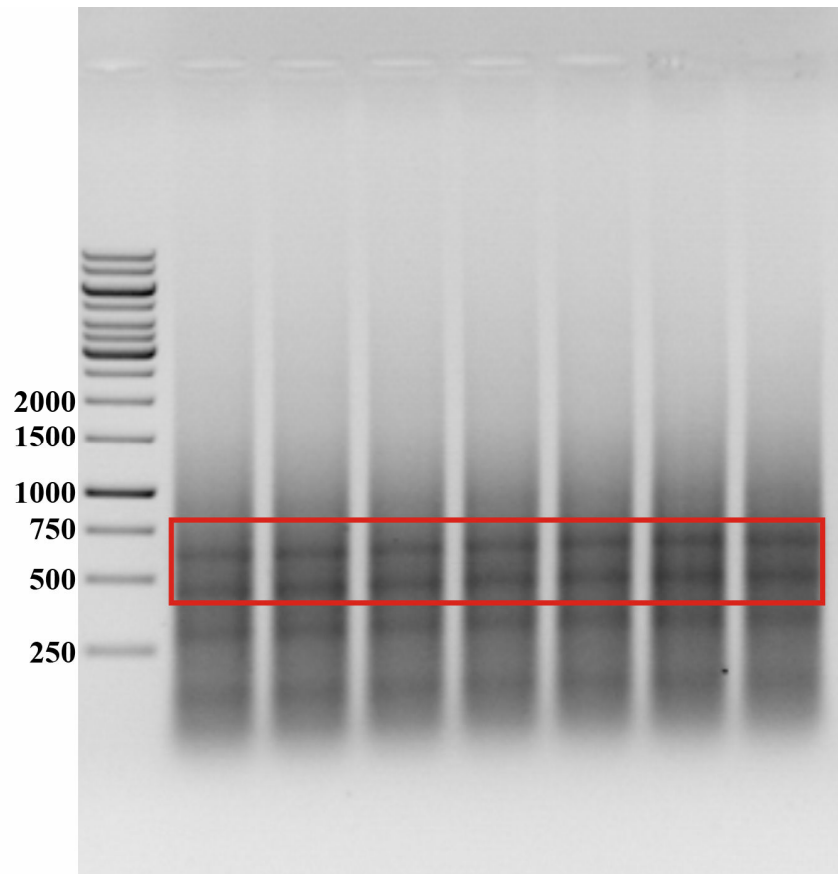


Figura 4.1: Digestão de DNA genômico pela enzima *Alu* I para a espécie *G. carapo*

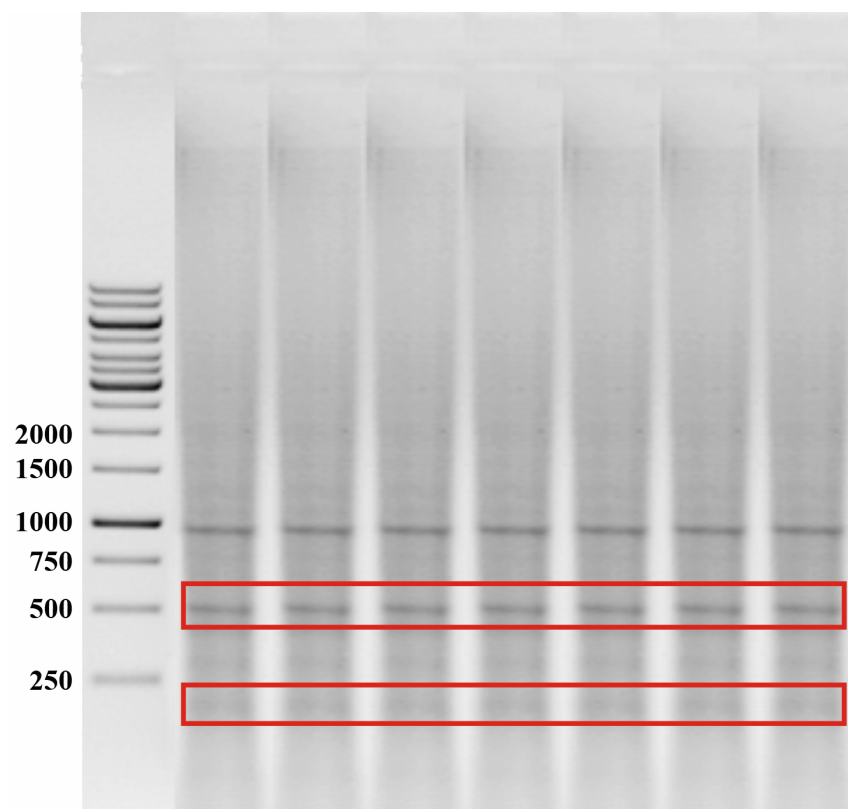


Figura 4.2: Digestão de DNA genômico pela enzima *Alu* I para a espécie *G. sylvius*.

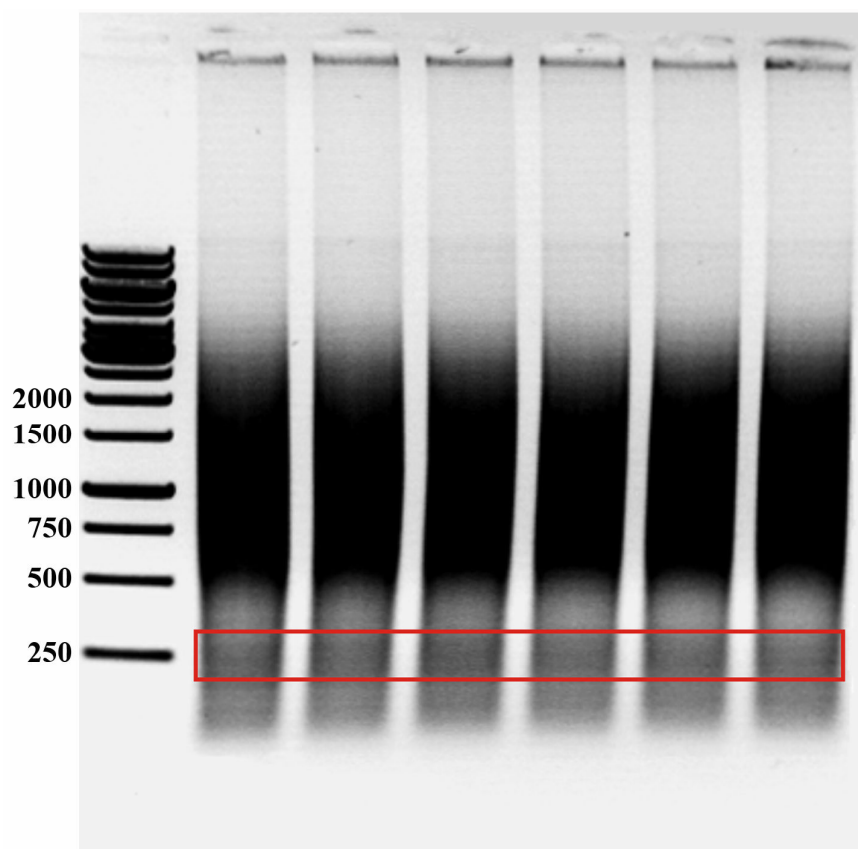


Figura 4.3: Digestão de DNA genômico pela enzima *Hae* III para a espécie *G. carapo*.

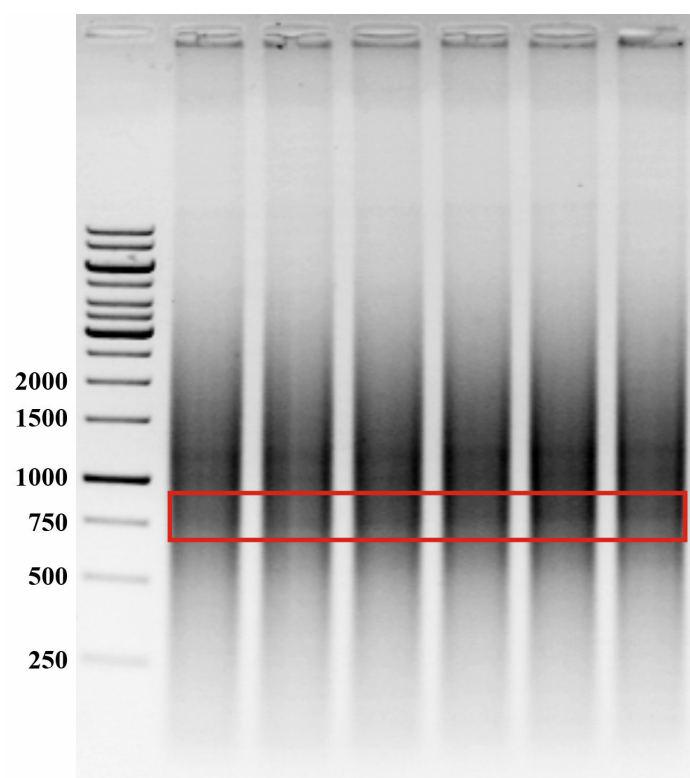


Figura 4.4: Digestão de DNA genômico pela enzima *Hae* III para a espécie *G. sylvius*.

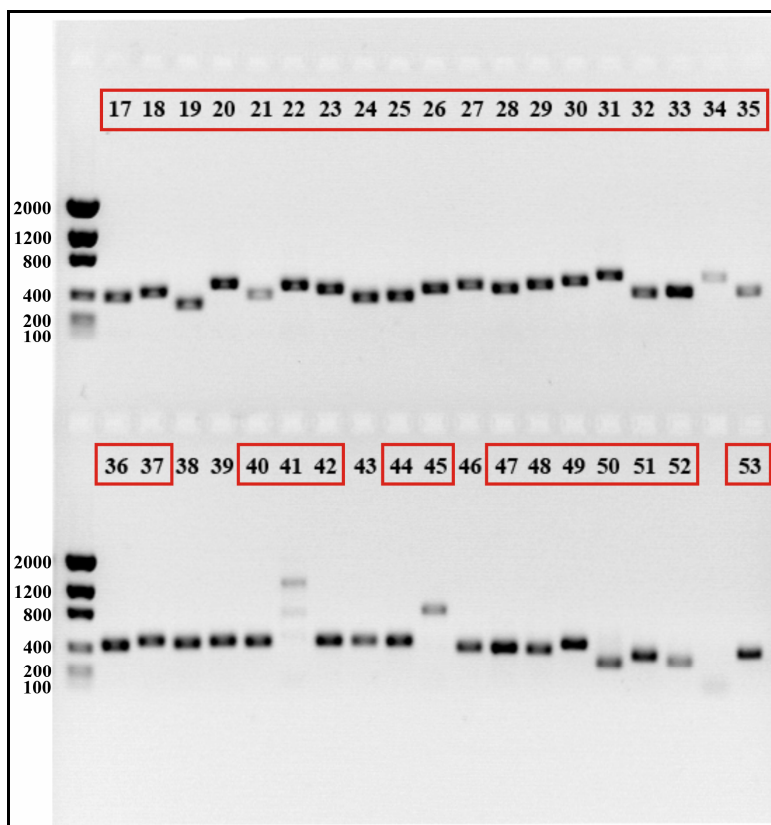


Figura 4.5: Gel de agarose contendo fragmentos resultantes da amplificação por PCR após a realização da técnica de *toothpick* para a espécie *G. carapo*. Fragmentos utilizados encontram-se destacados em vermelho.

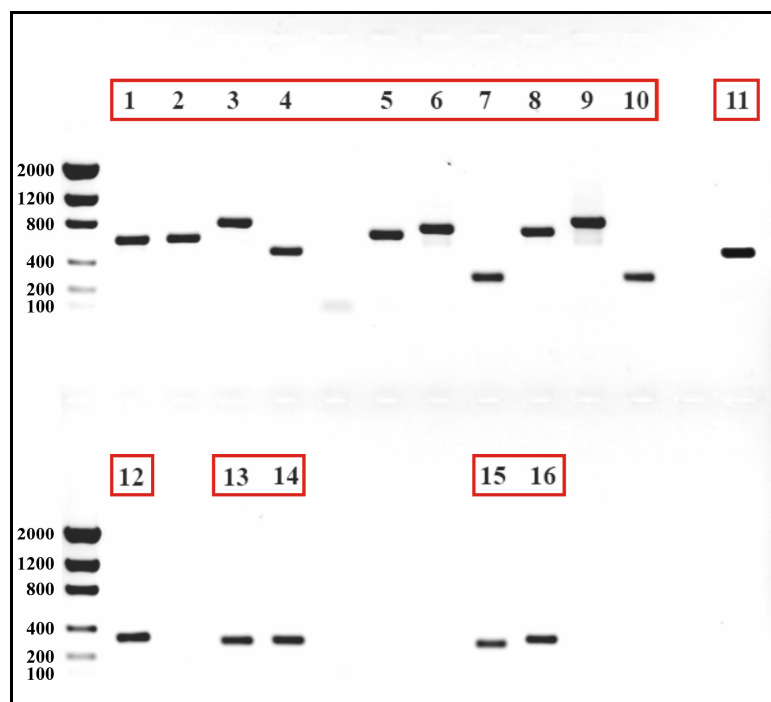


Figura 4.6: Gel de agarose contendo fragmentos resultantes da amplificação por PCR após a realização da técnica de *toothpick* para a espécie *G. sylvius*. Fragmentos utilizados encontram-se destacados em vermelho.

Todas as colônias que apresentaram fragmentos dentro do esperado após a realização da técnica *toothpick* foram seqüenciadas, totalizando 48 seqüências. Tal procedimento foi realizado, pois a eluição de bandas a partir da digestão do DNA genômico por endonucleases de restrição não fornece uma seqüência única, mas sim uma gama delas, fato o qual pode ser observado nas figuras 4.5 e 4.6, onde uma variação de tamanho nos fragmentos pode ser identificada. As seqüências obtidas foram então analisadas com o auxílio do programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* e alinhadas com o programa ClustalW disponível no próprio *BioEdit*. De modo geral, pode-se observar que as seqüências diferem significativamente entre si no que diz respeito a sua composição, entretanto apresentam algumas características comuns, como o predomínio das bases A e T, além da presença de padrões que se repetem ao longo das seqüências.

As seqüências de maior tamanho oriundas da digestão pela endonuclease *Alu I* para a espécie *G. carapo* (Fig. 4.7) apresentaram um tamanho aproximado de 400pb e o alinhamento, como já esperado, demonstrou a grande diversidade das seqüências. Puderam ser observados padrões de repetições, em especial nas seqüências 17 e 22, nas quais a ocorrência do dinucleotídeo $(TG)_n$ varia entre 10 a 25 repetições. Outras repetições puderam ser visualizadas, como os dinucleotídeos $(AC)_n$, $(GA)_n$, $(TC)_n$, bem como repetições mais elaboradas como $(CACCAT)_n$, entretanto tais repetições não formam blocos e encontram-se espalhadas ao longo das seqüências. Com o auxílio do programa *RepeatMasker*, foi possível ainda a identificação na seqüência 29, uma região que apresenta aproximadamente 79% de similaridade com a seqüência terminal (56 pb) de um elemento transponível do tipo SINE (Fig 4.8). Com relação ainda sobre a endonuclease *Alu I* para a espécie *G. carapo*, foram obtidas seqüências menores (Fig. 4.9) com um tamanho aproximado de 300pb, cujo alinhamento apresentou a mesma

característica já vista para as seqüências de maior tamanho no que se refere à diversidade de seqüências. Suas repetições, entretanto, são sensivelmente diferentes, sendo, neste caso, as maiores ocorrências de di e trinucleotídeos, como $(GG)_n$ e $(CCC)_n$, com destaque para as repetições do nucleotídeo timina, o qual está presente com até cinco bases. As repetições $(TG)_n$ verificadas anteriormente também estão presentes, porém em menor número e juntamente com as repetições verificadas nessas seqüências, não há a formação de blocos como visto anteriormente. A digestão pela endonuclease *Hae* III em *G. carapo* (Fig. 4.10), por sua vez, originou seqüências com aproximadamente 250pb e com algumas similaridades com as seqüências oriundas da digestão pela endonuclease *Alu* I. Pode ser verificada novamente a presença da repetição $(TG)_n$, bem como repetições mais elaboradas de trinucleotídeos, como $(GAA)_n$ e $(CAA)_n$, porém assim como nas seqüências menores obtidas pela digestão pela enzima *Alu* I, as repetições apresentam-se de forma esparsa nas seqüências, não formando grandes blocos, como já visto anteriormente.

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      5      15      25      35      45      55      65      75      85      95
17 -----
18 -----
20 GCCATCTTTT TGCCCTTTT CGGCAGTGT CTGTAATAAT TCTTGCCAG CCAATCACGG TGAAGTTGTG AATCGGACAT TATCCAAGGC CCTTTTTTCAT
21 -----
22 -----
23 -----
24 -----
25 -----
26 -----
27 -----
28 -----
29 -----

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      105     115     125     135     145     155     165     175     185     195
17 ----- -GATTTATGC AAGGGGAGTC ATTTTGTACA CCCTTGTTGT ACAACGTGTG TGTGTGTGTG TGTGTGTGTG TGT-GTGTGT GTGTGTGTGT
18 ACCATGGGGA ACATGTAC-C TTGCATGTCT GGCAGTCAGT CA--TGCGCG CGGCACACA CACACAAACA CACACACACC CAC-ACGCAC GCAAATGCGG
20 TCTTATCTTT ACACCTGTAA TAGGTACTCC AGGCTATGTG GACACCATAC AAAGACTGCA ACACAGATTG TATGAAGGCA CAGAGTCATT AGAAGTGGTT
21 -----AT ACTAAGGCCT ATGGAAGTGG ACAATGCAAT AG--CACCAG TAAGTG-AAA TGTGTAGTTG TCTCAATACT TTT-GTCCAT AT-AGTGTAT
22 GCCTGGGCAG AGAGAGAGGA GAGGAGGAAC AGAGAGGAGA AG--GAGGAG CAAATTAGGG CAGAGTACCA CAGGAGAATG A---CTCCCT GAGAAGAAGG
23 CTAAATACCT TACTGCCCAA CGACAGAAGT AGGGACAGAT GAAGGGTTAA TACACGTGAT ATATTAAGGA AATTATAATT TAT-CTGTCT CCAAAGATGA
24 -----TATG AAAGACCTGA AG--TACTAG AAGAGGTTGT TTCTCTTCCA TTATAAAATA -----TTAT ATTAATAACC
25 -----TCTAT GAGTAGTT-- CACAAAGCAC TTTTCTAAGT CA--CTCTGG TTAAGACCGA CTTATAAAGG CCAAAAAAAG -----GAAAC GTAAATATAA
26 TTTTGTGACAT TGATTTTTAT CTGCAAGCAT GTTACTTATT TC--TCTGAC CTCTTGCCCT CTCTCTACTT TCCCAGCACT TGT-CTTATT GTTAAGGGAT
27 ACTTTGTCAA TGTTTAATAG TAGGGGAGTA AATGTTCTTT TGCCTTCCAG GTTGTGGCTA CTCTGACTG CAATATTGCT GGTGAAGGAT GCTGATGGCC
28 TCCATTTCCC GTTAGTGTCC TTCGGGCTC CTTCGTTTTT GAGGTCCTGG AAAACTTCGG TGAAGAAGTG CGGGTCAGAA TTT-ATCTGC AGCATCTTGG
29 CAATTGCTCA AGATGTAC-- CAAAAATGAT AATTGTAAGT CG--CTTTGG ATAAAGGCGT CTGATAAATG CTGTA--- ----TCAAT CTACATCTCC

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      205     215     225     235     245     255     265     275     285     295
17 GTGTGTGTT- -----GTA ACCATCACCT CTCCCTGCAG GTGGAGTATG TCTTCACAGA CAAGACGGGC ACGCTGACCC AAAACAACAT GGAGTTCATC
18 CTGTGTGCC- -----TCC GGCCCTGCTA CCTCTTACTA TGCCAGATGG GAAGTGAGGG AGGGGATAAA GGGAGGAGGA GGAGGAGAAG AGAAAACAGG
20 GAGTTATTTT TCTGCTGTTG GGCTATTACT TCTCCTTTTG TTTTAAAGAG GAAGAACCCG GAGGAGCCCT TTCAAGACCT CCTTTTTTCAT GGCCGTTCTC
21 CTGATTAAC- -----ATT ATAAAAATA ATTTTCTTTC TTTAACTCCA TTTTTTAAA- TCTTATTTTA GTTATTGCAA ACACTGAATG TAACTTTATA
22 AAGACTTTG- -----CCC TGCTCTACAG TGCAC TAGAA AGTAATAATG AGTGTGTGT- GTGTGTGTGT GTGTTGAGAG AGAGTTGAAG GAAAAATACA
23 ATTATAAAGT TG-----CTA AGAGATTAAG GGAAGTTCAC TCTCTATACA TCTCCAAAAG GTAAGTGTAG GTTATAGGAT ATTCTAACA AACTTTTATA
24 ACCATAGCA- -----AGA AGTCATTACT TTTAAAGAGG GTTATTACAG TTCTCACT-- GAAGGTTTAT TFACTTGCTG TCA-TCCAAG TGTCATGAGT
25 AACCTTCAA- -----TTT AAGTATTCGC CACATTCACC TTTACACAAA ACACAT---- GAAGATTTAC TGTCCGTTTG TTA-AGCCTC TAT-TCTCTA

```

```

26   GTTGTTCT-  -----TTT TCTTCATTT C-TCTCTGTC TTTTCTTCTG CTGTTTTT-- GAGGATTTTC CATCCTTTTC TCCGTGGCTC T---CCTCTC
27   ATGCCGGTAG GAC----ACT GGTATGTTG GCCCGCAGAT ATTAATGCTC TGTATGTTC AGAGGTTGGC TTAATCTGTC CTTTTTTTTT TGTCCCTTTA
28   CACTCATTT- -----TGT GAATGATCCG CAGAGAGCGC TCCAGAACA CCTCTTTGTT GTGTCCACC AGGAAGGGCT TGAGCGGGTA CGAGATCTCG
29   ATCCTCCTA- -----ACC ATCACATCTC CATCTCCATC CTCCTAACCA TCACAT---- CTCCATCTCC ATCCTCATAA CCATCACATC TACATCTACA

      ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
      305      315      325      335      345      355      365      375      385      395
17   GAGTGCTGCA TTGATGGCTT CCA-----G TACAAGTACA CATCCAG--- TAGCAGCGAG ATCCAT--GA CTAGTAG--- -----
18   GCAAAAGGCG GATGAGAGTG TGGTGCT--G AATGAAGGGA GGATGGGCCA GAGACAGCAC CACCAAGCCA CTGGTGAAAT GTGAGCAGAT CCATATGACT
20   CTCCCATT A AATAGACTA TTGAACC--C TACTAGAGTT TTGCATCCTG CTC-CAGTAG ATCCATATGA CTAGTAG--- -----
21   ATGAGGAATT GCATCATTTA TAA-AGT--A TATTATTTCT CCTTG----- ----TAACAG ATCCATATGA CTAGTAG--- -----
22   GTAATTTTTT TTATTCTGTA TGTTATT--G TGTCTATTGA AATTGGAATG AAT-AAGCAG CTCTGTGTGT ATTTGTATGT GTTTGTCCTT GTGTCCTGTT
23   AGTTAATGAT GTACTGACCC CAGTGTAGTA ATGTGTTTAT GAATGAAAAT ACTCACTCAG ATCCATATGA CTAGTAG--- -----
24   GGGCAACATG GTTCACACTC TAAAACT--C AAAGGTGAAG ACGCACGCC TACATATGCAA ATCCATATGA CTAGTAG--- -----
25   CTCGATTGTT AGACAAAGAC TGA--AA--G CCTTCTTAGT GTATAAA--G CAT-TAGGAG ATCCATATGA CTAGTAG--- -----
26   CTCTGCTTCC TGTCTCAATC TGG--CT--G AATCCTCAA CATCTGAATG GAG-TAGCAG ATCCATATGA CTAGTAG--- -----
27   CAAGTGTGGA ATAAACATGT AAACCATGG TACAATGAAG AAGCACAGGA TATGGATCAN ATCCATATGA CTAGTAG--- -----
28   TTGCCCATAT AGGAGTATGC GAGGTACAAG CACGTGAGGA AAACGGC--- ----CTGGAG ATCCATATGA CTAGTAG--- -----
29   TCATCATCTC CATCACAGAT CAG--CA--G G-TTATCAGG AACTGA--G GAG-TAAGAG ACTAGTGGTC CAGATGGTGT CTGTCCTGCT GCACTCTGTC

      ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ...
      405      415      425      435
17   -----
18   AGTAG-----
20   -----
21   -----
22   TGTTTTAGGC TGGAGGCAGG AAGAGATCCA TCATGACTAG TAG
23   -----
24   -----
25   -----
26   -----
27   -----
28   -----
29   ACTGTACTGA ACAGATCCAT ATGACTAGTA G-----

```

Figura 4.7: Alinhamento das seqüências obtidas pela clonagem da banda de maior tamanho oriunda da digestão do DNA genômico de *G. carapo* pela enzima *Alu I*.

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
   5      15      25      35      45      55      65      75      85      95
DR1  -----T TATGAAGTGT GCTTCACACA GGTGAGTGGG CTTGACAAAC CACCTGTAGA AACACTCTTC TTTCTCTNTA AATAAAAAAA ATAAAAAACW
29  -----T TATGAAGTGT GCTTCACACA GGTGAGTGGG CTTGACAAAC CACCTGTAGA AACACTCTTC TTTCTCTNTA AATAAAAAAA ATAAAAAACG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  105     115     125     135     145     155     165     175     185     195
DR1  CTCCCCTTCT -TACTCTAGC ACTTAATTCT CTGAGCACTA ACAGTTCCCTT TGTATAAATTA GCACCTTCTTG TGTGTATTGC CTCTTCTTGT TGAATCGCTG
29  GC CCGG CAGT GAATTCGAGC TCGGTACCCG GGGATCCGAT CTGCTAAGTT GCCACTGTTG GGCCCTGAG CAAGGCCCTT AACCCCTCAAT TGC----TCA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|...
  205     215     225     235     245     255     265     275     285
DR1  AATGCCTCCT C-----AA TTGTAAGTCG CTTTGGACAA AAGCGTCTGC TAAATGACTA AATGTAAATG TAAA-----
29  AGATGTACCA AAAATGATAA TTGTAAGTCG CTTTGGATAA AAGCGTCTGA TAAATG-CTG TAAATCAATC TACATCTCCA TCCTCCT

```

Figura 4.8: Alinhamento da seqüência completa do SINE DR1 descrito para *Danio rerio* com a seqüência 29, obtida da clonagem da banda de maior tamanho da enzima *Alu* I da espécie *G. carapo*. Similaridades entre as seqüências estão destacadas em preto.

```

      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      5          15          25          35          45          55          65          75          85          95
36  --CTGAGGCC ACTAGACAAG AACTGCTGC- ----ATTCCCT GCATATTTG- GCTTTCCCAC T-TCTCTTAC TTCTCGTGAC TTGTCT---- -GTTAGTCCA
37  TGATATCTTT AATATCAGTA TGGTTC AATG TAGGAGGGCA GCGAAGACAT GGCAGTCTGC AGA-TGGCCT CTGGGAAAGC ATGTCC---- --CTAGGTGA
40  --ATGAGGTT ATTTTTATGA CCCTGTAATT ----AAATCA GTAAAAGCA- GTCAATGC-C AATGTC-TGT TTGCAGTGAA AAGTCT---- -CTGGTCAGG
42  --GCGAG--T GTTTTCTCG- --CTACAATT ----ACACGA GTAAGGGCA- AACAAATGTAC AGAGT--TGT ATTGCGCAAT GTGGGC---- --TCATGCAG
44  --ATGAGGTT ATTTTTATGA CCCTGTAATT ----AAATCA GTAAAAGCA- GTCAATGC-C AATGTC-TGT TTGCAGTGAA AAGTCT---- -CTGGTCAGG

      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      105         115         125         135         145         155         165         175         185         195
36  CAGCGTTATC TTATCAGT-- -----AACAA TGACACGTTG ----TAATGC TTTTTTTGTG CTTTCAGTTC TTGTTGATTC TCATGTCCTT --TTTCTCTC
37  CCCTGTTTAC CAAAGCCATT --GTCATGGA TACAATACCA TGAGTGAGCA TGTTTATTCT CAATGGTGGC ATGACAGCAG GACTGGCATA TGGTGGGCAC
40  TGGTGTCTAG AAGA-ATAC- ---AGATGAG TGGAAGTTCA ----TTGTGT TGTAGTCCAC TATAGAAACT ATTAAGATCC TGTTCTGGTA -ATAGGCTTT
42  TTATGCAAGA GAGACACACC C-AATATGTA TTGAAGATGA AATCTTATCC TAAAAGGGAA CAAAAGGAA AGAAAAGAATA CACAATATTA -AATAGTAAT
44  TGGTGTCTAG AAGA-ATAC- ---AGATGAG TGGAAGTTCA ----TTGTGT TGTAGTCCAC TATAGAAACT ATTAAGATCC TGTTCTGGTA -ATAGGCTTT

      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      205         215         225         235         245         255         265         275         285         295
36  TA----T-TT GGC--TGCGA CAGCAGAGGG GGAGACTGGA GGA----ATT GAGGAA---- CAGAGTGAGG TCCGGGGACC GTTGGTCT-- -----A
37  AG----TATC AAT--CTGGG CTTTTCTCTG GGGAACTGCA AAACAAGGGC A-CATG---- CACAAGACTC AACTTGCTCT GCTGCTTG TG---AAACA
40  TA----TATT CAC--TGAAG TGCCCG-AGC CTCGTCTGGA TAGTGCCGCT AACGTT---- GTCAGCAAGC ATTTCAAATT CTTGCTTT-- -----ACTTT
42  AA----TAAT CAC--TTAAA TAATGATAAT ATAGAAGAAA TAA----ATT AATGTT---- TTGCATTTTT ATTGTAGGTA GATCCTTTTG -----ACTTG
44  TA----TATT CAC--TGAAG TGCCCG-AGC CTCGTCTGGA TAGTGCCGCT AACGTT---- GTCAGCAAGC ATTTCAAATT CTTGCTTT-- -----ACTTT

      ....|.....| .....|.....| .....|
      305         315         325
36  AG---GATGT CCAGGAGC-- --AG-
37  AGGATGATAT TTTTGAAGT GAAG-
40  AC--TCTT-T CCCTTACTTT TAAAT
42  GTCATCTTAT AAGTAACTCG CAAG-
44  AC--TCTT-T CCCTTACTTT TAAAT

```

Figura 4.9: Alinhamento das seqüências obtidas pela clonagem da banda de menor tamanho oriunda da digestão do DNA genômico de *G. carapo* pela enzima *Alu I*.


```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      5      15      25      35      45      55      65      75      85      95
47 ---GTGGCCG TGGGGTAGC- ----- AGTACAGCAC ACCCCACTCC A-----GC GAAAAGCTGC TCTCCGATAA AGTGCCGAGG -----TGGGA
48 --AGCGAA-G CATTTAAAC- ----- GTGATTTTGG ATGAGAGGT- -----AT GATAGTTGGG TTCACAGCTT AGTATCGCA- ----TGGGTT
49 --TGCTGGTG TAGTTTGGCT ATAGGAGG-A GGCACAAAGA GTGGTGCTTC AGGACATGAT GAAAGACAGA ACCGCCACCT TAAGCCACAA GG--TGGAAA
50 -----A C-TTtagat- ----- CTCCCAAAAA ATGGC----- -----AG TTTTCA-C-- -----
51 ----AGACCC TTACCAAAC- -----A CTCTTACCAA ACACTCTT-- ----- AACAAACAGT CTCACAGCAG ACCCTTACC- -----AA
52 -----GTA CCCATAG--- ----- TCCGCAGCAG GTCTCCA--- ----- -----AGG TGAACAGC-- -----
53 --AGCGAAAG CATTTAAAC- ----- GTGATTTTGG ATGAGAGGT- -----AT GATAGTTGGG TTCACAGCTT AGTATCGCA- ----TGGGTT

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      105     115     125     135     145     155     165     175     185     195
47 GAGCTCTAAC TGTC----- --TAGACCGT GTCCTCCCTG AAGGG----- --CGGCGCCG GCGCGATTGG CAGCAGCCTT ACCTGCCGCT ATCTGGGCAC
48 GTTCACTCTC AG----- ATAAGAAAAG GATGGGTGGG GGG----- --AGAAGGGG GGATGTTTTT CACAATGCCA ACCAATGCC ACC---ATTC
49 ATGTCCTGCC TTGTGTTG-- CACGCATCAA AACTGGGCGG AGCCATTTTC CACAGGAGCC AATTATGCTG TGATGTGTCA GTGAGCAACA ATGCAGGTAA
50 ---CTCTGGC GT-T----- --GAGAGCAC ----- ----- -----AAAACG GTGTGT---- -----
51 ACACTCTTAC CAGT----- CTCATAACAG ACCC----- -----TTACC AAACACTGTT ACCAAACAAT CTC-----AC
52 ---CTCTGGC ATGT----- --TGGAACAA GGtagg---- -----TA AGGGAAGTCG GCAAGTCAGA TCC-----
53 GTTCACTCTC AG----- ATAAGAAAAG GATGGGTGGG GGG----- --AGAAGGGG GGATGTTTTT CACAATGCCA ACCAATGCC ACC---ATTC

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|.
      205     215     225     235     245     255     265
47 ATTAATGGTT TGATGATGCA AAGTGTTTCG TCCTGTCTGA G-CACATTC AGTCTGTGAG -----
48 CCTGTGCTTC TGGTGCTTTA AT-TACTGTG TTTCGTCCG- ----CATTAC -GTCAAAGGG -----
49 CAGTCATGTT TCAACCACAG GAAGATGCAG TTCAATGGGT GACTCACTAC ATGCAGAGGG GGTATG
50 -----TC TGGGG--TCA G--TTGGCTC TCCTGTTCa- -----GTG -----
51 AACAGACCCT TA-----CCA AA-CACTCTT ACCAAACAG- ----TCTCAC -----AACAG -----
52 ---GTAACCT CGGGA--TAA GGATTGGCTC TAAGGGCTG- -----G-----
53 CCTGTGCTTC TGGTGCTTTA AT-TACTGTG TTTCGTCCG- ----CATTAC -GTCAAAGGG -----

```

Figura 4.10: Alinhamento das seqüências obtidas pela clonagem da banda oriunda da digestão do DNA genômico de *G. sylvius* pela enzima *Hae* III.

As seqüências de maior tamanho oriundas da digestão enzima *Alu* I para a espécie *G. sylvius* (Fig. 4.11) apresentaram um tamanho aproximado de 700pb e inúmeras semelhanças com as seqüências obtidas para a banda de maior tamanho na espécie *G. carapo*. Uma vez mais a ocorrência do dinucleotídeo (TG)_n se faz presente, chegando a possuir blocos com mais de 20 repetições como no caso da seqüência 6. Verificou-se ainda a ocorrência elevada de outros dinucleotídeos como (TA)_n, (TC)_n, bem como de trinucleotídeos como (CAA)_n, porém nenhum deles formadores de blocos, além de claro dinucleotídeos simples, como (AA)_n, (TT)_n, que possuem uma incidência mais pontual na seqüência. Com relação às seqüências de menor tamanho, aproximadamente 150pb, ainda relacionadas à enzima *Alu* I (Fig. 4.12), temos aqui um diferencial em relação à espécie *G. carapo*. Pode observar-se que além do dinucleotídeo (TG)_n, o qual tem se apresentado comum a grande maioria das seqüências, foi encontrado em *G. sylvius* o dinucleotídeo (CA)_n formando um bloco com mais de 20 repetições. Verificou-se ainda a presença do dinucleotídeo (TC)_n, o qual apesar de ser encontrado disperso, porém é constante nas seqüências em questão. A digestão pela enzima *Hae* III na espécie *G. sylvius* (Fig. 4.13) originou seqüências com tamanho aproximado de 600pb e uma vez mais o dinucleotídeo (TG)_n se fez presente, originando um bloco com mais de 10 repetições. Como já verificado anteriormente, foram encontrados ainda dinucleotídeos, como (TC)_n, (TA)_n, (AA)_n, (CC)_n, que diferentemente ao dinucleotídeo (TG)_n, encontram-se dispersos ao longo das seqüências.

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      5      15      25      35      45      55      65      75      85      95
1  -----
2  -----
3  -----TT TTTTAAAAC CCCCCGCCAC GGAATTGAGC TCGGACCGGG GATCGATTTT TGGGAAATTA CCCTGAGCAG AGTCTTGGTC
4  -----
6  -----
7  -----
8  -----
9  -----
10 -----
      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      105     115     125     135     145     155     165     175     185     195
1  -----AA TTCGAGCTCG
2  -----AA TTCGAGCTCG
3  ATAGCCTTTA ACTCAGTGAT TGCTGTGGGG TTTTCTTTTT CTTTTTCCCT CCTCTCTCTC TTCTTTCCCC TGAAAACACA CCCCCCGGTG TTCAGTGGTT
4  -----
6  -----TTTTAAAA CCCGGCCAG TGAATTCGAG CTCGGTATCC GGGGATCCGA TCGTTTCAGG TCCAGGTAGA
7  GGACAAAATA TATATTACAA AATGTAATTT TATTATTTTG AAAATATACT GAGGTAGAAA CTAAAGTTGC AAATAAACCA CCTTGTCAAG CAAGATCCAA
8  -----
9  TGTGTGCTCA AAAACACCCT GATGACTACG TGTGTGTGCG CGCATGCCTG TGTGTGTAAC ATGGATTTGA GCATCGACTT CAGTGTAAAA CTCTAGAATA
10 TCTCTATTAG AGTACATGAG TACATATTAG AAGGTACATT ATTTACACCT GCCATAACAC TACAGGGAGG GGAAACATCA CAGTGTCTGT TACCAAAAATA
      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      205     215     225     235     245     255     265     275     285     295
1  GTACCCGGGG ATCCGATCGT ATCAGCTAAC ----- --AAGGCAAA CACTCTTCTG TTGCACCAAT TAGAAGCATG TGTCATATTT ATAAATATTT
2  GTACCCGGGG ATCCGA-TCT TTCACACTTA CTATAACTGC CTGGAGGAGA TGCTCATATG AGAAAGAAAGT AAAGAATTGA TGGATTGTAA AATTGAACT
3  TGACCTGAGT AGAAGAGAGG TCTAACTTCA GTGTAATAAA GCGATAGAAC CCCACTGATG GTTCAGTAGT CTGAACCGGG GGGGGGGGGT GAGCAAGGAA
4  -----
6  GGACCAGCCC TCCTGAATGG GCCACATCAC ACAGGAATGA GAGAAGGACA TTAGGAACGT GTGTGTGTGT GTGTATATGT GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT
7  AGGAGGACTT TATTTTCACT ACTCTACCCT GTGA--GGCT ATATGGGTTA ACTCTCAATT GTGGTTGTTT TTATTATGCA TTCTCAGAC TGGCATTAT
8  -----
9  GAATATGCCT TTTAGAATGT TTTATCCAGT TCCTGATTTA GGAAATTAGG ATAGAAG-GA GTAAACGGTT AGAGATCTGG CTTAACCTGG AGGAAAGAGC
10 AATGCCTCTT CCTTGA-TTA CAGATACAGA CAGACTGTTA GGATCAC TGA TGTAAAAAG GCGGACAAAT TCAAAATTAG AAACCTAAC CAGGAAAAGT
      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      305     315     325     335     345     355     365     375     385     395
1  ATAAATGAAG AAGCATT--T TCTCTGTGGC CCTGTACACA CGAAAATGAC CTTTATGGCT GTGGCTATTG T---AATTAG GTTTAGCAAA CTATAACATT
2  GTCAGTAAAA CAATGCTT-G CCAATATTTT TT-GTCAGTA TTGTTGCAGG CGTGAACAGG CATTCCAAAA ACATTCCGCA GTGATGGCAA ATTTCTAATC
3  CCCTCTAACA CCTTCCATGG TGCAAAACTG CATGCGACAG TGCAGCCCTC AGTCCCGCAC AGACATATGA TGTCTGCAC ACAGCAGGTG AACTGCACA
4  CGGTACCCGG GGATCCG--A TATATTAAAC TTCATGGCAT TTATTTTATA GTTTATTCCT TTGTGTATTA ---ACCTAT TCCCCTATA GTTCTAATT-
6  GTGTGTGTGT GTGTGTGT-G TGTGTGTTTC TGTCTGCATT TATCTATGTA CACAACCACC TTGCACTTCT TTGCATTTAT ATTATAGGGG GCATTAATG
7  TTCTTTTGGG TTCTTT---T TGAATTTCTT CTGAGAAGTG TTAATCCTA TCTGAATTGC CTGTACAGAC TTTTATTTGG GGGATCTTCG GTACTGAATT
8  -----
9  GAGGGGGGAG GAGGTCA--G TGCACAAATG TTTCTCTTCT TGCTCTTGA TTTCTCTTAA AAGCATCTGA TGATGCTTAC CTGCTCCAGG TGAATGTTT-
10 TGG-ATGAAT ATTTTAAAGA GATTTGCTGA TTAGTTGATT CATAGTAAGA ATGCA-ACGT GAGAGTTACA TAACATTTTT ACAATGACCT TTACAAAGGC
      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      405     415     425     435     445     455     465     475     485     495

```

```

1      TT----- ACTG-CTGTG AAATT-GATT AGCCTACAAC TTTGTGATTA GAATGACTTA AATCTGGTCA TGCAGACATA GTATTTTACT TTAGTCAGAT
2      TAT----- TACA-AAGTG GAAGA-TTCT TTCTAACGGC CTGGCCCTTCA CATCAAGCCA AAGCGGAGGG G--CTCCAAG GTTGGAGGGA TTAACCCGCT
3      CTACAGTCC- CGCATGAACG GACTAAGACC TGCACATAAC ATGTTAACTG CACCCACACG TCCTGCACAA A-TGTACGAA GTCCTGTACA CAGCACAT--
4      -T----- TGAT-GTGAA CATCA-TATT TGCTATGTAA CTTGTATGTT GTCATTTTCA- CATAAGGCTC A--TTGAAAT ATATTGAATA CAGTATA---
6      AT----- TACA-GTTAA TAGTG-GAGT AACGGACAGT GTATTTTGA GCATTGACAC TATTGTGGTA A--TGGTATG GTAGTGGGTG TTTAACC---
7      GT----- TATTTATTTCG TTGTA-AATG AGAACTGGAT ACACATTTCC TCATTGGGAA AATTTCAATA ATCAAAAATA ACCCTGTCTT TTGAAAATCA
8      ----- -GAT CCCATTACACA ATGCA----- --CTGTGCT- TATTT-GTGA ---ATATATT GTAAAACG-A CCGGCCA---
9      -T----- TGTA-GATCA CAGTC-TGGT TCCACTCAGG ATTCTGGGTC TTCTGTACA- TATTTAGTTC ---TTCTCTT GTTTTCAGCA CTGAAAT---
10     CAGGTCAAG- AGAGCAGCTA CAGTAGTAAA AGGGACTCAC ATGGTGTGTTG TTCAGGGCAA TTTGTATATGA C-TTTTTAGT GCTTTTAACC TGAAACTCCT

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      505      515      525      535      545      555      565      575      585      595
1     -ATAATCAAA TAGTGTTTAG AT---AAAAA TAGTGGTTTT TTGGGACCGT CTTA----AT CTAGGTGTTA T--GTTTCAA ATGGCACATT ACTCAGTACC
2     GACTCTCATG ACATCATGCA CA-CC-ACCT ACATGTGTTA CTTCAAATGC TGA-----GT CATACTGTTG T--T--TCGT GTTTTATCTA GTTGTAAGTG
3     -GTTAGCATA TAACAGTGTA CATAAC-ATAC AATGCTATCT TCAAAAGTGC ACAA---AC TTGTTTCAGT TAATAATGAT TAGACTATAG CCATGGAGCA
4     -ATCTTCATG ATG-TTC--- ----- -CTTTTCC CCAGGGACTC TGG-----AT CAG-CCCAGG T--T--CCAC TCACTGTCCC T-GACACCAT
6     -ACTAATGAA CAGGTGCTGG T--CA-AATC AAGCATTTC CAGATGGGC TGT-----GC AATACTCAA C--TGTCTAT ATGCTGTGTT TAATCAATTT
7     CCTCTTCCTG TGTGATGTCA ----- -TCAGTCT GCAAAGTCTGT CAACC---AT CACCATCCTG T--TTCATAA ACCACATTTT CCGTGTGCTA
8     -GTGAATTCG AG----C--- ----- -TCGGTAC CCGGGGATCC GGA-----AT C--GTCCGA C--C---AC TCTGCCAG-C --ATTACATA
9     -ATCATTATG AGGACAC--- ----- -CAAATTT TTAGAGACAG GAT-----AT CAAAGTCAGA C--C--TCAC TCACTCACTC --ACCAAAGA
10    GATCCCTGTG TAAACTCTTC CTTGT-ACCT TGCTCAGTGT GCACCCACGA CAACAGA-AG GCCAGGCAGG TGCTACTGTT TTAAGGCCG TGACGAGGGG

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      605      615      625      635      645      655      665      675      685      695
1     CCTTCACCAG TG----- -AGTGTG TACCACATGT GATGAATATT AGTGTCTTTT TAGCACTGAT TTAGAAACAC ACCAATTCTT AATGAAGT--
2     CCCTGCCATG GA----- -AATACT CAAAAAATAA TGGCCTTGCC AG-GGATTCA AACCCATGTC ---CTACGC AAGTGCCTTG ACC-AC-T--
3     GGCTAGCAGT CAGTATTGTT CACTAGCGTC CTAATTACTG ATCAAATTTT ATTTAATTTCC ATAGAGAGGC ATTACCTCAA ACATCTCATT AGCCACCCTA
4     CACCACGTGG GA----- -GACAGA -GACTTTCTG CCTGTCCCCC AG-GGGTCTA GGACTCGCTC CTCCTGCTGA ACTCACAGTC TTC-CAGC--
6     TGCCACAAAA TG----- -GCCACTTG TATATAACTC AATTTTCAG-G ACAATATGTT GCTGGTGTCT ----TTCCTG AGCAGTCTAC AGT-AGGT--
7     TACAGACACA CA----- -CGTACA TATACTCAGA AACACATTAC AT-ACACCCA TGTCGATCAC AGCAGGGCAT GTGCAC-TTC ACATAAAC--
8     TATTACAAAA TA----- -AGCA-- -CAGTGC ATTGTGAATG GG-ATCTTAA CCCACAATC ----TCGCAC ACACACACAC ATT-ACAC--
9     CCTCACTCTG TA----- -AACA-- -CTACAA ATTTGGGAGC AC-ATGTTTA CACAAAAAT- ----TGAAAC GGGCACAAAC ACC-AAGC--
10    TCACAGCGAC TGCC----- TGCTATCACA ACTATTCTGC CTCACAGGG GGGAGTGCCC ATTCCCTTTT TGCCCAATAT ATTTAATTTCC TATAACATCC

      ....|....| ....|
      705      715
1     -TTAAATATT CAC--
2     GCACCAAAGA GC---
3     GTAATGAAGA TGAAG
4     -CCTTCTTCC TGG--
6     GTTAGCTATC CC---
7     ACAAGGCCCT GCTCC
8     ATCACACATC AC---
9     AT-GTATTCT T----
10    ATTCTATCCA AGGGC

```

Figura 4.11: Alinhamento das seqüências obtidas pela clonagem da banda de maior tamanho oriunda da digestão do DNA genômico de *G. sylvius* pela enzima *Alu I*.

```

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      5          15          25          35          45          55          65          75          85          95
12  AGGCTTAGCC TGGCCCGCCC AC----- -TCAGCCATG GCCCGCCAC TCAGCGCTCT CCTC-GAGTC AA-CACGTCA CAG-CACGGA GAGACACGAC
13  ----GCAATG AACT--GGTC ACCTG----- --GATTCATA T----CCTAT T-ACGCTTTT -----AGCC TCTCGCTACT TCAGTGCTC- -CCGAATATC
14  -----ACA GAGACTTCAC ACT----- -TCAGAAATC -----CAT GCAGT--TAC -TTC--ACTC ACTCACA-CA CA--CACAAA CGCACACA--
15  -----TT  -----CTCTG ATCT----- -CAAGTGATG -----TAC GTAAC--TTT GCTC--GCTT TCTCACA-CA CA--CACACA CACACACA--
16  ----CTACTG AACTCTACTC ACTGGTT--- -TGAATCATT TA--GCCTAT CCAAGTGTTT GTAA-AAGGT GACTGCGATC CAACTACCCA TCCGCAAGGC

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.
      105         115         125         135         145         155         165         175
12  AGGAGTATGG CTGAGAGGGA GAGAAGCGCC GTTTGGCTTT ATTTTACCGC AGAAACCGAA ACTACA-GCA AGA---
13  TCTCT----- -ACAGGCCTT ----- --CCTCTTGT AAAGGGT--- CTCAGAGG-- AGAGA-
14  -----TTTAG CTCACACTCA CCTAATTCCT ATTAG----- ----TAGTGC AATCTCC--- ---ATT-GCA AGAA--
15  -----CACA- CACACACACA CACA--CAC ACACA----- ----CA-CAC ACACACA--- ---ATATACA GGA---
16  TCTCCGGCTA CAGTACATGA CACAAGCATT GTGATG---- --CTGACTGA AAGATTT--- TTTATCTGTT AAAGA-

```

Figura 4.12: Alinhamento das seqüências obtidas pela clonagem da banda de menor tamanho oriunda da digestão do DNA genômico de *G. sylvius* pela enzima *Alu I*.

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 5      15      25      35      45      55      65      75      85      95
11a AACATTTTGT GACAATTGA~ TGCTGGCATT T-GCTGTCCA GAGGAAGA~G CCTTCCATTG AAGCACCTGA CA--GTACAA CCTCATCTAT CATGGAACAT
11b AACATTTTGT GACA~TTGAG TGCTGGCATT TAGCTGTCCA GAGGAAGAAG CCT~CCATTG AAGCACCTGA CACGGTACAA CCTCATCTAT CGATGA-CAT

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
105     115     125     135     145     155     165     175     185     195
11a GTGTTTTTGT TGTCTTCCCC ATGACAATCT CCCCATTAGT GGTGTGGGAG ATTTGTGCAT GTACCACCTG CCAGCTCAGT AAAATATCAA TGAAGCCCAT
11b GTGTTTTTGT TGTCTTCCCC ATGACAATCT CCC-ATTAGT GGTGTGGGAG ATTTGT-CAT GTACCACCTG- -CAGCTAGCT ACAATTACAA TGAAGCACAT

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
205     215     225     235     245     255     265     275     285     295
11a CACGGA---T TTGCTAT--A AAAGGGTCAC AGTTTTTGAC CAAAATTCT TTAACACCC- TGTGTGGGCA CAAAGGCC-G ATTTTGGCCC ATTCC-TCAA
11b CACAGGGATT TCCCTATCAA AAAGTGTAC AGTTTTTGAC C-AAAATTCT T-AACACTCG TGTGTTGGCA CAAAGGCCCTG ATTTTGGCCC ATTCCCTCAA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
305     315     325     335     345     355     365     375     385     395
11a C--AAAGACC ACCCCA--CC TTGGTGTGA GCTACCATT- AACCATTTCT G--CTGTGTT CTTTGTCAAG C-TTTCATT T~AGG~TGTG TGTGTGTGTG
11b CAAAAGACC ACCCCCACCC TTGGTGGTGA ACTACCATTT AACCTTTCTT GCCTGTGTT CTTTGTCAAG CATTTTCATT TTAGGGTGCT GCTGGGTGTG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
405     415     425     435     445     455     465     475     485     495
11a TGTGTGTGTG TGATCTGGGG GGATGTATTT CAGGG~TTAC ---CTTTCTA TT--ATTGTC TGATACAGAA AAGAAATCTC CTTC---CCC TTTGAGAAAT
11b TCTGTGTGTG TGCGGAGTCG T~~~TATTT CAGGGGCTAG CTACTTTCTA TAGGATTGGC TGATACAGAA AAGAGATCTC CTTCCTCCCC TTTGAGAAAT

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
505     515     525     535     545     555     565     575     585     595
11a GCAATGCATA -GATG-AAGT C-AGAAAGTGA GT-CAGCTGG AAAACACGAA CA--TAGAGC AAGATCAAAG TATGTGCCTC TAAAGATTTA TTACAGCAGG
11b GCAACGCATA TGATGCAAGT CAAAAGTGA GTTCTACTGG AAAATACACG CAATCATGAG GAGATCAGA- -----

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
605     615     625     635     645     655     665     675     685     695
11a CATATACGTA TCCACACAAA TGCACCTTCT TTGGTGGAAAT ATCCACACAA CGTGTGACA CTCTCTCTCT CTTTATCTCT GACCGTTTTT CTCTGTCAAG
11b -----

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
705     715     725     735     745     755     765     775     785     795
11a GAGCATGGCT CTTAAGAAAA TCATATCGGT TTCGGTTCCT GGAGACACCG ATTGGCTCAA GCCATCAGAG GATCCATATG ACTAGTAGAT CGCTGGAGGA
11b -----

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
805     815
11a GTCGACCTGC AGGCACTGCA
11b -----

```

Figura 4.13: Alinhamento das seqüências obtidas pela clonagem da banda oriunda da digestão do DNA genômico de *G. sylvius* pela enzima *Hae* III.

Após o seqüenciamento e análise das seqüências, seis delas foram escolhidas para hibridação *in situ*, para localização genômica das seqüências em questão, sendo o critério para escolha a presença de características marcantes inerentes à seqüência em relação ao grupo ao qual ela estava associada. Foram então hibridadas as seqüências 22, 40 e 45 para a espécie *G. carapo* e 2, 6 e 11 para a espécie *G. sylvius*, as quais representam, para ambas as espécies, respectivamente, as bandas oriundas da digestão pelas enzimas *Alu* I de maior e menor tamanho e *Hae* III. Devido ao fato de a hibridação ter sido realizada com apenas uma seqüência obtida pela clonagem de cada banda, elas passarão a ser denominadas seqüências *Alu* maior, *Alu* menor e *Hae*, facilitando sua identificação e menções futuras.

A fim de verificar se as regiões onde ocorreu a hibridação das seqüências correspondem a regiões heterocromáticas do genoma, foi realizada a técnica de bandamento C (Fig. 4.14 e 4.15), a qual permitirá uma análise qualitativa das seqüências em estudo.

A hibridação *in situ* das seqüências selecionadas para a espécie *G. carapo* revelou um padrão de ocorrência em geral disperso, apresentando em alguns casos um acúmulo em determinadas regiões em alguns pares cromossômicos. No caso da seqüência *Alu* maior (Fig. 4.16), obtivemos o padrão mais disperso dentre as seqüências, uma vez que a grande maioria dos cromossomos apresentou sinal, sendo ele específico em apenas um par metacêntrico, onde verificamos uma concentração do sinal em apenas um dos braços. Com relação à seqüência *Alu* menor, ainda para a espécie *G. carapo* (Fig. 4.17) é possível notar um padrão com maior especificidade, uma vez apenas alguns pares encontram-se completamente marcados, enquanto que o restante apresenta sinais nos braços longos de inúmeros pares e ainda a presença de sinais pontuais tanto ao longo dos braços, como em regiões próximas aos centrômeros, padrão de hibridação o qual difere sensivelmente em relação ao bandamento C da espécie em questão. Dentre as seqüências já mencionadas para

a espécie *G. carapo*, a seqüência *Hae* (Fig. 4.18) é aquela que apresenta os sinais mais dispersos, sendo encontrados pequenos aglomerados ao longo dos cromossomos. Entretanto, apesar dessa característica peculiar, obteve-se uma marcação muito forte no braço de apenas um par cromossômico, indício de um grande acúmulo da seqüência nessa região, além de algumas regiões pericentroméricas.

A hibridação das seqüências na espécie *G. sylvius* apresentou de modo geral, um padrão similar aquele verificado para a espécie *G. carapo*, entretanto possui características próprias, não verificadas anteriormente. A hibridação da seqüência *Alu* maior (Fig. 4.19) demonstrou ter um padrão de distribuição genérico, possuindo marcações em pares cromossômicos inteiros, tal qual visto anteriormente para *G. carapo*, entretanto com maior especificidade, apresentando marcações pontuais em alguns pares. A seqüência *Alu* menor (Fig. 4.20) gerou um padrão muito mais pontual, apresentando marcações pequenas ao longo dos cromossomos, bem como houve uma maior concentração das seqüências nas regiões terminais de muitos pares cromossômicos. O bandamento C apresenta em alguns pares uma marcação terminal, a qual pode estar associada à ocorrência da seqüência *Alu* menor, indício de que ela teria certa significância na heterocromatina da espécie. Entretanto há marcações que não estão associadas a essas regiões heterocromáticas e nesse caso podem estar associadas a regiões teloméricas, sejam em regiões adjacentes ou mesmo associadas a elas. A seqüência *Hae* (Fig. 4.21) evidenciou um padrão similar aquele verificado para a seqüência *Alu* maior para a espécie *G. sylvius*, fornecendo uma marcação com um padrão de distribuição genérico, também com marcações em pares cromossômicos inteiros. Apesar desse padrão genérico, foi possível identificar em alguns pares uma marcação preferencial, a qual evidencia a concentração da seqüência *Hae* em regiões pericentroméricas e em alguns casos teloméricas.

O possível SINE identificado em uma das seqüências da espécie *G. carapo* demonstrou padrão de hibridação disperso, porém, diferente em relação às seqüências previamente hibridadas, evidenciando braços curtos de muitos pares, regiões centroméricas e pericentroméricas e em alguns casos cromossomos inteiros, demonstrando uma localização preferencial desse elemento no genoma (Fig. 4.23). Já para a espécie *G. sylvius* observa-se um padrão similar aquele visto para *G. carapo*, porém verifica-se uma localização mais pontual, evidenciando poucos pares cromossômicos como portadores das seqüências (Fig. 4.24).

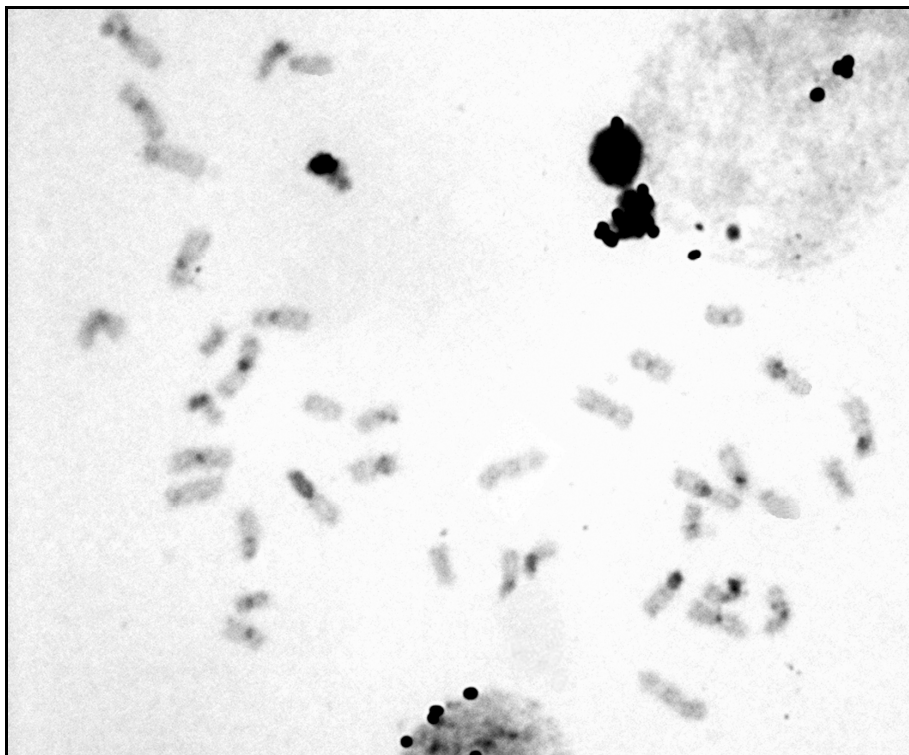


Figura 4.14: Técnica de bandamento C aplicada à espécie *G. sylvius*.

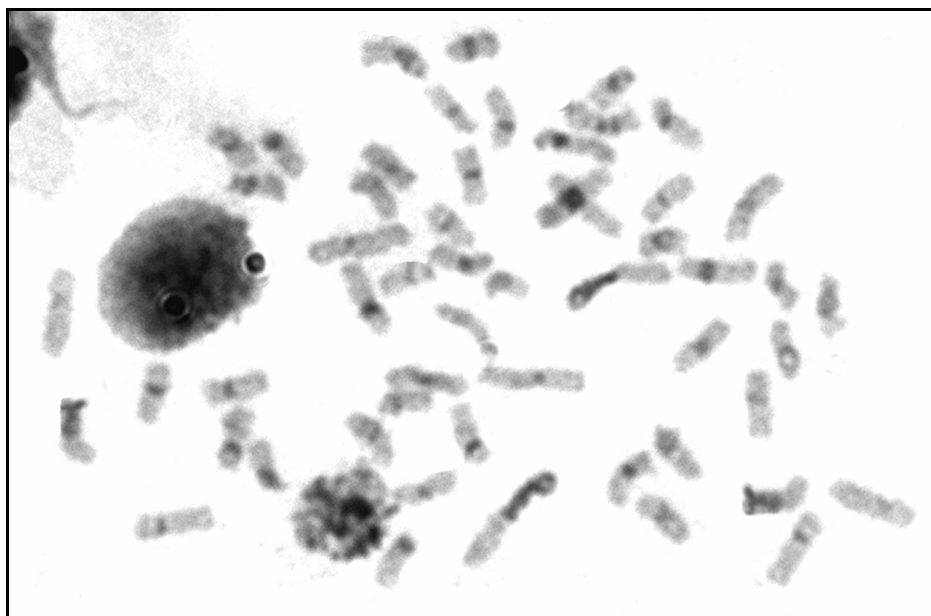


Figura 4.15: Técnica de bandamento C aplicada à espécie *G. carapo*.

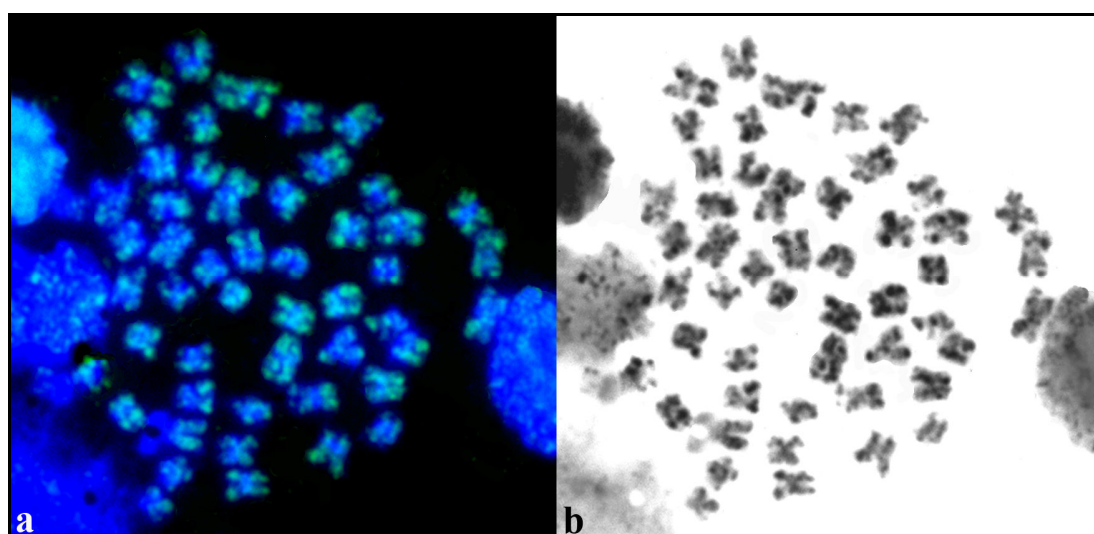


Figura 4.16: Hibridação *in situ* para a espécie *G. carapo* com a seqüência obtida pela clonagem de fragmento de maior tamanho oriunda da digestão do DNA genômico pela enzima *Alu I*. (a). Figura à direita (b) corresponde à mesma metafase visualizada invertida em branco e preto, onde a intensidade do sinal de hibridação é representada pela cor preta. Seta indica par cromossômico com marcação diferenciada.

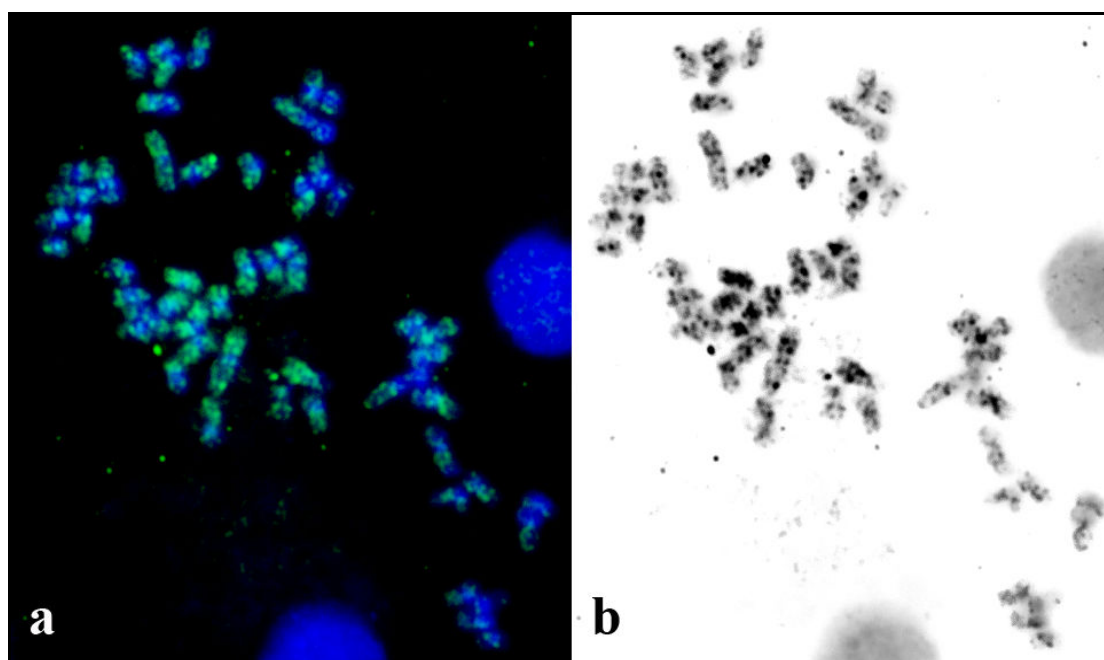


Figura 4.17: Hibridação *in situ* para a espécie *G. carapo* com a seqüência obtida pela clonagem de fragmento de menor tamanho oriunda da digestão do DNA genômico pela enzima *Alu I*. (a). Figura à direita (b) corresponde à mesma metáfase visualizada invertida em branco e preto, onde a intensidade do sinal de hibridação é representada pela cor preta.

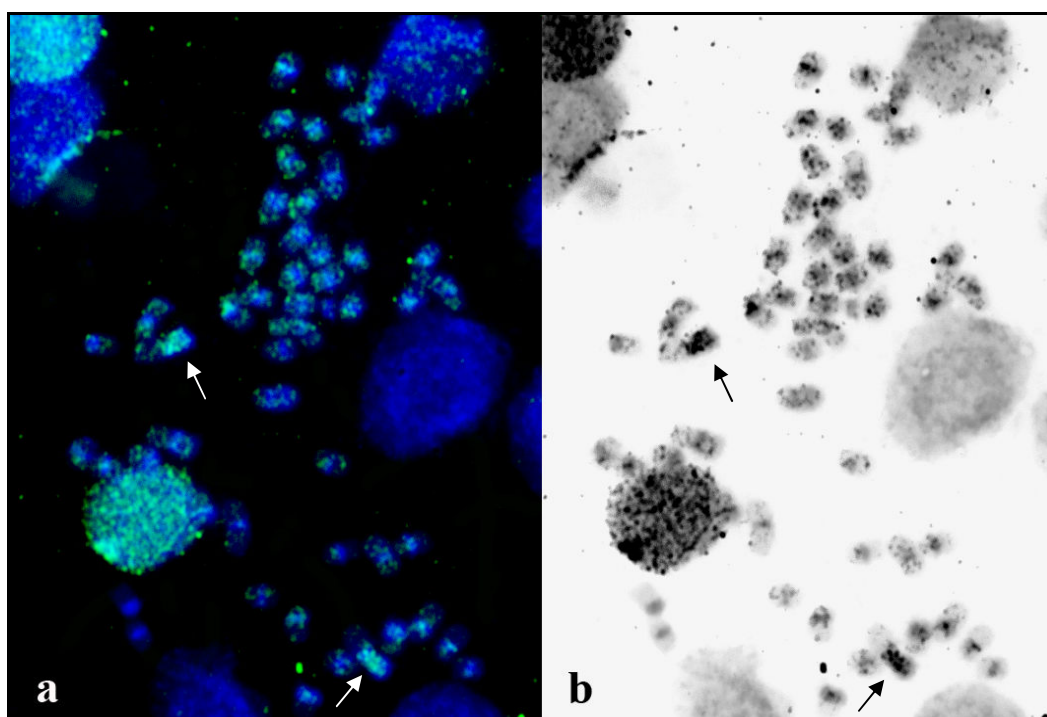


Figura 4.18: Hibridação *in situ* para a espécie *G. carapo* com a seqüência obtida pela clonagem de fragmento oriunda da digestão do DNA genômico pela enzima *Hae III* (a). Figura à direita (b)

corresponde à mesma metáfase visualizada invertida em branco e preto, onde a intensidade do sinal de hibridação é representada pela cor preta. Setas indicam possível bloco heterocromático.

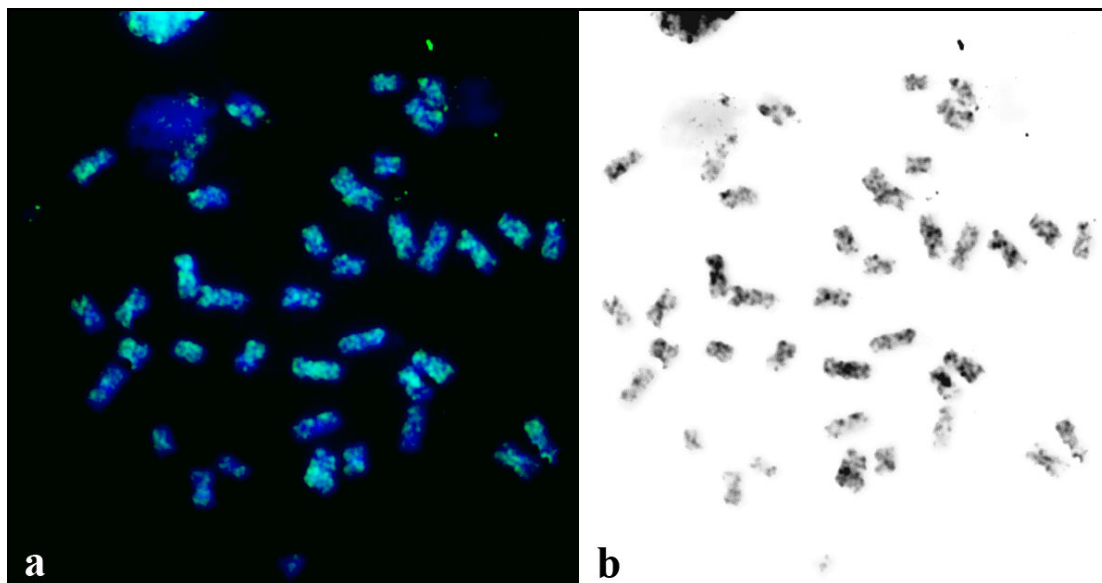


Figura 4.19: Hibridação *in situ* para a espécie *G. sylvius* com a seqüência obtida pela clonagem de fragmento de maior tamanho oriunda da digestão do DNA genômico pela enzima *Alu I*. (a). Figura à direita (b) corresponde à mesma metáfase visualizada invertida em branco e preto, onde a intensidade do sinal de hibridação é representada pela cor preta.

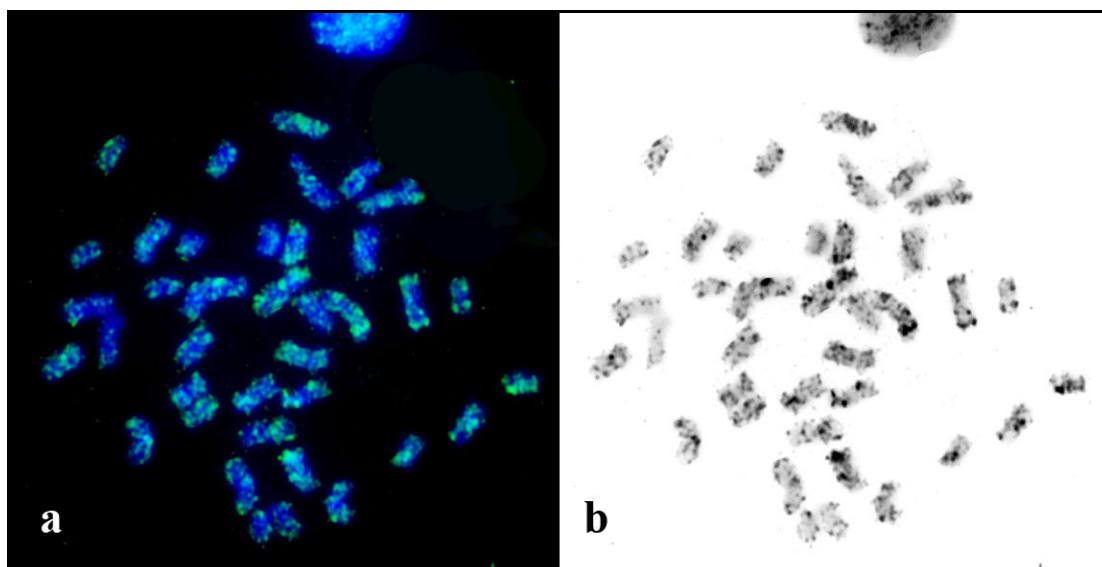


Figura 4.20: Hibridação *in situ* para a espécie *G. sylvius* com a seqüência obtida pela clonagem de fragmento de menor tamanho oriunda da digestão do DNA genômico pela enzima *Alu I*. (a). Figura à direita (b) corresponde à mesma metáfase visualizada invertida em branco e preto, onde a intensidade do sinal de hibridação é representada pela cor preta.

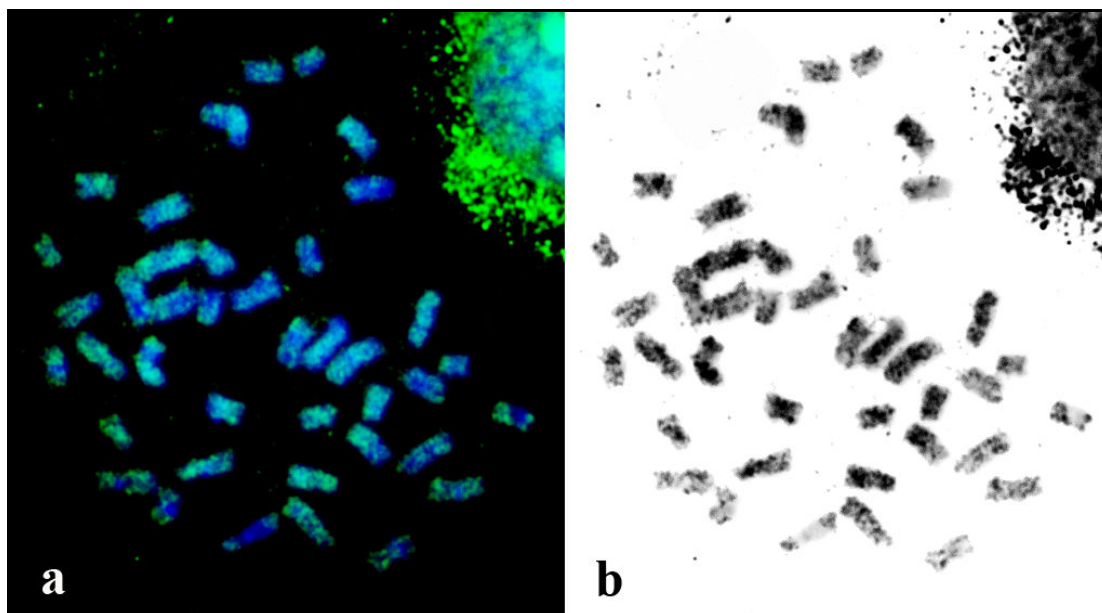


Figura 4.21: Hibridação *in situ* para a espécie *G. sylvius* com a seqüência obtida pela clonagem de fragmento oriundo da digestão do DNA genômico pela enzima *Hae* III. (a). Figura à direita (b) corresponde à mesma metáfase visualizada invertida em branco e preto, onde a intensidade do sinal de hibridação é representada pela cor preta.

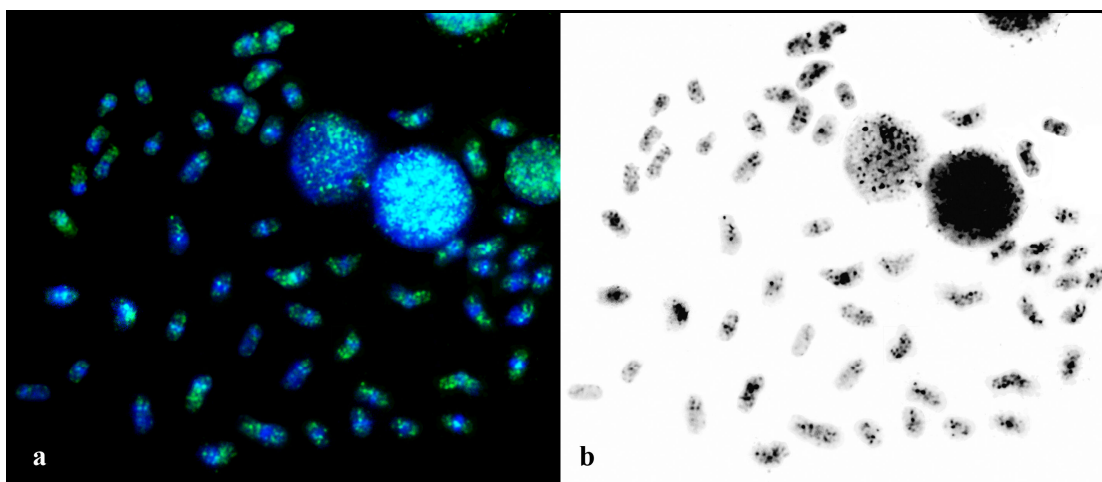


Figura 4.22: Hibridação *in situ* para a espécie *G. carapo* com a seqüência obtida pela clonagem de fragmento oriundo da digestão do DNA genômico pela enzima *Alu* I a qual apresenta similaridade com o SINE DR1 (a). Figura à direita (b) corresponde à mesma metáfase visualizada invertida em branco e preto, onde a intensidade do sinal de hibridação é representada pela cor preta.

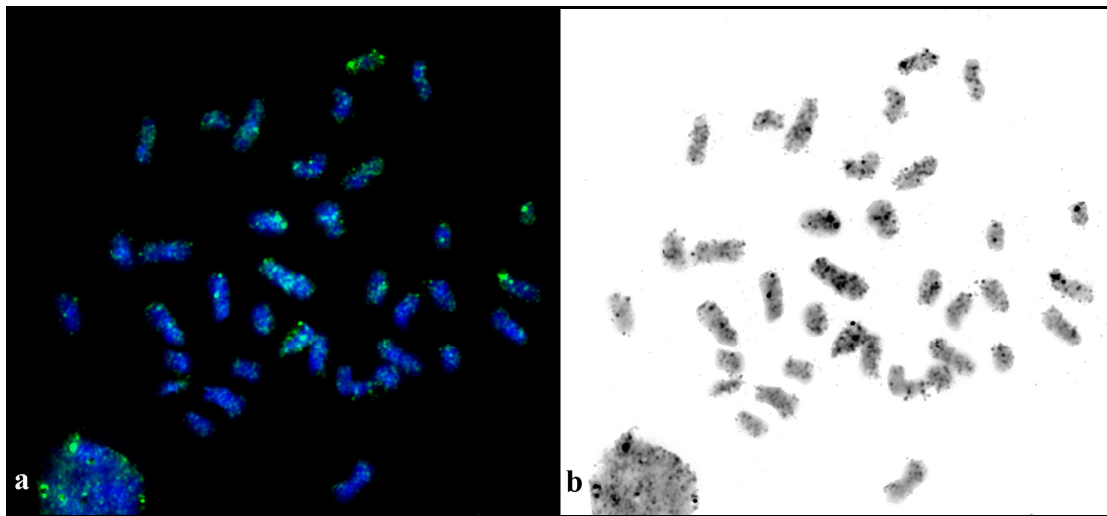


Figura 4.23: Hibridação *in situ* para a espécie *G. sylvius* com a seqüência a qual apresenta similaridade com o SINE DR1, obtida pela clonagem de fragmento oriundo da digestão do DNA genômico da espécie *G. carapo* pela enzima *Alu* I. (a). Figura à direita (b) corresponde à mesma metáfase visualizada invertida em branco e preto, onde a intensidade do sinal de hibridação é representada pela cor preta.

A técnica de *Southern Blot* foi utilizada para a determinação da significância das seqüências obtidas pela clonagem das bandas no genoma das espécies em estudo. Um primeiro experimento foi realizado a fim de verificarmos a repetitividade das seqüências clonadas e para tanto, utilizou-se um DNA controle, o gene ribossômico 5S (amplificado para cada uma das espécies), o qual além de possuir uma repetição moderada no genoma, possui suas seqüências arranjadas em cadeia. Para que a comparação pudesse ser realizada da melhor forma possível, as quantidades de DNA das seqüências possuem a mesma concentração da menor banda da amplificação do DNA ribossômico 5S (Fig. 4.24a). A hibridação em membrana de nylon (Fig. 4.24b) que utilizou como sonda o DNA genômico das espécies evidenciou uma marcação muito forte em relação ao DNA ribossômico 5S e ausência de marcação no que diz respeito às seqüências clonadas. Tal resultado evidenciou que a repetitividade das seqüências no genoma é significativamente menor em comparação ao gene ribossômico 5S, um indício de que as seqüências talvez não estejam organizadas

em cadeia. Perante tal resultado, foram feitas digestões parciais e totais de DNA genômico das seqüências previamente hibridadas para que sua organização genômica pudesse ser determinada. Supôs-se que as seqüências *Alu* menor e *Hae* para a espécie *G. carapo* e *Alu* menor para a espécie *G. sylvius*, pudessem estar organizadas em cadeias, hipótese construída com base nos resultados obtidos na hibridação *in situ*, na qual foi verificada uma concentração das seqüências em alguns pares cromossômicos, evidenciando blocos específicos. O DNA genômico foi então digerido de acordo com a enzima utilizada previamente, transferido para uma membrana de nylon e posteriormente hibridado com as seqüências escolhidas. Nas hibridações, pode-se verificar que as seqüências *Alu* menor e *Hae* para a espécie *G. carapo* e *Alu* menor para a espécie *G. sylvius*, hibridam com numerosos fragmentos de tamanho 0,3kb até 12kb, o que indica que elas encontram-se predominantemente dispersas no genoma e não arranjadas em cadeia nas espécies em estudo (Fig. 4.25), enquanto que as outras três seqüências não apresentaram sinais visíveis.

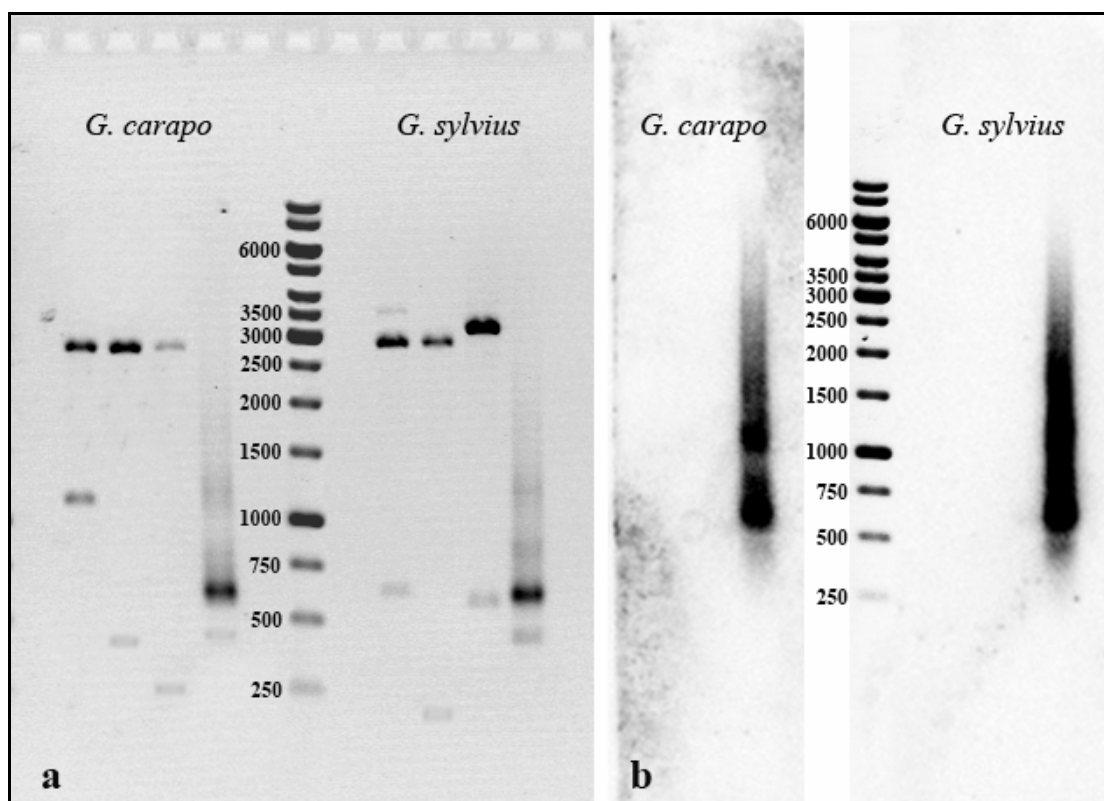


Figura 4.24: a) Gel de agarose 1% evidenciando bandas das seqüências hibridadas *in situ* após dupla digestão para liberação das seqüências contidas nos plasmídeos (*Alu* maior, *Alu* menor e *Hae*), seguidas do DNA controle 5S amplificado para ambas as espécies para indicativo da ocorrência das seqüências no genoma. A sétima raia corresponde ao marcador de peso molecular de 1Kb. b) Southern Blot realizado com sonda genômica para verificação da ocorrência das seqüências hibridadas *in situ*. A raia com sinal forte corresponde ao DNA controle 5S.

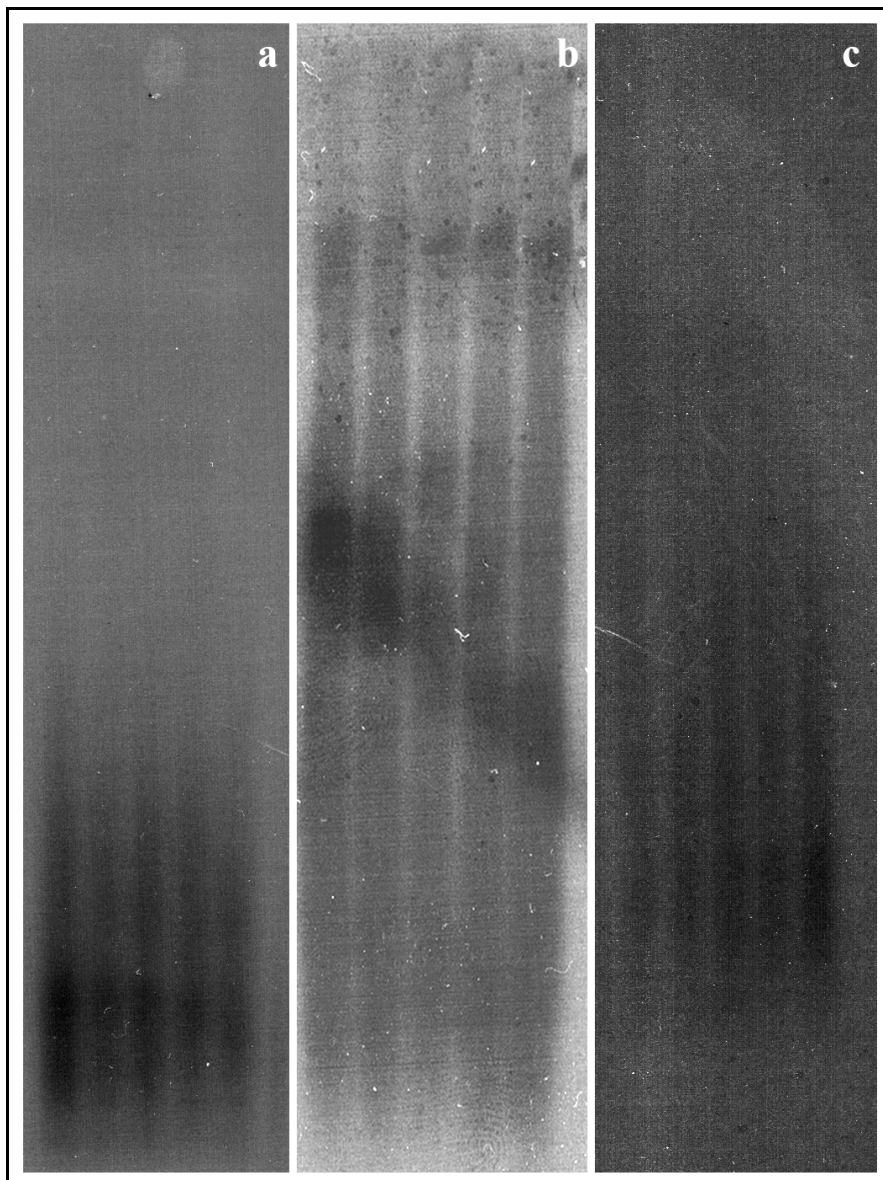


Figura 4.25: Southern Blot realizado com sondas específicas para as seqüências isoladas para verificação de sua organização no genoma das espécies. a) e b) Seqüências *Alu* menor e *Hae* respectivamente para a espécie *G. carapo* c) Seqüência *Alu* menor para a espécie *G. sylvius*.

4.4 Discussão

A digestão do DNA genômico utilizando as endonucleases de restrição *Alu* I e *Hae* III geraram uma gama de seqüências muito grande, uma vez que, quando alinhadas, apresentaram baixa similaridade, fato esperado uma vez que a eluição de bandas dificilmente permitirá a obtenção de uma única seqüência, o que foi devidamente corroborado pelo seqüenciamento dos fragmentos obtidos após a clonagem, os quais apresentaram uma variação no índice de similaridade entre 10% a 50%, sendo verificados índices elevados em casos pontuais.

A análise das seqüências obtidas para as espécies *G. carapo* e *G. sylvius*, em relação à endonuclease *Alu* I e *Hae* III, permitiram a identificação de diversos elementos repetidos ao longo das seqüências, na maioria dos casos dispersos e com complexidade variável (2 a 6 bases). Houve também a formação de blocos dos dinucleotídeos (TG)_n para ambas as espécies, através da digestão pela endonuclease *Alu* I, e (CA)_n para a espécie *G. sylvius* através da digestão pela endonuclease *Hae* III, apresentando em ambos os casos mais de 15 repetições, tamanho já verificado em repetições presentes em outros vertebrados (Dokholyan, *et al.*, 2000). Tal resultado fornece um indício de que essas repetições, as quais podem ser classificadas como microssatélites, devido ao seu tamanho e composição, possam atuar como marcadores populacionais, sendo de grande interesse para estudos com essa abordagem devido às características polimórficas que tais regiões comumente possuem (Bowcock *et al.*, 1994). Diferenças entre as repetições encontradas no que diz respeito a seu tamanho, fornecem indícios de que elas possam ser polimórficas, reforçando assim a

hipótese de que essa região possa ser informativa para estudos populacionais. Entretanto, a confirmação só será possível através de estudos futuros que englobem essa abordagem.

A distribuição das seqüências escolhidas, localizadas pela hibridação *in situ*, mostrou-se de modo geral dispersa, apresentando algumas regiões nas quais se observa um acúmulo de seqüências em determinados pares. A dispersão dessas seqüências era algo esperado, uma vez que estudos estatísticos envolvendo a distribuição de dinucleotídeos, os quais estão presentes nas seqüências hibridadas, demonstrou que sua freqüência é elevada em regiões não codificantes e relativamente baixa em regiões codificantes, fato que sugere que essas repetições sejam de grande importância na evolução e organização de regiões não codificantes do DNA (Buldyrev, 1995), o que torna o sinal de hibridação disperso. Tendo em vista a ampla distribuição das seqüências ao longo do genoma e os resultados da hibridação *in situ* obtidos, podemos sugerir que, de modo geral, essas seqüências estejam relacionadas tanto à heterocromatina das espécies, quanto a regiões eucromáticas não codificantes, resultado principalmente associado à seqüência *Alu* maior para a espécie *G. sylvius*, para a qual foi obtido padrão de hibridação com a maior dispersão dentre aquelas analisadas, apresentando marcações pontuais pequenas em apenas alguns pares. As seqüências *Alu* menor e *Hae* ainda para a espécie *G. sylvius*, apresentaram marcações preferenciais nas regiões terminais de alguns pares, bem como foi possível visualizar marcações associadas a regiões pericentroméricas no caso da seqüência *Hae*. Apesar de o bandamento C da espécie evidenciar tanto regiões terminais quanto regiões pericentroméricas a correlação de tais regiões com as marcações obtidas pela hibridação *in situ* não se dá de forma completa, indício de que há certa relação tanto com regiões heterocromáticas quanto teloméricas para a espécie *G. sylvius*. As seqüências *Alu* maior e *Hae* para a espécie *G. carapo* apresentaram marcações dispersas, porém com um grande

diferencial, pois foi possível a identificação de sinal em apenas um dos braços de um par cromossômico, marcação também visível no bandamento C da espécie. Com base nesse resultado, podemos sugerir que a marcação preferencial possa estar associada a esse bloco heterocromático e que, portanto, tais seqüências sejam um componente importante da heterocromatina das espécies. A seqüência *Alu* menor de *G. carapo* apresentou o padrão com maior especificidade, entretanto seu padrão de marcação diferiu sensivelmente do bandamento C para a espécie *G. carapo*, o que nos mostra que a especificidade nesse caso não está associada à heterocromatina da espécie, tal qual visto anteriormente para as seqüências.

A determinação da ocorrência e organização genômica das seqüências foi efetuada em dois experimentos distintos. No primeiro, para determinação da representatividade das seqüências, verificamos que nenhuma das seis seqüências é abundante, uma vez que nenhuma delas forneceu sinal visível, diferentemente do DNA ribossômico 5S (controle positivo), o qual possui uma ocorrência significativa no genoma (centenas a milhares de cópias) e apresentou uma banda forte, indicativo de que o experimento realmente teve sucesso e a ocorrência das seqüências é realmente baixa. Tal resultado corrobora o padrão pontual obtido nas hibridações *in situ*, indicativo de que as seqüências não se encontram organizadas em grandes *clusters*, mas sim pontualmente no genoma. Para uma confirmação desse resultado o segundo experimento de Southern Blot evidenciou a organização genômica das seqüências e dentre as seis seqüências hibridadas, apenas três delas apresentaram resultados positivos para o Southern Blot, evidenciando que elas não estão organizadas em cadeia, mas sim hibridam com diversos fragmentos dos mais diferentes tamanhos. Tal resultado, quando comparado com a hibridação *in situ*, demonstra que as seqüências *Alu* menor e *Hae* para a espécie *G. carapo*, bem como a seqüência *Alu* menor

para a espécie *G. sylvius* estão presentes no genoma tanto pontualmente, quanto constituintes de seqüências maiores, delineando uma organização genômica mais complexa, ponto que pode estar diretamente relacionado ao tamanho das seqüências, uma vez que por serem menores têm uma maior probabilidade de serem encontradas no genoma e que, portanto estejam presentes nos mais diferentes grupos de seqüências. Já em relação às seqüências *Alu* maior para a espécie *G. carapo* e *Alu* maior e *Hae* para a espécie *G. sylvius*, foi verificado que elas apresentam-se apenas pontualmente no genoma, padrão também condizente com os tamanhos de seqüência obtidos.

A análise das seqüências através do programa *RepeatMasker*, como já mencionada anteriormente, permitiu a identificação de similaridade entre a seqüência 29 e a região terminal do SINE DR1 identificado para *Danio rerio* (Jurka & Drazkiewicz, 2002). Os elementos transponíveis do tipo SINE são comumente derivados do RNA transportador, e acredita-se que eles possam recombinar-se e interagir funcionalmente com LINEs (*Long Interspersed Nuclear Elements*) o que, portanto, levaria à aquisição da capacidade de retrotransposição por esse elemento (Okada *et al.*, 1997). Tal interação está relacionada a um sinal específico na região 3' dos LINEs, o qual é fundamental em seu processo de retrotransposição, uma vez que essa porção, já transcrita em RNA, será reconhecida pela transcriptase reversa, também por ele codificada, para a síntese da nova cadeia de DNA (Eickbush, 1992). Os SINEs, portanto, atuam como elementos oportunistas, utilizando-se da maquinaria enzimática de LINEs e para tanto uma conservação das regiões terminais desses elementos é esperada (Oshima *et al.*, 1996). O fato de a região 3' do SINE DR1 apresentar grande similaridade com parte da seqüência 29 obtida em *G. carapo*, pode significar que essa seqüência consista na região terminal de um elemento do tipo SINE, cuja seqüência pode estar diretamente associada ao processo de retrotransposição,

característica marcante desse tipo de elemento transponível. Devido ao fato de a seqüência obtida para *G. carapo* corresponder a apenas parte da seqüência total do SINE DR1, não há como verificar se há similaridade na região 5' do SINE, nem seu real tamanho, porém permite a proposta de novas hipóteses, as quais permitirão além de uma descrição precisa desse elemento, futuramente fornecer dados importantes sobre a evolução do genoma no gênero, uma vez que elementos do tipo SINE podem atuar de modo importante no processo de especiação em comparação com outros mecanismos que operam em nível de DNA, como mutação, recombinação e transposição (Okada *et al.*, 1997).

A hibridação *in situ* do possível SINE identificado na seqüência 29 para a espécie *G. carapo* demonstrou ter similaridade tanto com a espécie na qual foi identificada, quanto no experimento de *cross-fish* realizado na espécie *G. sylvius*. O padrão verificado corroborou resultados obtidos para elementos do tipo SINE em *O. niloticus* (Oliveira, 1999). Tais resultados para o padrão de hibridação, por diferirem daqueles obtidos para as outras seqüências isoladas, fornecem um indício forte de que essa seqüência obtida a partir da espécie *G. carapo* realmente corresponda a um possível elemento transponível e não apenas um simples componente do DNA repetitivo. Além disso, o padrão distinto entre as espécies pode ser um reflexo de padrões evolutivos distintos, fato que, como mencionado anteriormente, pode estar diretamente relacionado ao processo de especiação (Okada *et al.*, 1997).

Capítulo V

Considerações Finais

O bandamento R, aliado à hibridação de seqüências teloméricas forneceu dados fundamentais acerca da evolução cariotípica dessas duas espécies. Verificou-se o processo de fusão cêntrica em *G. sylvius*, confirmado pelas duas técnicas, bem como a conservação de pelo menos três pares para ambas as espécies, provavelmente oriundos de um ancestral comum (Hellmer *et al.*, 1991; Daniel-Silva & Almeida-Toledo, 2005), demonstrando que essa abordagem, inicia um estudo sobre evolução cariotípica do gênero garantindo um ponto de partida para trabalhos futuros.

A hibridação *in situ* do gene ribossômico 18S corroborou resultados obtidos anteriormente através da citogenética clássica (Fernandes-Matioli, 1999), evidenciando a presença de um único locus para esse gene com polimorfismo no tamanho dos sítios, fato comum em peixes (Foresti *et al.*, 1981). Já a seqüência ribossômica 5S forneceu dados significativos sobre a evolução das espécies, uma vez que *G. carapo* apresentou sítios múltiplos para essa família multigênica, ocorrência já verificada para diversos grupos (Móran *et al.*, 1996; Fujiwara *et al.*, 1998; Martins & Galetti, 1999), diferindo sensivelmente de *G. sylvius*, no qual um único locus pode ser visualizado. Tal discrepância no número de sítios pode estar associada a rearranjos cromossômicos sofridos ao longo processo evolutivo para a espécie *G. sylvius*, ponto já discutido anteriormente neste trabalho, entretanto estudos com outras espécies do gênero são fundamentais para a total compreensão da dinâmica evolutiva dessa família gênica. A análise molecular do gene ribossômico 5S, juntamente com seu NTS, permitiu a identificação de um elemento transponível do tipo SINE, na região correspondente ao gene ribossômico 5S, fato que foi corroborado tanto pela alteração do sítio de término de transcrição (Paule & White, 2000), como pela conservação das seqüências que constituem o promotor interno para a DNA polimerase III (Sajdak *et al.*, 1998). Essa é a primeira descrição de elementos transponíveis

para o gênero *Gymnotus* e talvez para os Gymnotiformes e tal ocorrência indica que tais elementos possam ser de grande importância para a evolução do grupo.

O estudo do DNA repetitivo permitiu a visualização da diversidade entre os genomas das espécies em estudo, bem como permitiu também a identificação de possíveis marcadores para estudos populacionais (Bowcock *et al.*, 1994), sendo que em alguns casos verificou-se uma possível relação das seqüências isoladas com regiões heterocromáticas, o que reforça a hipótese de que tais regiões permitam a identificação de marcadores para as espécies em estudo. Apesar dessa possível relação em alguns casos, as seqüências hibridadas *in situ* demonstraram grande dispersão, fato esse que pode estar diretamente relacionado à presença de microssatélites (Buldyrev, 1995). Apesar da ampla distribuição, a ocorrência dessas seqüências no genoma se mostrou muito baixa e de complexidade organizacional variada, sendo em alguns casos pontuais e em outros associados a seqüências maiores não organizadas em cadeia, fato que evidencia uma vez mais a diversidade no genoma das espécies em estudo.

Por fim, foi possível ainda, em relação às seqüências isoladas, a identificação de similaridade entre a região terminal de um SINE descrito para *Danio rerio* (Jurka & Drazkiewicz, 2002) e uma seqüência oriunda da espécie *G. carapo*, que apresenta um padrão de hibridação que difere em relação às seqüências previamente hibridadas, um indicativo de que essa seqüência realmente contenha um elemento transponível e que a variação concernente às espécies *G. carapo* e *G. sylvius* está diretamente relacionada a padrões evolutivos distintos, indicando que esse elemento possa estar diretamente associado ao processo de especiação (Okada *et al.*, 1997), uma evidência a mais da importância que os elementos transponíveis tenham no processo evolutivo.

Conclusões

A análise de seqüências repetitivas demonstrou a heterogeneidade presente no genoma das espécies *G. carapo* e *G. sylvius*, bem como permitiu a identificação de potenciais marcadores moleculares para estudos populacionais. Entretanto, não se mostrou efetiva para localização de marcadores cromossômicos específicos em relação às endonucleases utilizadas. A análise do bandamento R em conjunto com a hibridação de

seqüências teloméricas se mostrou uma abordagem eficaz para o estudo da evolução cariotípica, tornando-se uma alternativa interessante perante as técnicas de pintura cromossômica devido à ausência de cromossomos marcadores no gênero. Os dados fornecidos pela análise molecular do gene ribossômico 5S bem como das seqüências repetitivas isoladas, permitiu a identificação de dois elementos transponíveis do tipo SINE, fornecendo indícios de que tais elementos estejam associados à dinâmica evolutiva do gênero.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERT, J. S., CAMPOS-DA-PAZ, R., 1998. Phylogenetic systematics of Gymnotiformes with diagnoses of 58 clades: a review of available data. *In*: Malabarba, L. R.; Reis, R. E.; Vari, R. P.; Lucena, Z. M. S.; Lucena, C. A. S. (Eds.). *Phylogeny and classification of Neotropical fishes*. Porto Alegre: EDIPUCRS. p. 419-446.

ALMEIDA-TOLEDO, L.F. **Contribuição à citogenética dos Gymnotoidei (Pisces, Ostariophysii)**. São Paulo, 1978a. 128 p. Tese de Doutorado - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.

ALMEIDA TOLEDO, L. F. (1978b). Polymorphic nature of nucleolus organizer regions in fishes. **Cytogenetic. Cell Genetic**, 31: 137-144.

ALMEIDA-TOLEDO, L. F., VIEGAS-PÉQUIGNOT, E., FORESTI, F., TOLEDO-FILHO, S. A., DUTRILLAUX, B., 1988. BrdU replication patterns demonstrating chromosome homeologies in two fish species, genus *Eigenmannia*. *Cytogenet Cell Genet* **48**: 117-120.

ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; FORESTI, F.; TOLEDO-FILHO, S.A., 2000. Karyotypic evolution in neotropical freshwater fish. *Chromosome today*, **13**:169-182.

ALVES-COSTA, F.A, WASKO, A. P., OLIVEIRA, C., MARTINS, C., FORESTI, F., 2006. Genomic organization and evolution of the 5S ribosomal DNA in Tilapiini fishes. *Genetica* 127: 243-252.

ANDREATA, A.A. **Estudos citogenéticos no gênero *Microlepidogaster* (Pisces, Locariidae, Hypoptopomatinae)**. Botucatu, 2002. 209 p. Tese de Doutorado - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.

ANGER, B., BERNATCHEZ, L., 1996. Usefulness of heterologous microsatellite obtained from brook charr, *Salvelinus fontinalis* Mitchill, in other *Salvelinus* species. *Molecular Ecology* **5**: 317-319.

BAUM, B. R., JOHNSON, D. A., 2007. The 5S DNA sequences in *Hordeum bogdanii* and in the *H. brevisubulatum* complex, and the evolution and geographic dispersal of the diploid *Hordeum* species (Tritiaceae: Poaceae). *Genome* **50**: 1-14.

BENNETT, M. V. L., GRUNDFEST, H., 1959. Electrophysiology of electric organ in *Gymnotus carapo*. *The Journal of General Physiology* **42**: 1067-1104.

BLASCO, M. A., LEE, H., HANDE, M. P., SAMPER, E., LANDSORP, P. M., DePINHO, R. A., GREIDER, C. W., 1997. Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell* **91**: 25-34.

BOWCOCK, A. M., RUIZ-LINHARES, A., TOMFOHRDE, J., MINCH, E., KIDD, J. R., CAVALLI-SFORZA, L. L., 1994. High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature* **368**: 455-457.

CAU, A., COLUCCIA, E., DEIANA, A. M., PICHIRI, G., ROSSINO, R., SALVADORI, S., MEZZANOTTE, R., 1992. Chromosomes and DNA of *Anguilla anguilla*: a study with restriction endonuclease. *Genome* **35**: 838-843.

BULDYREV, S. V., GOLDBERGER, A. L., HAVLIN, S., MANTEGNA, R. N., MATSA, M. E., PENG, C. K., SIMONS, M., STANLEY, H. E., 1995. Long-range correlation properties of coding and noncoding DNA sequences: GeneBank analysis. *Phys. Rev. E* **51**: 5084-5091.

CHARLESWORTH, B., SNIEGOWSKY, P., STEPHAN, W., 1994. The Evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukariotes. *Nature* **371**: 215-220.

DANIEL-SILVA, M. F. Z., ALMEIDA-TOLEDO, L. F., 2005. Chromosome evolution in fish: BrdU replication patterns demonstrate chromosome homeologies in two species of the genus *Astyanax*. *Cytogenet Genome Res* **109**: 497-501.

DIBERADINO, D., IANNUZZI, L., 1981. Chromosome banding homeologies in Swamp and Murrah buffalo. *J. Hered.* **72**: 183-188.

DOHKOLYAN, N. V., BULDYREV, S. V., HAVLIN, S., STANLEY, H. E., 2000. Distribution of dimeric tandem repeats in Non-coding and coding DNA sequences. *J. Theor. Biol.* **202**: 273-282.

DROUIN, G., MONIZ DE SÁ, M., 1995. The concerted evolution of 5S ribosomal genes linked to the repeat units of other multigene families. *Mol. Biol. Evol.* **12**: 481-493.

DUTRILLAUX, B., 1979. Chromosomal evolution in primates: tentative pylogeny from *Microcebus murinius* (prosimian) to man. *Hum. Genet.* **48**: 251-314.

FERNANDES-MATIOLI, F. M. C., 1996. **Análises citogenéticas e dos padrões de descargas dos órgãos elétricos (DOEs) no gênero *Gymnotus* (Pisces, Gymnotidae)**. Tese de Mestrado. Instituto de Biociências, USP.

EICKBUSH, T. H., 1992. Transposing without ends: the non-LTR retrotransposable elements. *New Biol.* **4**: 430-440.

FERNANDES-MATIOLI, F. M. C., ALMEIDA-TOLEDO L. F., TOLEDO-FILHO S. A., 1997. Extensive Nucleolus Organizer Region polymorphism in *Gymnotus carapo* (Gymnotidae, Gymnotidae) *Cytogenetic. Cell Genetic*, **78**: 236-239.

FERNANDES-MATIOLI, F. M. C., ALMEIDA-TOLEDO L. F., TOLEDO-FILHO S. A., 1998. Natural Triploidy in the Neotropical species *Gymnotus carapo* (Pisces: Gymnotiformes) *Caryologia* **51** (3-4): 319-322.

FERNANDES-MATIOLI, F. M. C., ALBERT, J. S., ALMEIDA-TOLEDO, L. F., 1999. New species of *Gymnotus* (Gymnotiformes, Teleostei) from Southeastern Brazil: Toward the Deconstruction of *Gymnotus carapo*, *Copeia*, **2**: 410-421.

FERNANDES-MATIOLI, F. M. C., MATIOLI, S. R., ALMEIDA-TOLEDO, L. F., 2000. Species diversity and Geographic distribution of *Gymnotus* (Pisces: Gymnotiformes) by nuclear (GGAC)_n microsatellite analysis, *Genetics and Molecular Biology* **23** (4): 803-807.

FERNANDES-MATIOLI, F. M. C., ALMEIDA-TOLEDO L. F., 2001. A molecular phylogenetic analysis in *Gymnotus* species (Pisces: Gymnotiformes) with inferences on chromosome evolution. *Caryologia* **54** (1): 23-30.

FORESTI F., TOLEDO L. F. A., TOLEDO FILHO S. A., 1981. Polymorphic nature of nucleolus organizer regions in fishes. *Cytogenet. Cell Genet.*, **31**: 137-144.

FORESTI, F., ALMEIDA-TOLEDO, L. F., TOLEDO FILHO, S. A., 1984. Chromosome Studies In *Gymnotus Carapo* And *Gymnotus Sp* (Pisces, Gymnotidae). *Caryologia* **37**: 141-146.

FUJIWARA, A.M., ABE, S., YAMAHA, E., YAMAZAKY, F., YOSHIDA, M. C., 1998. Chromosomal localization and heterochromatin association of ribosomal RNA gene loci and silver stained nucleolar organizer regions in salmonid fishes. *Chrom. Res* **6**: 463-471.

HARRIS, A. S., WRIGHT, J. M., 1995. Nucleotide sequence and genomic organization of cichlid fish minisatellites. *Genome* **38**: 177-184.

HELLMER, A., VOICULESCU, I., SCHEMPP, W., 1991. Replication banding studies in two cyprinid fishes. *Chromosoma* **100**: 524-531.

HENNING, F., 2007. **Evolução de cromossomos sexuais no gênero *Eigenmannia* (Teleostei: Gymnotiformes)**. São Paulo, 2007, 62p. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências – Universidade de São Paulo.

HOLMQUIST, G. P., DANCIS, B., 1979. Telomere replication, kinetochore organizers, and satellite DNA evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 4566-4570.

JURKA, J., DRAZKIEWICZ, A., 2002. SINE_DR1: a SINE retroelement from zebrafish. *Rebase Reports* **2** (3): 10.

KAPITONOV, V. V., JURKA, J., 2003. A novel class of SINE elements derived from 5S rRNA. *Mol. Biol. Evol.* **20** (5): 694-702.

KIPLING, D., 1995. The Telomere. Oxford University Press Inc., New York.

KOEHLER, M.R.; DEHM, D.; GUTTENBACH, M.; NANDA, I.; HAAF, T.; MOLINA, W.F.; GALETTI, P.M.; SCHIMID, M., 1997. Cytogenetics of the genus *Leporinus* (Pisces, Anostomidae). 1. Karyotype analysis, heterochromatin distribution and sex chromosomes. *Chromosome Research* **5**:12-22.

MAGO-LECCIA, F. (1994) Electric fishes of the continental waters of America. *Bibl de La Acad. Cienc. Fis. Mat. Nat.* **29**: 1-225. Caracas, Venezuela.

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

MARTINS, C., GALETTI, Jr., P. M., 1999. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). *Chrom. Res.* **7**: 363-367.

MARTINS, C. (2000). **Organização do DNA ribossômico 5S no genoma de peixes, com ênfase em *Leporinus***. Tese de Doutorado. Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Universidade Federal de São Carlos.

MARTINS, C., WASKO, A. P., 2004. Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish genome, pp. 289-318. *Focus on Genome Research* edited by C. R. Williams. Nova Science Publishers, Hauppauge, NY.

MEYNE, J., BAKER, R. J., HOBART, H. H., HSU, T. C., RYDER, O. A., WARD, O. G., WILEY, J. E., WURSTER-HILL, D. H., YATES, T. L., MOYZIS, R. K., 1990. Distribution of nontelomeric sites of (TTAGGG)_n telomeric sequences in vertebrate chromosomes. *Chromosoma* **99**: 3-10.

MILLER, O. J., MILLER, D. A., DEV, V. G., TANTRAVAHU, R., CROCE, C. M., 1976. Expression of human and suppression of mouse nucleolus organizer activity in mouse-human somatic cell hybrids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**: 4531-4535.

MÓRAN, P., MARTÍNEZ, J. L., GARCIA-VÁSQUEZ, E., PENDÁS, A. M., 1996. Sex linkage of 5S rDNA in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Cytogenet. Cell Genet.* **75**: 145-150.

NEDERBY-NIELSEN, J., HALLENBERG, G., FREDERIKSEN, S., SORENSEN, P. D., LOMHOLT, B., 1993. Transcription of human 5S rRNA genes is influenced by upstream DNA sequence. *Nucleic Acid Res.* **26**: 3631-3636.

NEI, M., ROONEY, A. P., 2005. Concerted evolution and birth-and-death evolution of multigene families. *Annu. Rev. Genet.* **39**: 121-152.

NELSON, D. W., HONDA, B. M., 1985. Genes coding for 5S ribosomal RNA of nematode *Caenorhabditis elegans*. *Gene* **38**: 245-251.

NELSON, J.S. (2006). **Fishes of the world**. 4th Edition. New York, John Willey & Sons, Inc. 601p.

OKADA, N., HAMADA, M., OGIWARA, K., 1997. SINEs and LINEs share a common 3' sequences: a review. *Gene* **205**: 229-243.

OLIVEIRA, C., 1999. **Clonagem e caracterização molecular de DNAs repetitivos de tilápia (*Oreochromis niloticus*) e sua localização em cromossomos metafásicos pela aplicação da técnica de hibridação *in situ* com sondas fluorescentes**. Tese de Livre Docência. UNESP – Botucatu, SP, 208p.

OLIVEIRA, C.; WRIGHT, J.M., 1998. Molecular cytogenetic analysis of heterochromatin in the chromosomes of tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae). *Chromosome Research* **6**: 205-211.

O'REILLY, P., WRIGHT, J. M., 1995. The evolving technology of DNA fingerprint and its application to fisheries and aquaculture. *J Fish Biol* **47** (supl.): 29-55.

OSHIMA, K., HAMADA, M., TERAJ, Y., OKADA, N., 1996. The 3'-ends of tRNA-derived short interspersed repetitive elements are derived from the 3'-ends of long interspersed repetitive elements. *Mol Cell Biol* **16**: 3756-3764.

PARISE-MALTEMPI, PP, MARTINS, C., OLIVEIRA, C., FORESTI, F., 2007. Identification of a new repetitive element in the sex chromosomes of *Leporinus elongatus* (Teleostei: Characiformes: Anostomidae): new insights for the sex chromosome in *Leporinus*. *Cytogenetic Genome Res* **116** (3): 218-223.

PAULE, M. R., WHITE, R. J., 2000. Survey and Summary: transcription by RNA polymerases I and III. *Nucleic Acid Res.* **28**: 1283-1298.

PHILLIPS, R. B., PLEYTE, K. A., IHSEN, P. E., 1989. Patterns of chromosomal nucleolar organizer region (NOR) variation in fishes of the genus *Salvelinus*. *Copeia* **1989**: 47-53.

PHILLIPS, R. B., REED, K. M., 1996. Application of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) techniques to fish genetics: a review. *Aquaculture* **140**: 197-216.

REIS, R.E., KULLANDER, S. O., FERRARIS, C. J., 2003. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: Ed. PUCRS, 742 p.

ROSENTHAL, D. S., DOERIN, J. L., 1983. The genomic organization of dispersed tRNA and 5S RNA genes in *Xenopus laevis*. *J. Biol. Chem.* **258**: 7042-7410.

SAJDAK, S. L., REED, K. M., PHILLIPS, R. B., 1998. Intraindividual and interspecies variation in the 5S rDNA of coregonid fish. *J. Mol. Evol.* **46**: 680-688.

SCHEEL, J. J., 1973. Fish chromosomes and their evolution. *Internal Report of Danmarks Akvarium*, Charlottenlund, Denmark.

SLIJEPCEVIC, P., HANDE, M. P., BOUFFLER, S. D., LANSDORP, P. M., BRYANT, P. E., 1997. Telomere length, chromatin structure and chromosome fusigenic potential. *Chromosoma* **106**: 413-421.

SHAMPAY, J., SCHMITT, M., BASSHAM, S., 1995. A novel minisatellite at a cloned hamster telomere. *Chromosoma* **104**: 29-38.

TERAI, Y., TAKAHASHI, K., OKADA, N., 1998. Sine cousins: the 3'-end tails of the two oldest and distantly related families of SINEs are descended from 3' ends of LINEs with the same genealogical origin. *Mol. Biol. Evol.* **15**: 1460-1471.

VOLOBOUEV, V., VOGT, N., VIEGAS-PEQUIGNOT, E., MALFOY, B., DUTRILLAUX, B. 1995. Characterization and chromosomal location of 2 repeated DNAs in 3 gerbillus species. *Chromosoma* **104** (4): 252-259

WAGNER, R. P., MAGUIRE, M. P., STALLINGS, R. L., 1993. Chromosomes: a synthesis. Wiley-Liss, Inc., New York.

WASKO, A. P., MARTINS, C., WRIGHT, J. M., GALLETI Jr., P. M., 2001. Molecular organization of 5S rDNA in fishes of the genus *Brycon*. *Genome* **44**: 893-902.

WESTBY, G. W., 1975. Comparative studies of the aggressive behavior of two gymnotid electric fish (*Gymnotus carapo* and *Hypopomus artedi*). *Anim Behav* **23**: 192-213.

XIAO-YAN Z., DE-TIAN, C., DING, Y., 2008. Molecular and Cytological characterization of 5S rDNA in *Oryza* species: genomic organization and phylogenetic implications. *Genome* **51**: 332-340.

YAMADA, K., KAMIMURA E., KONDO, M., TSUCHIYA, K., NISHIDA-UMEHARA, C., MATSUDA, Y., 2005. Nem families of site-specific repetitive DNA sequences that comprise constitutive heterochromatin of the Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*, Cricetinae, Rodentia). *Chromosoma* **115**: 36-49.

ZAKIAN, V. A., 1995. Telomeres: beginning to understand the end. *Science* **270**: 1601-1607.