



Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
Instituto de Biociências de Botucatu
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética)

**Efeitos de cromossomos B em vias de regulação da expressão gênica no
ciclídeo *Astatotilapia latifasciata***

Adauto Lima Cardoso

Botucatu – SP

2017



Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Instituto de Biociências de Botucatu
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética)

**Efeitos de cromossomos B em vias de regulação da expressão gênica no
ciclídeo *Astatotilapia latifasciata***

Doutorando: Adauto Lima Cardoso

Orientador: Prof. Dr. Cesar Martins

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética) do Instituto de Biociências de Botucatu da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do título de doutor.

Botucatu – SP

2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Cardoso, Adauto Lima.

Efeitos de cromossomos B em vias de regulação da expressão gênica no ciclídeo *Astatotilapia latifasciata* / Adauto Lima Cardoso. - Botucatu, 2017

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Cesar Martins

Capes: 20204000

1. Peixes - Genética. 2. Ciclídeos. 3. Epigenética. 4. MicroRNAs. 5. Expressão gênica. 6. Metilação de DNA. 7. Cromossomos.

Palavras-chave: Cromossomo supernumerário; Epigenética; Fragmentos de tRNA; MicroRNAs; Modificações do DNA.

**“ Vou aprender a ler pra ensinar meus camaradas.”
(Roberto Mendes/Capinam)**

**“E não tem nada nem ninguém que me faça esquecer de
onde eu vim e o que eu vim fazer.”
(Posada)**

**Esta tese é dedicada à todas as pessoas que contribuíram para
minha educação e formação como profissional e ser humano.**

Agradecimentos

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética) da Universidade Estadual Paulista, pela oportunidade de ampliar meus conhecimentos e desenvolver habilidades durante o curso de doutorado.

Às instituições FAPESP, CNPq, CAPES e UNESP, que deram o suporte para execução deste trabalho por meio de projetos e auxílios financeiros.

À FAPESP pela Bolsa de doutorado no país (2012/21546-9) e Bolsa de Estágio e Pesquisa no Exterior (2016/07743-7) concedidas.

Ao meu orientador, Cesar Martins, que forneceu as condições para o desenvolvimento deste trabalho e contribuiu significativamente para minha formação.

Ao Dr. Manfred Scharl, que me recebeu em seu laboratório para a realização de meu estágio no exterior, me permitindo vivenciar importantes experiências.

Ao Dr. Rogério Antonio Oliveria, pela colaboração com as análises estatísticas.

Aos colegas do Laboratório Genômica Integrativa, pelo auxílio no desenvolvimento deste trabalho e convívio durante estes anos.

Aos colegas de graduação e pós-graduação da UNESP, pela parceria no desenvolvimento de atividades paralelas à esta tese e que foram fundamentais para minha formação.

Resumo

Cromossomos supernumerários são polimorfismos numéricos frequentemente registrados em eucariotos, sendo que seus efeitos são pouco elucidados. Em alguns indivíduos da espécie *Astatotilapia latifasciata* pode-se identificar um ou dois cromossomos B, que são totalmente heterocromáticos e ricos em sequências repetitivas. Em vista de compreender sua origem, evolução e efeitos, este elemento vem sendo largamente explorado por técnicas integradas de citogenética, biologia molecular e genômica. Aqui, explorou-se o padrão de marcas epigenéticas do DNA deste cromossomo B e seus efeitos nas vias de metilação do DNA e de formação de tRFs. Usando-se imunocitogenética, ferramentas de bioinformática, quantificação global de 5mC e 5hmC e RT-qPCR, identificou-se que o cromossomo B de *A. latifasciata* possui padrão epigenético ativo e que não é um isocromossomo. Além disso, foram observados efeitos heterogêneos deste cromossomo na expressão de epi-miRNAs candidatos, de genes de modificações epigenéticas do DNA e de genes relacionados com a formação de tRFs. Como consequência, também foram registrados efeitos de cromossomos B nos níveis globais de 5mC e 5hmC e na formação de tRFs. Essas variações observadas parecem estar relacionadas com os mecanismos de manutenção do cromossomo B e estão em desacordo com a difundida ideia de que ele seja um elemento inerte.

Palavras-chave: cromossomo supernumerário, epigenética, modificações do DNA, microRNAs, fragmentos de tRNA.

Abstract

Supernumerary B chromosomes are numerical polymorphisms frequently registered in eukaryotes, and their effects are not elucidated. In some individuals of the species *Astatotilapia latifasciata* one or two B isochromosomes can be identified, which are totally heterochromatic and enriched by repetitive sequences. In order to understand its origin, evolution and effects, this element has been widely explored by integrated techniques of cytogenetics, molecular biology and genomics. Here, the pattern of epigenetic marks of the DNA of this B chromosome and its effects on the pathways of DNA methylation and formation of tRFs. Using immunocytogenetics, bioinformatics tools, global quantification of 5mC and 5hmC and RT-qPCR, it was identified that the B chromosome of *A. latifasciata* has active epigenetic pattern and it is not an isochromosome. In addition, heterogeneous effects of this chromosome were observed in the expression of candidate epi-miRNAs, genes of epigenetic modifications of DNA and genes related to the formation of tRFs. As a consequence, effects of B chromosomes were also registered at the global levels of 5mC and 5hmC and in the formation of tRFs. These variations appear to be related to the maintenance mechanisms of chromosome B and are in opposition with the widespread idea that they are inert elements.

Key-words: supernumerary chromosome, epigenetics, DNA modifications, microRNAs, tRNA fragments.

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Cromossomos B	1
1.2. Regulação da expressão gênica	2
1.2.1. Modificações epigenéticas do DNA	2
1.2.2. Pequenos RNAs não codificadores	4
1.3. <i>Astatotilapia latifasciata</i> como modelo para estudos sobre a biologia de cromossomos B	6
2. OBJETIVOS	7
2.1. Geral	7
2.2. Específicos	7
3. MATERIAL E MÉTODOS	8
3.1. Amostras.....	8
3.2. Genotipagem	8
3.3. Obtenção de cromossomos mitóticos.....	8
3.4. Imunolocalização de modificações epigenéticas do DNA	9
3.5. Extração de DNA	10
3.6. Extração de RNA	10
3.7. Produção de primers.....	10
3.8. PCR quantitativa (qPCR)	12
3.9. Quantificação global de 5-metilcitosina e 5-hidroximetilcitosina	12
3.10. Sequenciamento de bibliotecas de pequenos RNAs.....	12
3.11. Identificação de epi-miRNAs e tRFs.....	13
3.12. Interações RNA-proteínas	13
3.13. Análise estatística	13
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	15
4.1. O cromossomo B de <i>Astatotilapia latifasciata</i> possui padrão epigenético ativo.....	15
4.2. O cromossomo B de <i>A. latifasciata</i> não é um isocromossomo.....	16
4.3. Cromossomos B impactam a transcrição de genes de modificação do DNA	16
4.4. Causas das variações nos níveis de transcrição de genes de modificação do DNA..	18
4.5. Cromossomos B alteram os níveis globais de 5-metilcitosina e 5-hidroximetilcitosina.....	20
4.5.1. Cromossomos B promovem demetilação ativa em cérebro de fêmeas.....	20
4.5.2. Cromossomos B promovem demetilação passiva em ovários.....	21
4.6. Identificação tRFs e sua formação por efeito de cromossomos B	22
4.7. Interação entre cromossomo B e sexo.....	28
4.8. Discussão geral.....	29
5. CONCLUSÕES	30
6. REFERÊNCIAS	31
ANEXO.....	1

1. INTRODUÇÃO

1.1. Cromossomos B

Cromossomos B (ou supernumerários) são tradicionalmente referidos como elementos adicionais ao complemento cromossômico A, que não afetam o fenótipo de seus portadores sendo, portanto, dispensáveis (Beukeboom 1994; Camacho et al. 2000). Estes cromossomos já foram identificados em vários grupos de fungos, plantas e animais, indicando que eles tiveram múltiplas e independentes origens entre os eucariotos (Miao et al. 1991; Camacho 2000; Houben & Carchilan 2011).

Uma intrigante característica dos cromossomos supernumerários é que eles geralmente não recombinam com outros cromossomos durante a meiose, fazendo com que estes elementos tracem um caminho evolutivo distinto (Beukeboom 1994). Além disso, a ausência de recombinação leva a um padrão de transmissão aleatório, o que explica as frequências de cromossomos B fora do padrão Mendeliano (Camacho et al. 2000).

Diferente de outras variações numéricas, como as aneuploidias, cromossomos B não possuem homologia com os cromossomos do complemento A, porém compartilham sequências com estes, o que indica que sua origem se deu a partir do cariótipo regular (Valente et al. 2014), seguida por vários processos que levaram à sua diversificação, como eventos de duplicação, degeneração, invasão por elementos móveis e mesmo por sequências organelares (Martis et al. 2012; Valente et al. 2014). Além disso, cromossomos B são ricos em sequências repetitivas e são frequentemente descritos como heterocromáticos, indicando ausência de atividade gênica (Camacho 2005).

Apesar do cenário clássico na pesquisa sobre cromossomos B indicar que eles são elementos inertes, vários estudos vem demonstrando a presença de genes funcionais nestes elementos (Valente et al. 2014; Makunin et al. 2014; Banaei-Moghaddam et al. 2015; Huang et al. 2016; Navarro-Domínguez et al. 2017), bem como seus efeitos na expressão de sequências provenientes do complemento A (Carchilan et al. 2009; Huang et al. 2016; Ramos et al. 2017), nos níveis de proteínas *heatshock* (Teruel et al. 2011), de isoenzimas (Rejon et al. 1980), na fertilidade de fêmeas (Castro et al. 1998), no *fitness* (Beukeboom et al. 1998), na massa corpórea (Zima et al. 2003), entre outros. Assim, esse conjunto de dados se opõe à ideia de inatividade dos cromossomos B. Porém, comparado ao número de estudos

envolvendo os aspectos estruturais e evolutivos destes elementos, os aspectos funcionais ainda são pouco explorados.

1.2. Regulação da expressão gênica

A expressão gênica pode ser regulada em vários momentos e de diferentes maneiras. A regulação gênica pré-transcricional ocorre antes do RNA ser sintetizado e envolve principalmente os mecanismos associados com a acessibilidade da cromatina à RNA polimerase, como as modificações epigenéticas da cromatina e a ação de fatores de transcrição. Por sua vez, a regulação pós-transcricional da expressão gênica ocorre durante o processamento do RNA até sua tradução, além de sua degradação, e mecanismos envolvendo pequenos RNAs possuem função chave nesta fase (Jaenisch & Bird 2003; Holoch & Moazed 2015).

Nessa tese será dada atenção especial às modificações epigenéticas do DNA, aos *microRNAs* (miRNAs) e aos fragmentos de RNAs transportadores (tRFs).

1.2.1. Modificações epigenéticas do DNA

A metilação de citosinas do DNA (5-metilcitosina – 5mC) é a modificação epigenética mais bem estudada e está envolvida com muitos processos biológicos importantes como desenvolvimento, diferenciação celular e inativação de elementos transponíveis e do cromossomo X de fêmeas de mamíferos placentários (Bird 2002; Klose & Bird 2006). O estabelecimento dessa modificação é realizado pelas enzimas DNA metiltransferase (DNMT). A DNMT1 realiza a função de manutenção da metilação, enquanto que a DNMT3A e DNMT3B realizam metilação *de novo* (Goll & Bestor 2005).

Demetilação do DNA acontece por oxidação de 5mC levando à formação de hidroximetilcitosina (5hmC) e, subsequentemente, de formilcitosina (5fC) e carboxilcitosina (5caC) (Figura 1) por atividade das enzimas *Ten-eleven translocation* (TET1, TET2 e TET3) (Huang & Rao 2012). Por sua vez, a recuperação do estado não modificado das citosinas acontece por ação da enzima *Thymine DNA glycosylase* (TDG), que realiza a remoção da citosina modificada e adição de citosina não-modificada na fita de DNA (Kohli & Zhang

2013). Mudanças nos níveis de expressão dos genes que codificam estas enzimas afetam as taxas de modificação do DNA e, assim, promovem alterações que podem culminar em câncer e erros de desenvolvimento (Rhee et al. 2002; Huang & Rao 2014).

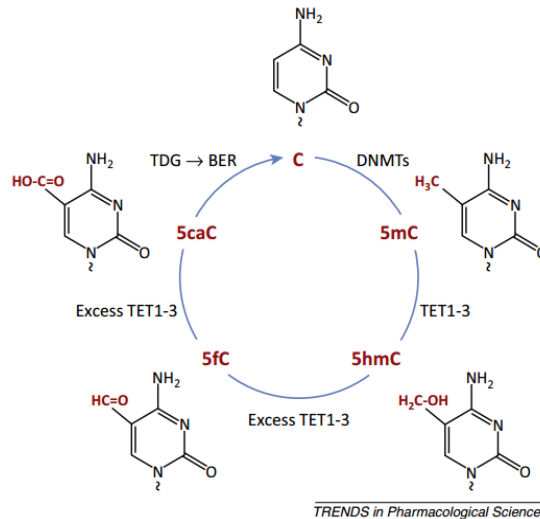


Figura 1. Ciclo de metilação do DNA indicando as variantes de citosina e as enzimas envolvidas nesse processo. Fonte: Ivanov et al. (2011).

A presença de 5mC está geralmente envolvida com inatividade de uma região genômica, como pode ser observado em promotores de genes silenciados, porém, esta marca é também enriquecida no corpo de genes ativos (Jones 2012). Esses dados contrastantes demonstram a importância de conhecer o contexto genômico para se compreender a função das epimarcas (Breiling & Lyko 2015). Por sua vez, apesar de serem intermediárias durante o processo de demetilação do DNA, 5hmC, 5fC e 5caC podem ocorrer de forma estável e definir o estado funcional de uma região genômica (Bachman et al. 2014, 2015; Eleftheriou et al. 2015). 5hmC está associada com atividade de acentuadores genéticos e corpo de genes, enquanto que 5fC e 5caC atuam no recrutamento da maquinaria de reparo do DNA (Breiling & Lyko 2015).

1.2.2. Pequenas RNAs não codificadoras

1.2.2.1. MicroRNAs

MicroRNAs são moléculas de aproximadamente 22 nucleotídeos que atuam na regulação pós-transcricional de genes por se ligarem ao RNA mensageiro, principalmente nas 3'-*untranslated regions* (3'UTR) promovendo sua degradação e, assim, o bloqueio do processo de tradução (Bartel 2004; Gosline et al. 2016). Esse mecanismo de regulação da expressão gênica ocorre em muitos processos biológicos e alterações na expressão de miRNAs podem produzir efeitos, como erros de desenvolvimento e doenças (Gosline et al. 2016).

Os genes de miRNAs são transcritos pela RNA polimerase II (Pol II) em miRNAs primários e, ainda no núcleo, são processados pelo complexo RNase III DROSHA e DGCR8 formando os precursores de miRNAs. No citoplasma, esses precursores são então processados pelo complexo RNase III DICER formando os miRNAs maduros (Cai et al. 2004; Lee et al. 2004). Quando os miRNAs maduros são incorporados ao complexo RISC, o controle pós-transcricional pode ocorrer de duas maneiras: se o miRNA se liga ao alvo com total complementariedade, o mRNA é clivado; por outro lado, se o miRNA possui complementariedade parcial com o mRNA, ocorre inibição da tradução (Chuang & Jones 2007) (Figura 2).

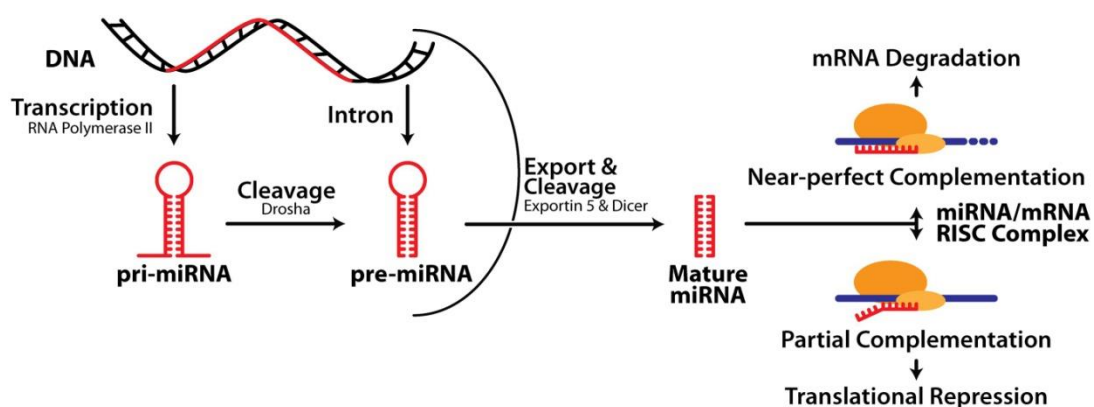


Figura 2. Biogênese e mecanismos de ação de miRNAs. Fonte: Ryan et al. (2015).

1.2.2.2. Fragmentos de RNAs transportadores

RNAs transportadores possuem importante papel na síntese proteica, ligando o código genético com o código de aminoácidos na sequência de proteínas. Essa função canônica, que inclusive dá nome a essas moléculas, tem sido revista e várias outras funções vem sendo atribuídas aos tRNAs, como a síntese de antibióticos, remodelamento do envelope celular, sinalização de estresse nutricional e formação de fragmentos de tRNA (Raina & Ibba 2014).

Os tRFs resultam da clivagem direcionada de tRNAs, variam em tamanho de 14 a 32 nucleotídeos e podem ser classificados em três grupos: tRF-1, tRF-3 e tRF-5 (Lee et al. 2009) (Figura 3). Estudos mostram a associação destas moléculas com as proteínas ARGONAUTAS e sua atividade na regulação da expressão gênica (Cole et al. 2009; Lee et al. 2009; Haussecker et al. 2010; Pederson 2010; Garcia-Silva et al. 2012; Kumar et al. 2014). No entanto, a pesquisa sobre tRFs encontra-se no começo e estes ainda precisam ser bastante explorados para que suas funções sejam claramente elucidadas.

A maquinaria molecular envolvida na formação de tRFs inclui as enzimas RNaseZ, Angiogenina e Dicer (Shigematsu et al. 2014). A gênese dessas moléculas ocorre durante o processo de maturação dos tRNAs, quando a classe tRF-1 é formada, e por clivagem do tRNA maduro, que leva à formação das classes tRF-5 e tRF-3 (Lee et al. 2009). Além disso, estudos indicam que a metilação de citosinas de tRNAs é importante para a eficiência da tradução e diminuições na expressão das enzimas que realizam esse processo levam à fragmentação de tRNAs e, portanto, formação de tRFs (Tuorto et al. 2012).

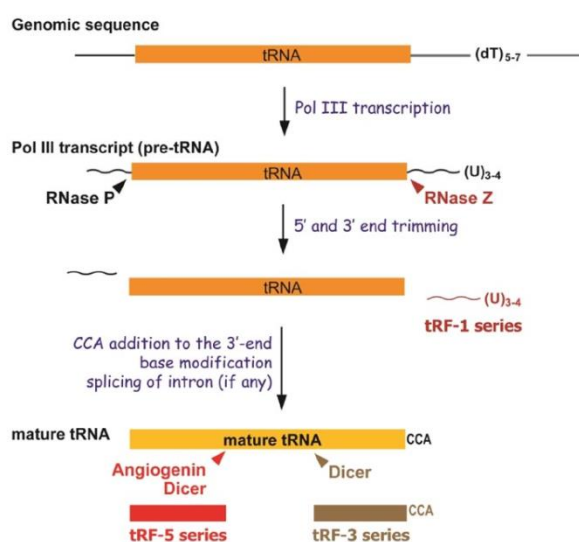


Figura 3. Biogênese e classificação dos tRFs. Fonte: Fu et al. (2015).

1.3. *Astatotilapia latifasciata* como modelo para estudos sobre a biologia de cromossomos B

Astatotilapia latifasciata é um peixe ciclídeo pertencente à subfamília Pseudocrenilabrinae, natural dos lagos Kyoga e Nawampasa, que são lagos satélites do lago Vitória, no leste Africano (Steeves et al. 2010). Esta espécie possui cariótipo padrão constituído por 44 cromossomos, sendo 14 meta-submetacêntricos e 30 subtelo-acrocêntricos, sem cromossomos sexuais diferenciados morfologicamente. Alguns indivíduos desta espécie possuem um ou dois cromossomos B metacêntricos, com tamanho de 3,35 μm , o que corresponde a 6,48% do genoma total, e que se mostram totalmente heterocromáticos e constantes em todas as células dos indivíduos que as possuem (Fantinatti et al. 2011).

Mapeamento físico cromossômico indica acúmulo de sequências repetitivas nestes cromossomos, incluindo DNA ribossomal 18S inativo. Esta abordagem também revela uma relação estreita entre o conteúdo genômico do cromossomo B e o maior cromossomo do complemento A (par 1). Deste modo, sugere-se que estes elementos supernumerários tenham surgido por aneuploidia de algum cromossomo do complemento A, seguido por perda de eucromatina, formando um proto-cromossomo B. Posteriormente, ocorreu ganho de sequências repetitivas em um braço cromossômico seguido da formação de um isocromossomo (Poletto et al. 2010; Fantinatti et al. 2011).

Visando explorar com mais detalhes o conteúdo de cromossomos B de *A. latifasciata*, um estudo usando abordagens genômicas integradas, dentre elas o sequenciamento de genomas inteiros, foi conduzido e revelou que, além do acúmulo de sequências repetitivas, existem cópias gênicas com alta integridade e de fragmentos de genes nos cromossomos supernumerários (Valente et al. 2014). Mais recentemente foram sequenciadas bibliotecas de pequenos (Fantinatti 2015) e longos RNAs (Marques 2016) de diversos tecidos, indicando que cromossomos supernumerários afetam a expressão de genes e de miRNAs e revelando aspectos funcionais destes elementos. Outros estudos revelam a diversidade de sequências presentes nestes elementos, como a presença de retrogenes (Carmello 2015) e RNAs longos não codificadores (Ramos et al. 2017). Assim, este conjunto de abordagens diversificadas e complementares tem tornado a espécie *A. latifasciata* um modelo importante na compreensão da origem, evolução e função de cromossomos B.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Explorar os efeitos de cromossomos B nas vias de modificações epigenéticas do DNA e de formação de tRFs no ciclídeo *Astatotilapia latifasciata*.

2.2. Específicos

- Identificar os padrões de modificações epigenéticas do DNA no cromossomo B de *A. latifasciata*;
- Identificar genes da maquinaria de metilação e demetilação do DNA diferencialmente expressos por efeito do cromossomo B;
- Identificar epi-miRNAs e avaliar sua expressão por efeito do cromossomo B;
- Avaliar os efeitos do cromossomo B no conteúdo global de 5mC e 5hmC;
- Identificar tRFs e avaliar sua expressão por efeito do cromossomo B;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostras

Linhagens de *Astatotilapia latifasciata* mantidas no biotério do Laboratório Genômica Integrativa (Universidade Estadual Paulista – Botucatu), nas quais se identificou a presença de indivíduos portadores de cromossomos B, foram utilizadas neste estudo. Os procedimentos laboratoriais foram realizados de acordo com os princípios de ética estabelecidos pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA) e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA) do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu (Protocolo nº: 486-2013).

Em vista de minimizar os efeitos de outras variáveis durante as análises, quatro proles foram usadas neste estudo. Os animais foram mantidos em aquários com condições ambientais padronizadas e a coleta de tecidos foi sempre realizada no período da tarde.

3.2. Genotipagem

Em vista de otimizar as análises e direcioná-las a organismos específicos, foi realizada genotipagem dos indivíduos visando identificar portadores e não portadores de cromossomos B. Assim, PCRs (*Polymerase chain reaction*) foram conduzidas utilizando-se um conjunto de *primers* que amplificam uma região específica presente em cromossomos B e uma região controle (Fantinatti et al. 2016). As reações com volume total de 15 uL foram constituídas por 9,76 uL de água ultrapura, 0,56 uL de dNTP (8mM) (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 0,45 ul de MgCl₂, 1,5 uL de tampão para Taq DNA Polimerase (10X), 0,4 uL de cada *primer*, 0,13 uL de Taq Polimerase (5U/uL) e 1uL de DNA genômico (100 ng/uL). As condições de ciclagem foram: 95°C por 5 minutos, 95° por 1 minuto, 60°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos, repetir as etapas 2-3 34 vezes, 72°C por 30 segundos e 4°C para finalizar.

3.3. Obtenção de cromossomos mitóticos

Os cromossomos metafásicos foram obtidos seguindo o protocolo de Bertollo et al. (1978) com algumas adaptações. Para indução mitótica foi injetada solução de fermento

biológico (0,5g de fermento biológico, 0,5g de sacarose e 7mL de água) na proporção de 1mL para cada 100g de peso do animal. Em seguida, os animais foram mantidos em tanque aerado por 72h. Após isso, solução de colchicina (0,025%) na proporção 1ml/100g de peso corpóreo foi injetada nos animais e estes foram mantidos em aquário por 45 minutos. Os peixes foram, então, anestesiados com eugenol e sacrificados. O rim foi extraído, colocado em placa de Petri contendo 5 ml de solução hipotônica de cloreto de potássio (5,9g de cloreto de potássio para 1 litro de água destilada) e dissociado com ajuda de uma seringa de vidro. A suspensão celular obtida foi mantida em estufa a 37°C por 35 minutos. Após isso, o material foi cuidadosamente transferido para um tubo de centrífuga de 15 mL, onde foram adicionadas 5 gotas de fixador Carnoy 3:1 (3 partes de metanol para 1 parte de ácido acético) e o material foi homogeneizado por pipetagem. Em seguida, o material foi centrifugado por 900 rpm durante 10 minutos, o sobrenadante foi descartado, 3 mL de fixador Carnoy 3:1 foram adicionados e o material homogeneizado. Essa etapa foi repetida mais duas vezes e o material foi mantido em *freezer* até o momento do uso.

3.4. Imunolocalização de modificações epigenéticas do DNA

Os procedimentos seguiram o protocolo descrito em Rens et al. (2010). Os cromossomos fixados em lâminas foram desidratados em série alcóolica (70%, 85% e 100%), por 5 minutos em cada. Posteriormente, foram desnaturados em solução de ácido clorídrico 2M por 15 minutos, seguido de banho em borato de sódio 0,1 M (pH=8,4) por 1 minuto e lavagem em 1XPBS por 3 minutos. Em seguida, os cromossomos foram desidratados em série alcóolica e reidratados em 1XPBS por 3 minutos. Solução de bloqueio 1XPBT (10% albumina sérica bovina – BSA) foi aplicada sobre as lâminas e elas foram mantidas em temperatura ambiente por 1 hora. Os anticorpos primários (1 anticorpo:600 BSA 1%) foram aplicados sobre as lâminas e mantidos durante 12h em geladeira. As lâminas foram lavadas em PBT (1XPBS, Tween 0,1%) 3 vezes por 10 minutos em cada. Anticorpos secundários (1 anticorpo:300 BSA 1%) foram aplicados sobre as lâminas e mantidos por 1 hora em temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas em PBT (1XPBS, Tween 0,1%) 3 vezes por 10 minutos em cada. 15 uL de solução Vectashield contendo DAPI (10ug/mL) foram aplicados sobre cada lâmina e elas foram cobertas com lamínulas e levadas ao microscópio para análise.

3.5. Extração de DNA

Extração de DNA foi realizada com o kit Dneasy® Blood & Tissue Kit (Promega) de acordo com as instruções do fabricante.

3.6. Extração de RNA

RNA foi extraído com Trizol® Reagent (Thermo Fisher Scientific) seguindo informações do fabricante. A integridade do RNA (*RIN – RNA Integrity Number*) foi avaliada com o uso do equipamento 2011 Bionalyzer (Agilent) e foram usadas nos experimentos amostras com valor de RIN superior a 7.

3.7. Produção de primers

Os *primers* (Tabela 1) para amplificação de regiões codificadoras de proteínas foram desenhados a partir de sequências do genoma de indivíduo de *A. latifasciata* não portador de cromossomo B (previamente sequenciado, M Jehangir, dados não publicados) que foram recuperadas usando-se o programa Blastall e sequências de *Oreochromis niloticus* obtidas no banco de dados do Ensembl. Por sua vez, os *primers* para amplificação de pequenos RNAs (Anexo – Figura 1) foram desenhados a partir de sequências de miRNAs e tRFs maduros identificados em bibliotecas de pequenos RNAs de *A. latifasciata*. Os *primers* foram desenhados utilizando-se as ferramentas PCR Primer Stats e Primer3, seguindo instruções que permitem sua utilização em experimentos de qPCR (Bustin et al. 2009).

Tabela 1. Lista de primers usados no presente estudo.

Primer	Sequência (5'-3')
Ubce-f	GTCCGTTTCAATCCCAACTT
Ubce-r	GTTCTCCGTCATCAGAGACT
Dnmt1-f	CACCTCCAGCAGTTCATCGT
Dnmt1-r	AGCAGACCCAGTGCAA ACTT
Dnmt3a-f	TGTCGCCATCGAAGGAGAAG
Dnmt3a-r	AACCAGCTCGCCGATGCCAA
Dnmt3b-f	GTTTCAGGTGCGTGCCACTGT

Dnmt3b-r	GATACCATTTGTGCTGAAGGC
Tet1-f	GGAGTCTGTGTATGAGGTAT
Tet1-r	GATAAGGTGGTTCCAGAAAGTG
Tet2-f	GAATGCTCTGGTGGTGTTC
Tet2-r	AGAGCAATCCAATGGCAGGA
Tet3-f	ACCACTGTTACAAAGTTAC
Tet3-r	TCATTAGGGTACTGATTCAC
Tdg-f	GTGCTCCTTCTGTATTTTCA
Tdg-r	GATGCCAAGAGGCTGGCAAT
Trdmt1-f	GTTTCCCAGTAGTCTATACT
Trdmt1-r	GCTCTGAGGAGGAGAACTT
Dicer1-f	CCTGGACAGATACGCCTCTC
Dicer1-r	GTCATTGAGGACCTGTTTGGAG
Elac1-f	GTTTCAGGCCTAGTTCCTTCAGC
Elac1-r	CAGGTTGTTTCACCGCATCC
Elac2-f	GCAGCTTGGAAGATACCAGACAG
Elac2-r	CTCTCCATCCACTTCTTGTATTGGTC
SL-poly(A)	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGAC AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAVN
Universal-r	GCAGGGTCCGAGGTATTCG
U6-f	ATGACACGCAAATTCGTGAAG
miR-29b-f	CCTAGCACCATTTGAAATCAGTGTTT
miR-132b-f	AGACCATGGCTGTAGACTGTTACC
miR-181a-f	CCATCGACCGTTGACTGTACCT
miR-17a-f	CCAGTGGAGGCACTTCAAGCTTT
miR-30b-3p-f	CTTTTCAGTCGGATGTTTGCAGC
miR-199-5p-f	GCCCAGTGTTTCAGACTACCTGTTT
tRF5_MetCAT_f	CAGAGTGGCGCAGCGGAAT
tRF5_ProTGG_f	GCTCGTTGGTCTAGGGGTATGATTC

3.8. PCR quantitativa (RT-qPCR)

DNA complementar (cDNA) para avaliar a expressão de RNAs mensageiros foi sintetizado com uso do kit High Capacity (Life), seguindo as instruções do fabricante. Por outro lado, para avaliar a expressão de pequenos RNAs usou-se o método descrito por Mei et al. (2012). A primeira etapa deste método consiste na poliuridilação da porção 3' dos pequenos RNAs. Em seguida, um *primer* complementar à cauda poli(U) dos RNAs, previamente inserida na etapa anterior, e que possui uma estrutura em forma de grampo é usado para sintetizar o cDNA.

1 microlitro de cDNA (4 ng/uL) foi amplificado usando-se o kit GoTaq qPCR Master Mix (Promega) e 400 nM de cada *primer* em um volume final de 20 uL. As condições de ciclagem foram: 10 minutos a 95°C, 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos e anelamento e extensão a 60°C por 1 minuto. Os níveis de expressão foram detectados no sistema Step One Plus (Life). Os dados foram normalizados usando-se o programa Q-Gene (Muller et al. 2002; Simon 2003).

3.9. Quantificação global de 5-metilcitosina e 5-hidroximetilcitosina

Quantificação dos níveis globais de 5mC e 5hmC foram obtidos com os kits *MethylFlash™ Methylated DNA Quantification* e *MethylFlash™ Hydroxymethylated DNA Quantification* (Epigentek), respectivamente, seguindo as instruções dos fabricantes. Os experimentos foram conduzidos em duplicatas com concentração inicial de DNA de 100ng/uL por amostra. As porcentagens de DNA metilado e hidroximetilado foram detectadas mensurando-se a absorbância em 450nm e usando a fórmula descrita pelos fabricantes.

3.10. Sequenciamento de bibliotecas de pequenos RNAs

Bibliotecas de pequenos RNAs de cérebro, músculo e gônadas, previamente sequenciadas (Fantinatti 2015), foram utilizadas neste estudo. A preparação das bibliotecas e sequenciamento via plataforma *next-generation* Illumina HiSeq foi realizada pela empresa *LC Science* utilizando-se o kit TruSeq Small RNA Sample Prep com purificação da fração de pequenos RNAs em gel de poliacrilamida. Os dados brutos do sequenciamento estão

depositados no banco de dados do Laboratório Genômica Integrativa (Instituto de Biociências de Botucatu – IBB).

3.11. Identificação de epi-miRNAs e tRFs

Epi-miRNAs foram identificados usando-se os preditores PITA (Kertesz et al. 2007), miRanda (Enright et al. 2004) e RNAhybrid (Krüger & Rehmsmeier 2006) nas listas de miRNAs expressos em *A. latifasciata* disponibilizadas por Fantinatti et al. (2015). As regiões 3'UTR foram obtidas de anotações genômicas disponíveis nas bases de dados SaciBASE e BouillaBase.

Por sua vez, para identificação dos tRFs, os *reads* das bibliotecas sequenciadas foram filtrados por qualidade com uso do programa FastQC versão 0.10.1, seguido da remoção dos adaptadores pelo programa Fastx-toolkit e seleção de *reads* com tamanho entre 14 e 32 pares de base. Após isso, os *reads* resultantes foram alinhados contra o genoma de *A. latifasciata* para eliminação de contaminantes e contra a lista de miRNAs do miRBase para excluir essa classe de pequenos RNAs das análises, com uso do programa Bowtie2. Em seguida, os *reads* que alinharam no genoma e que não alinharam na lista de miRNAs foram usados em um novo alinhamento contra a lista de tRNAs de *Danio rerio* disponíveis no tRFdb. Para identificação de tRFs diferencialmente expressos usou-se o pacote DEseq.

3.12. Interações RNA-proteínas

Para verificar a possibilidade de interação entre RNAs e proteínas utilizou-se os programas RPIseq (Muppirala et al. 2011) e RPI-Pred (Suresh et al. 2015), que se baseiam em dados de sequências para realizar as predições.

3.13. Análise estatística

Para comparações dos dados de expressão gênica, as amostras foram agrupadas em quatro classes: machos não portadores de cromossomo B (MB-), machos portadores de cromossomo B (MB+), fêmeas não portadoras de cromossomo B (FB-) e fêmeas portadoras

de cromossomo B (MB+). A variável sexo foi inserida nas análises em vista de explorar seu efeito interagindo com o cromossomo B, uma vez que estudos em outros ciclídeos mostram efeitos importantes da combinação destas variáveis, como a determinação sexual (Yoshida et al. 2011).

Os dados de expressão gênica foram comparados usando-se o *software SAS* com um modelo linear generalizado (*Generalized Linear Model – GLM*) ajustado para modelar a média observada em função das variáveis categorizadas sexo e presença de cromossomo B, considerando a distribuição Gama para as variáveis respostas analisadas. O nível de significância estatística usado foi de 5% ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. O cromossomo B de *Astatotilapia latifasciata* possui padrão epigenético ativo

A imunolocalização das epimarcas 5mC e 5hmC mostrou que o cromossomo B possui padrão de distribuição similar ao do complemento A (Figura 4). Esse resultado é diferente do esperado, uma vez que dados prévios indicam que este elemento é totalmente heterocromático (Poletto et al. 2010; Fantinatti et al. 2011), o que poderia indicar que ele é inteiramente metilado, como observado em *Nyctereutes procyonoides procyonoides* (Bugno-Poniewierska et al. 2014). Conseqüentemente, o padrão de marcas epigenéticas do DNA presente no cromossomo B indica que ele pode ser funcional. É provável que, apesar de várias seqüências deste cromossomo estarem evoluindo de forma neutra (Valente et al. 2014), o seu estado epigenético ativo deva garantir a funcionalidade de cópias gênicas que possuem papel importante na sua manutenção e transmissão. A presença de cópias de genes relacionadas com essas funções e com altos níveis de integridade neste elemento (Valente et al. 2014), além dos efeitos que são discutidos abaixo, suportam esta ideia.

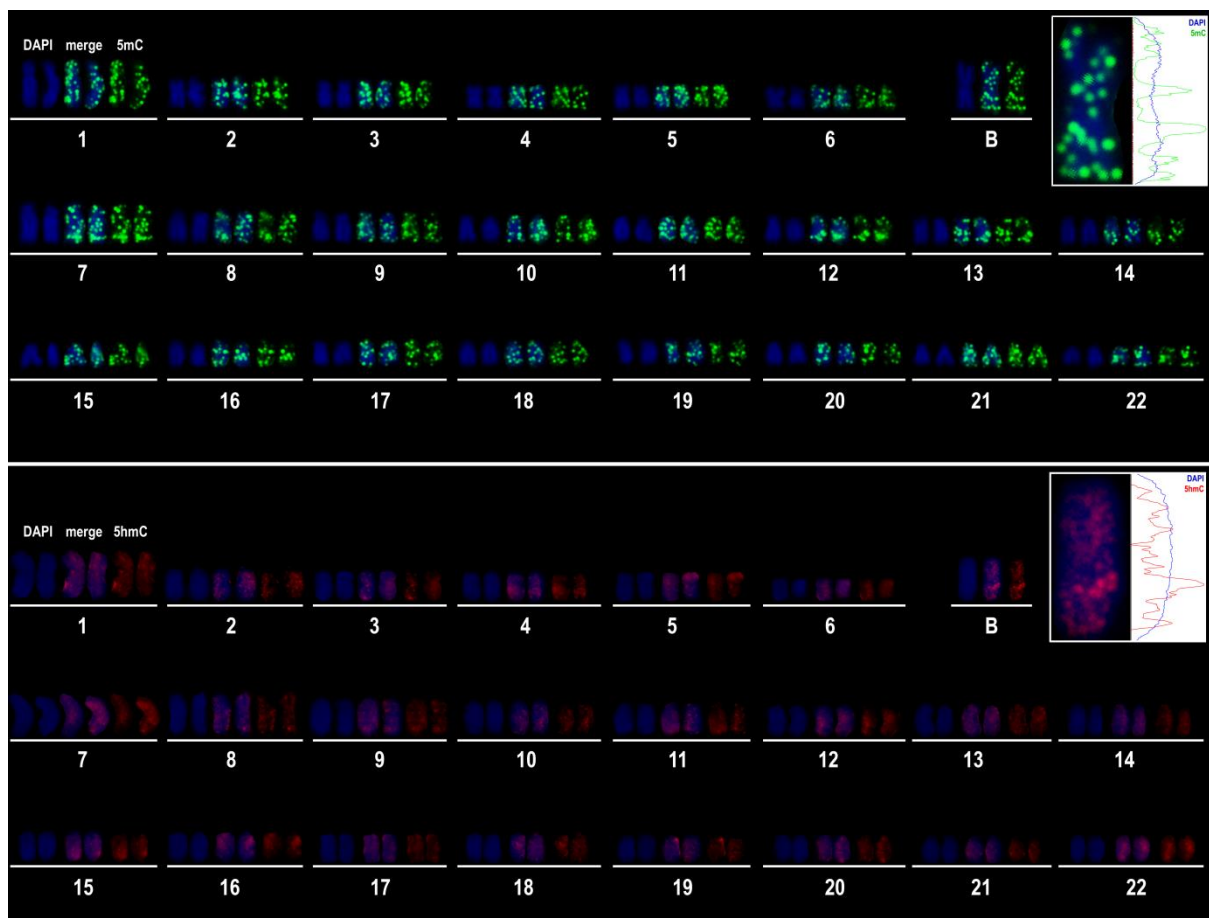


Figura 4. Imunolocalização das epimarcas 5mC (verde) e 5hmC (vermelho) em

cromossomos metafásicos de *A. latifasciata*. Em destaque está o cromossomo B.

4.2. O cromossomo B de *A. latifasciata* não é um isocromossomo

Trabalhos prévios usando técnicas clássicas de citogenética e mapeamento físico de sequências repetitivas indicam que o cromossomo B de *A. latifasciata* é um isocromossomo (Poletto et al. 2010; Fantinatti et al. 2011; Valente et al. 2014). No entanto, o padrão de distribuição das marcas 5mC e 5hmC é diferente entre os braços do cromossomo supernumerário (Figura 4), o que sugere que a organização da cromatina e a composição de sequências são divergentes entre eles. De fato, regiões cromossômicas definidas por padrões epigenéticos podem ter sua composição genética e funcionalidade reveladas por estas marcas (Rens et al. 2010; Terrenoire et al. 2010). Assim, o estado de isocromossomo deve ter sido uma etapa durante o processo de evolução deste cromossomo e mutações devem ter promovido a divergência entre os seus braços. Isso pode ser corroborado por análises de pressão seletiva de cópias gênicas presentes no cromossomo supernumerário, que indicam que ele vem evoluindo de forma neutra (Valente et al. 2014).

4.3. Cromossomos B impactam a transcrição de genes de modificação do DNA

Uma das maneiras de afetar o epigenoma das células é alterando o nível de expressão de genes que codificam efetores epigenéticos (Huettel et al. 2008), uma vez que o controle transcricional desses genes pode ser responsável pelo nível de proteínas ou atividade enzimática (Ciccarone et al. 2016). Assim, cromossomos B podem diretamente promover estes efeitos se eles hospedarem cópias ativas destes genes. No entanto, em um trabalho prévio, conduzido por Valente et al. (2014), cópias desses genes não foram encontradas nestes cromossomos. Por isso, foram analisados os níveis de expressão de cópias de genes envolvidos com modificações do DNA localizadas no complemento A e observou-se efeitos heterogêneos de cromossomos B entre os diferentes tecidos e sexos (Figura 5; Tabela 2). Essas diferenças representam efeitos *in trans* de cromossomos supernumerários, uma vez que eles afetam a expressão de genes não contidos neles. Esses tipos de efeitos já foram registrados em *A. latifasciata* (Ramos et al. 2017; Valente et al. 2016), assim como em centeio (Carchilan et al. 2009; Banaei-Moghaddam et al. 2013) e milho (Lin et al. 2014; Huang et al. 2016).

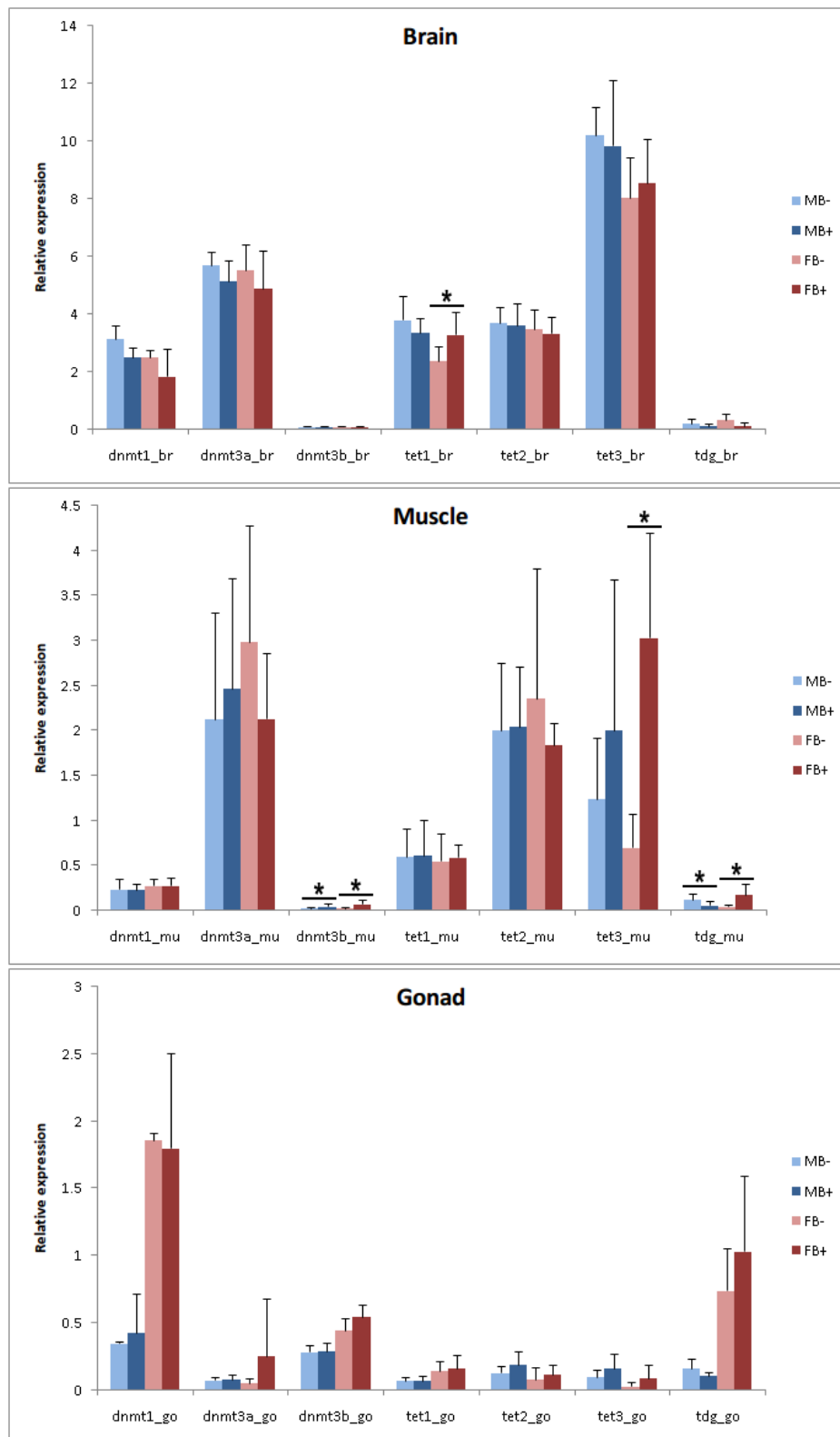


Figura 5. Expressão relativa de genes da maquinaria de metilação e demetilação do DNA sob efeito de cromossomos B. Asteriscos indicam diferenças estatísticas.

Tabela 2. Efeitos de cromossomos B e do sexo na expressão de genes de modificação do DNA.

Tecido	Gene	Efeito do cromossomo B	Efeito de sexo	Interação cromossomo B e sexo
Cérebro	<i>Dnmt1</i>			
Cérebro	<i>Dnmt3a</i>			
Cérebro	<i>Dnmt3b</i>			
Cérebro	<i>Tet1</i>	(↑FB+)		
Cérebro	<i>Tet2</i>			
Cérebro	<i>Tet3</i>			
Cérebro	<i>Tdg</i>			
Músculo	<i>Dnmt1</i>			
Músculo	<i>Dnmt3a</i>			
Músculo	<i>Dnmt3b</i>	(↑B+)		
Músculo	<i>Tet1</i>			
Músculo	<i>Tet2</i>			
Músculo	<i>Tet3</i>	(↑FB+)		
Músculo	<i>Tdg</i>	(↓MB+, ↑FB+)		(↓MB+, ↑FB+)
Gônada	<i>Dnmt1</i>		(↑F)	
Gônada	<i>Dnmt3a</i>			(↑FB+)
Gônada	<i>Dnmt3b</i>		(↑F)	
Gônada	<i>Tet1</i>		(↑F)	
Gônada	<i>Tet2</i>			
Gônada	<i>Tet3</i>		(↓F)	
Gônada	<i>Tdg</i>		(↑F)	

4.4. Causas das variações nos níveis de transcrição de genes de modificação do DNA

De acordo com Banaei-Moghaddam et al. (2015), transcritos provenientes de cromossomos supernumerários podem atuar como reguladores epigenéticos pós-transcricionais, como esponjas de miRNAs, por exemplo, que é uma suposta função atribuída ao elemento BncRNA, um potencial RNA não codificador enriquecido no cromossomo B de *A. latifasciata* (Ramos et al. 2017). Além disso, observou-se que um gene localizado no cromossomo supernumerário de centeio codifica uma proteína ARGONAUTA funcional (Ma et al. 2017). Assim, para verificar as causas dos efeitos de cromossomos B na expressão de genes de modificação do DNA, foi realizada a predição de miRNAs que regulam estes genes em bibliotecas sequenciadas de pequenos RNAs. As predições identificaram miRNAs candidatos para quase todos os genes (Tabela 3) e o nível de expressão destes epi-miRNAs

foi verificada (Figura 6). No entanto, apenas o miR-29b-3p teve sua expressão afetada pela presença de cromossomo B, mas não correlacionada com seus alvos (Anexo – Figura 2). Assim, estes dados indicam que miRNAs analisados não estão envolvidos com mudanças na expressão dos genes. Portanto, outros mecanismos de regulação da expressão gênica devem estar envolvidos com os efeitos na expressão destes genes.

A organização espacial da cromatina, por exemplo, é importante para a funcionalidade do genoma e, como observado em centeio (Delgado et al. 1995, 2004), cromossomos B podem modular a expressão de genes do complemento A por meio de efeitos na organização espacial do genoma no núcleo da célula. De fato, o cromossomo supernumerário de *A. latifasciata* possui tamanho médio de 3,35 μm , o que corresponde a 6,48% do genoma (Fantinatti et al. 2011) e isso poderia promover estes efeitos espaciais. Finalmente, apenas o fato do cromossomo B ser cromatina adicional, que também sofre processamento epigenético, poderia explicar os casos de aumento da expressão de alguns genes.

Tabela 3. Epi-miRNAs preditos pelos programas PITA, miRanda e RNAhybrid.

Tecido	Gene	miRNA
Cérebro	<i>Tet1</i>	ccr-miR-29b-3p
Músculo	<i>Dnmt3b</i>	ccr-miR-132b
Músculo	<i>Tet3</i>	ola-miR-199a-5p
Músculo	<i>TDG</i>	dre-miR-181a-2-3p, dre-miR-17a-2-3p

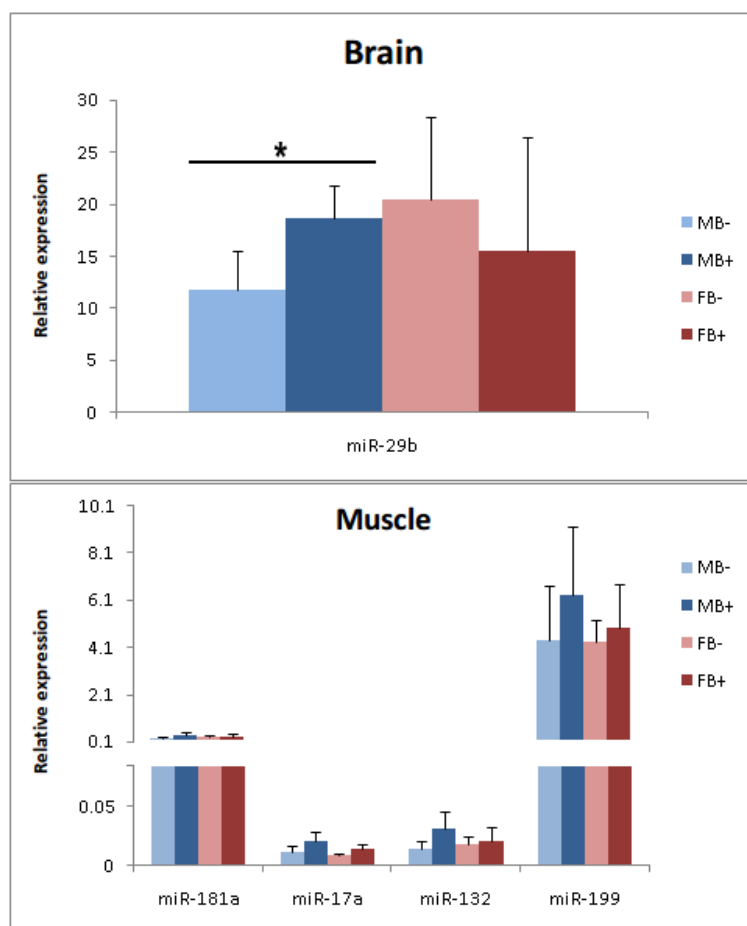


Figura 6. Expressão relativa de miRNAs reguladores de genes da maquinaria de metilação e demetilação do DNA sob efeito de cromossomos B. Asterisco indica diferença estatística.

4.5. Cromossomos B alteram os níveis globais de 5-metilcitosina e 5-hidroximetilcitosina

Foram observados efeitos de cromossomos B na expressão de vários genes em músculo, porém, elas não promoveram alterações nos níveis de 5mC e 5hmC (Figura 7). Isso pode indicar que estes efeitos não foram suficientes para mudar os níveis enzimáticos e, assim, não promoveram efeitos epigenéticos. Além disso, isso pode refletir a ocorrência de algum mecanismo que equilibre os efeitos espúrios do cromossomo supernumerário. Por outro lado, efeitos nos níveis de 5mC e 5hmC foram observados em cérebro de fêmeas e ovários.

4.5.1. Cromossomos B promovem demetilação ativa em cérebro de fêmeas

Em cérebro de fêmeas portadoras de cromossomo B, o gene *Tet1* é mais expresso e

isso está correlacionado com redução dos níveis globais de 5mC e aumento de 5hmC, indicando que os níveis da enzima TET1 foram alterados por algum mecanismo de regulação transcricional discutido acima. Isso pode indicar que hipometilação é um importante mecanismo para garantir a função de genes envolvidos com o sistema nervoso, que foram apontados como importantes genes em manter o cromossomo B em *A. latifasciata*.

4.5.2. Cromossomos B promovem demetilação passiva em ovários

Demetilação do DNA também foi registrada em ovários, mas neste caso, esse evento foi independente de desregulação de *Tet/Tdg*. Porém a demetilação do DNA pode também estar associada com atividade reduzida da enzima DNMT1 durante a replicação do DNA (Kohli & Zhang 2013). No entanto, este gene também não se mostrou alterado em gônadas. Por sua vez, a interação de vários RNAs com DNMT1 foi mostrado estar envolvido com redução da função desta enzima (Di Ruscio et al. 2013). Interessantemente, o elemento BncRNA, que possui expressão aumentada em portadores de cromossomo supernumerário (Ramos et al. 2017), pode interagir com a DNMT1 e poderia atuar como um inibidor desta enzima, promovendo assim, demetilação do DNA (Anexo – Tabela 1). Além disso, o cromossomo B pode ser fonte de produção de vários tipos de RNAs que podem promover o mesmo tipo de efeito.

Hipometilação do DNA em gônadas está de acordo com a ideia de que este mecanismo é importante para a manutenção do cromossomo B, principalmente pelo fato de ovários serem responsáveis pela transmissão deste elemento para as próximas gerações. Neves et al. (1992) mostraram que demetilação do DNA em centeio afeta a transmissão de cromossomos B por mitose, o que pode sugerir que o resultado observado aqui representa um efeito desvantajoso de cromossomos supernumerários nas mitoses que precedem as divisões meióticas durante a produção de oócitos. Por outro lado, é possível que hipometilação em ovários seja um mecanismo que ajuda a orientar a transmissão de cromossomos B para o oócito secundário. Em outras palavras, isso poderia representar um mecanismo de *drive*, que é frequentemente registrado em fêmeas durante a transmissão destes cromossomos (Camacho et al. 2000).

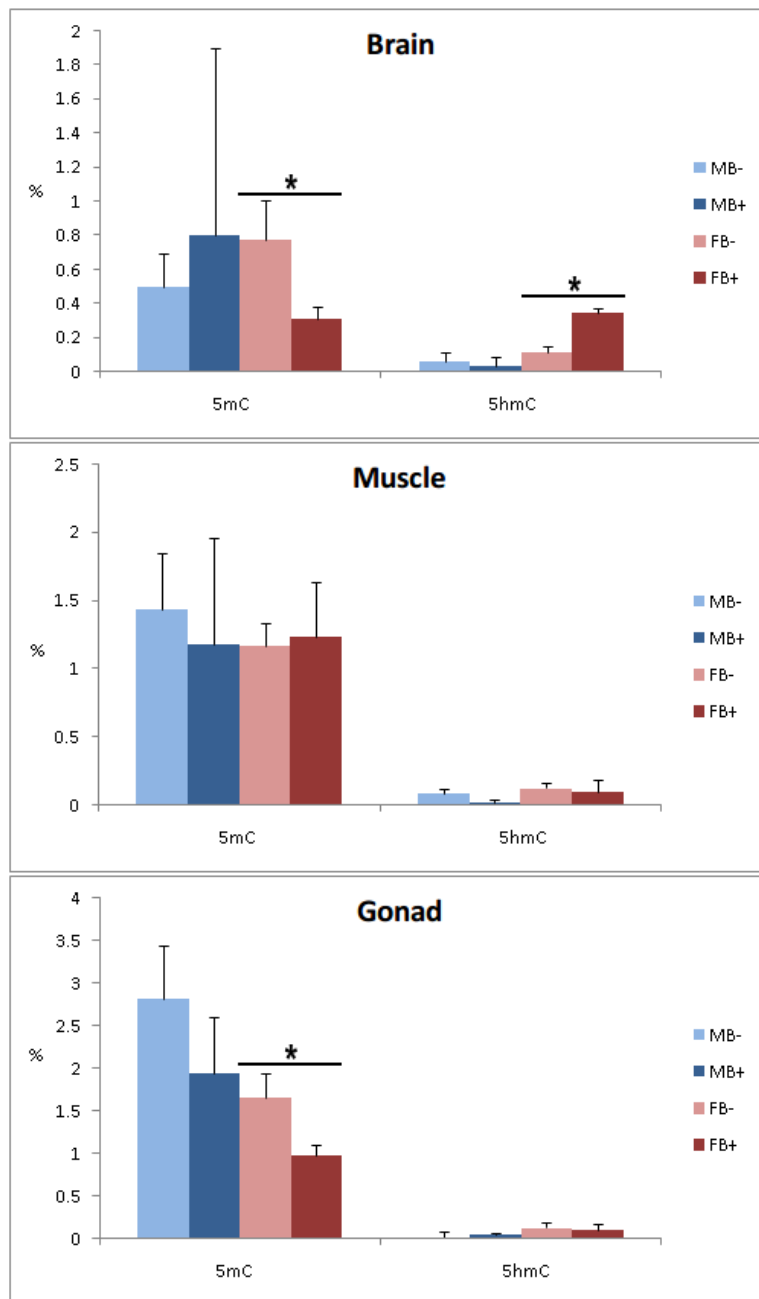


Figura 7. Efeitos de cromossomos B nos níveis globais de 5-metilcitosina e 5-hidroximetilcitosina. Asteriscos indicam diferenças estatísticas.

4.6. Identificação de tRFs e sua formação por efeito de cromossomos B

Os alinhamentos dos *reads* das bibliotecas de pequenos RNAs contra as sequências de tRFs de *Danio rerio* identificaram 87 tRFs em *A. latifasciata* (Anexo – Tabela 2), sendo 70 expressos em cérebro, 63 em músculo e 74 em gônadas. Verificou-se que o cromossomo B inibe a formação de 5 espécies de tRFs em cérebro de fêmeas, 4 em músculo de machos e 1

em testículos. Além disso, este elemento promove a expressão de 1 tRF exclusivo em testículos e outro em ovários (Figura 8).

Dentre os tRFs que foram expressos em todos os tecidos, apenas em músculo foram observados efeitos de cromossomos B em sua formação, sendo o tRF-5-ProTGG mais expresso em fêmeas portadoras de cromossomo supernumerário e o tRF-5-MetCAT menos expresso em machos portadores deste elemento (Figura 9). No entanto, a quantificação destes tRFs por RT-qPCR mostra que ambos são sutilmente mais expressos em portadores de cromossomo B (Figura 10). Na realidade, os dados mostram grande diversidade na expressão dos tRFs entre os indivíduos, indicando que eles se comportam de maneira diferencial em cada organismo. Essas variações podem ser explicadas por alterações na expressão dos genes que codificam enzimas envolvidas com a gênese de tRFs (Figura 11; Tabela 4).

Os tRFs com expressão impactada pelo cromossomo B ainda precisam ter seus alvos preditos para verificar os reais efeitos dessas variações. No entanto, os dados aqui apresentados revelam um aspecto de efeitos de cromossomos B ainda não explorado e ampliam a diversidade de efeitos que estes elementos podem promover em seus portadores.

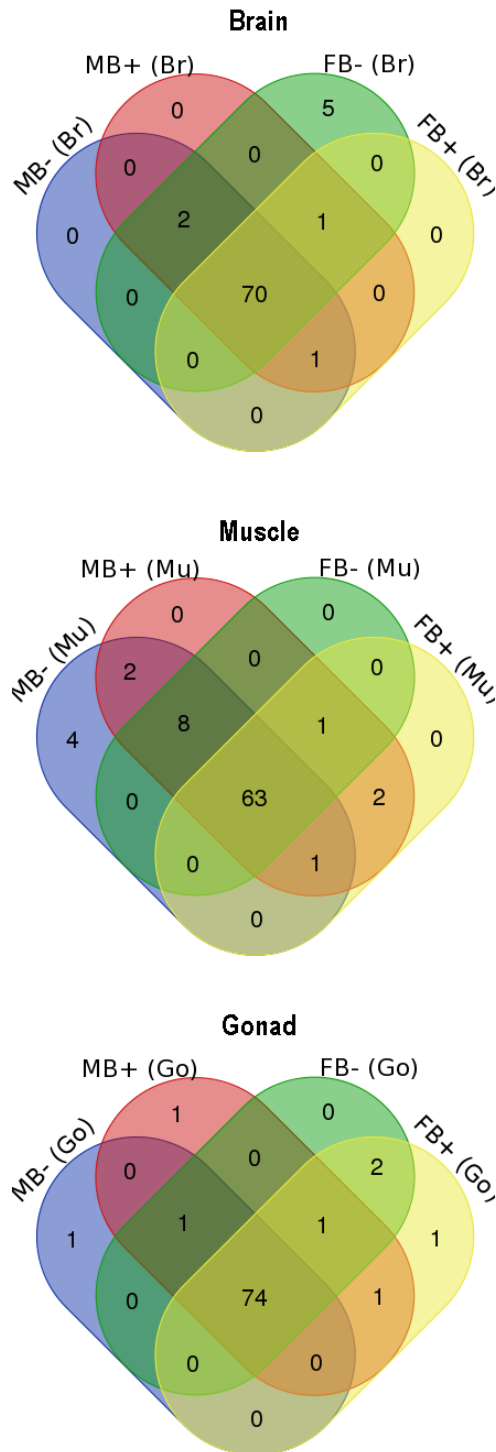


Figura 8. Diagramas de Venn representando o número de tRFs identificados. Machos não portadores de cromossomos B (MB-); machos portadores de cromossomos B (MB+); fêmeas não portadoras de cromossomos B (FB-); fêmeas portadoras de cromossomos B (FB+).

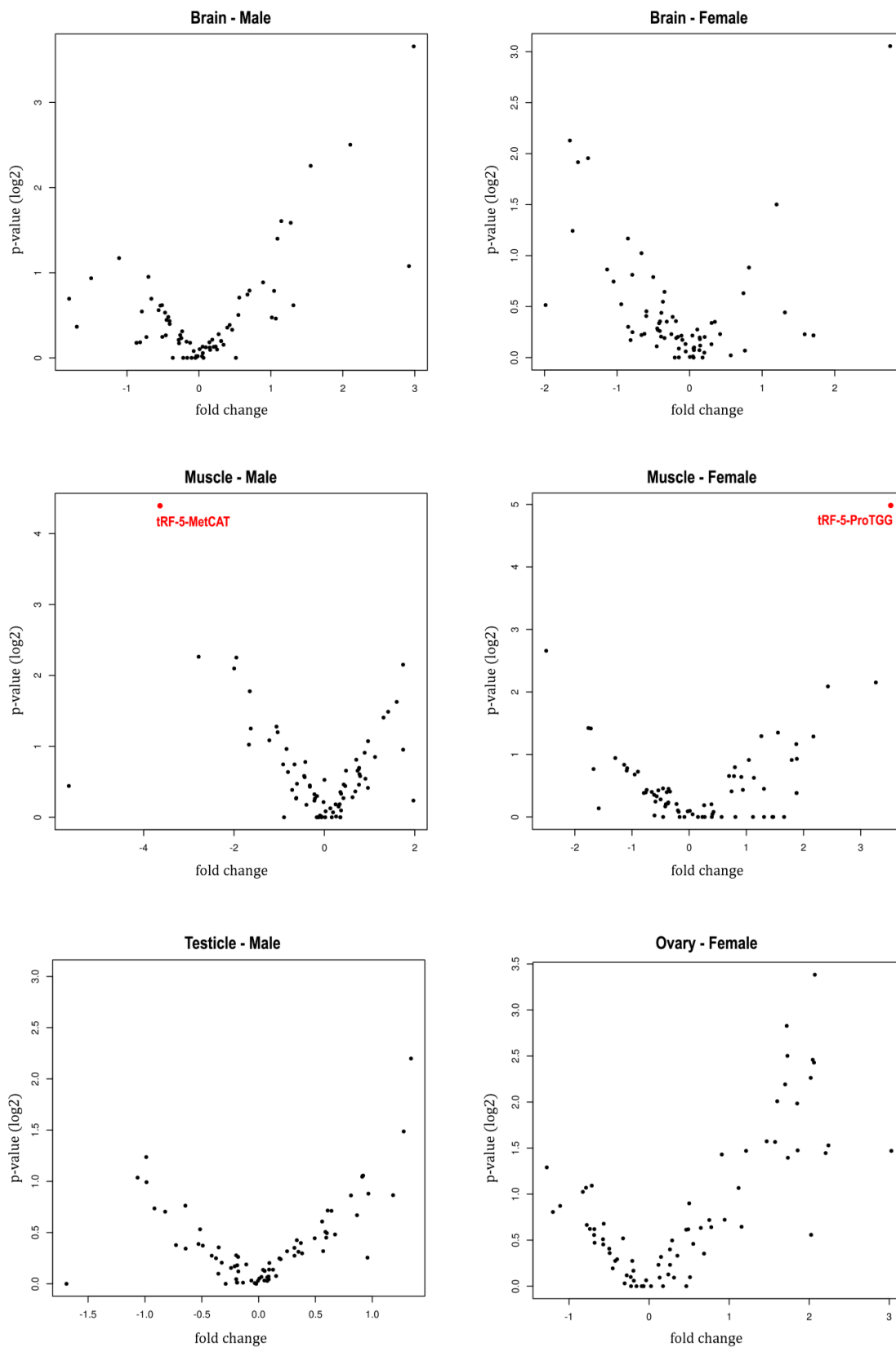


Figura 9. Expressão de tRFs em bibliotecas de pequenos RNAs sem cromossomo B versus bibliotecas portadoras de cromossomo B. Pontos em vermelho indicam tRFs diferencialmente expressos.

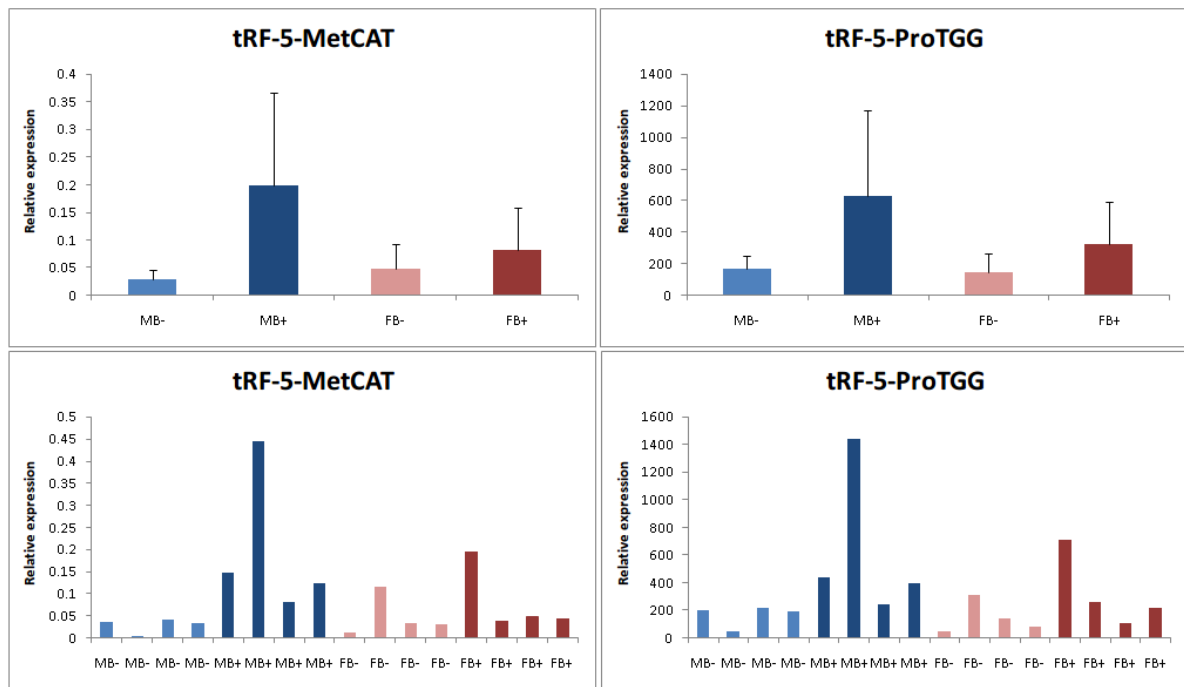


Figura 10. Expressão relativa de tRFs (RT-qPCR) identificados como diferencialmente expressos nas bibliotecas de músculo.

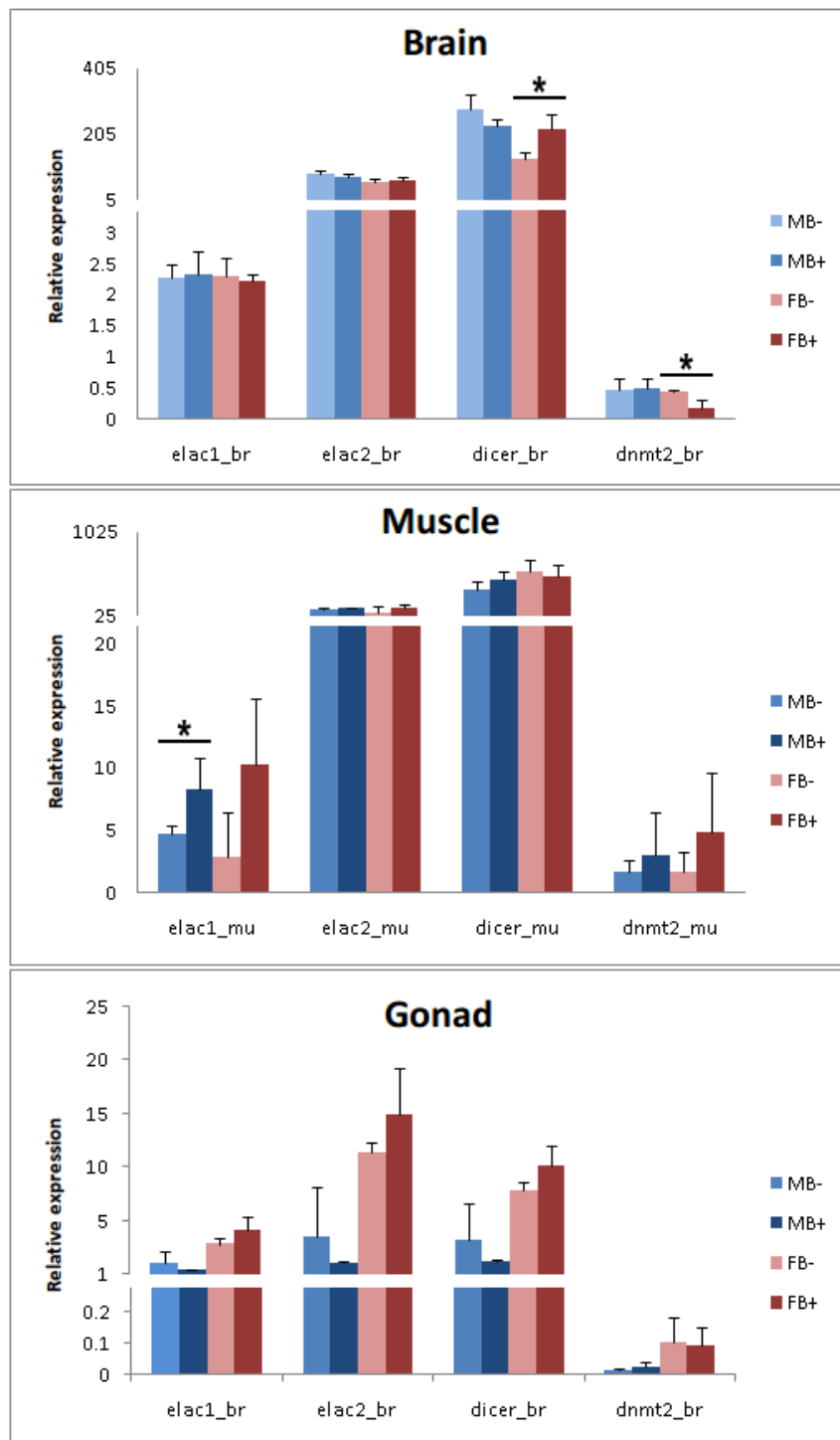


Figura 11. Expressão relativa de genes envolvidos com a formação de tRFs sob efeito de cromossomos B. Asteriscos indicam diferenças estatísticas.

Tabela 4. Efeitos de cromossomos B e do sexo na expressão de genes envolvidos com a formação de tRFs.

Tecido	Gene	Efeito do cromossomo B	Efeito de sexo	Interação cromossomo B e sexo
Cérebro	<i>Elac1</i>			
Cérebro	<i>Elac2</i>			
Cérebro	<i>Dicer</i>	(↓FB+)		(↓FB+)
Cérebro	<i>Trdmt1</i>	(↓FB+)		(↓FB+)
Músculo	<i>Elac1</i>	(↑MB+)		
Músculo	<i>Elac2</i>			
Músculo	<i>Dicer</i>			
Músculo	<i>Trdmt1</i>			
Gônada	<i>Elac1</i>		(↑FB+)	
Gônada	<i>Elac2</i>		(↑FB+)	
Gônada	<i>Dicer</i>		(↑FB+)	
Gônada	<i>Trdmt1</i>		(↑FB+)	

4.7. Interação entre cromossomo B e sexo

Além dos efeitos ocasionados por cromossomos B, este estudo mostra que vários dos genes analisados possuem expressão afetada pelo sexo (Tabela 2 e 4). Este efeito foi observado apenas entre testículos e ovários, o que é bem documentado entre os organismos dióicos e representam as causas dos fenótipos sexualmente diferenciados (Ellegren & Parsch 2007; Small et al. 2009; Perry et al. 2014; Sharma et al. 2014). Além disso, outro tipo de efeito observado foi a interação entre cromossomo B e sexo. Isso indica que o cromossomo B promove efeitos apenas em um dos sexos ou que seus efeitos são diferentes em cada sexo.

Efeitos de cromossomos B orientados a um dos sexos tem sido registrados em diferentes aspectos biológicos dos organismos portadores, incluindo *fitness*, formação de gametas, fertilidade e formação de quiasmas (Camacho et al. 2011). Além disso, a ocorrência destes elementos em apenas um dos sexos é frequentemente observada (Beladjal et al. 2002). Em ciclídeos africanos a ocorrência de cromossomo B foi exclusivamente observada em fêmeas de várias de suas espécies (Yoshida et al. 2011; Clark et al. 2017), sendo que em *Lithochromis rubripinnis* ele está envolvido com a determinação sexual das fêmeas (Yoshida et al. 2011). Interessantemente, cromossomos B e cromossomos sexuais compartilham várias características como morfologia, comportamento meiótico e heteroplicose (Camacho et al.

2000), o que pode sugerir que cromossomos supernumerários surgiram de cromossomos sexuais ou vice-versa (Camacho et al. 2011). Em *Drosophila*, por exemplo, é sugerido que o cromossomo Y tenha evoluído a partir de um cromossomo B (Carvalho et al. 2009).

Apesar da possibilidade do cromossomo supernumerário atuar como cromossomo sexual, essa possibilidade poderia ser descartada em *A. latifasciata*, uma vez que ele ocorre e promove efeitos nos dois sexos. No entanto, o fato desses efeitos serem mais frequentes em fêmeas poderia indicar que ele está evoluindo para se tornar um cromossomo sexual ou, por outro lado, que ele seja um cromossomo sexual em degeneração.

4.8. Discussão geral

O presente trabalho demonstra que o cromossomo B de *A. latifasciata* possui um padrão epigenético ativo, que está associado com os efeitos deste elemento na expressão de genes e pequenos RNAs codificados pelo complemento A. No entanto, é importante ressaltar que muitos dos efeitos de cromossomos B na expressão gênica não levam a alterações na atividade de seus produtos. Isso indica que a maioria destes efeitos são espúrios, devido à alta taxa de genes fragmentados (pseudogenes), que devem constituir fonte de transcritos inibidores de RNAs canônicos (Banaei-Moghaddam et al. 2013). Por outro lado, efeitos que podem estar associados com os mecanismos de manutenção e transmissão do cromossomo B parecem ser preservados. Essa ideia é sustentada pela convergente manutenção de cópias relacionadas com divisão celular em diferentes espécies (Valente et al. 2014; Navarro-Domínguez et al. 2017). Esses dados, associados com aqueles obtidos em outras espécies (Huang et al. 2016; Navarro-Domínguez et al. 2017) revelam que cromossomos supernumerários não são elementos inertes, como previamente postulado.

5. CONCLUSÕES

- O cromossomo B de *Astatotilapia latifasciata* não é um isocromossomo e possui padrão ativo de marcas de modificações epigenéticas do DNA.
- Os dados apresentados dão indícios de que o cromossomo B afeta de forma heterogênea a via de metilação do DNA e de formação de tRFs.
- Este estudo reforça a ideia de que cromossomos B não são elementos inertes.

6. REFERÊNCIAS

- Bachman M, Uribe-Lewis S, Yang X, Williams M, Murrel A, Balasubramanian S (2014) 5-Hydroxymethylcytosine is a predominantly stable DNA modification. *Nature Chemistry* 6:1049-1055.
- Bachman M, Uribe-Lewis S, Yang X, Burgess HE, Iurlaro M, Reik W, Murrel A, Balasubramanian S (2015) 5-Formylcytosine can be a stable DNA modification in mammals. *Nature Chemical Biology* 11:555-557.
- Banaei-Moghaddam AM, Meier K, Karimi-Ashtiyani, Houben A (2013) Formation and Expression of Pseudogenes on the B Chromosome of Rye. *The Plant Cell* 25: 2536–2544.
- Banaei-Moghaddam AM, Martis MM, Macas J, Gundlach H, Himmelbach A, Altschmied L, Mayer KFX, Houben A (2015) Genes on B chromosomes: Old questions revisited with new tools. *Biochimica et Biophysica Acta* 1849:64-70.
- Bartel DP (2004) MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell* 116:281-297.
- Beladjal L, Vandekerckhove TTM, Muysen B, Heyrman J, Caesemaeker J, Mertens J (2002) B-chromosomes and male-biased sex ratio with paternal inheritance in the fairy shrimp *Branchipus schaefferi* (Crustacea, Anostraca). *Heredity* 88:356-360.
- Bertollo LAC, Taka hashi CS, Moreira-Filho O (1978) Citotaxonomic consideration on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Brazilian Journal of Genetics* 1:103-120.
- Beukeboom LW (1994) Bewildering Bs: an impression of the 1st B-Chromosome Conference. *Heredity* 73:328-336.
- Beukeboom LW, Seif M, Plovman AB, Ridder F, Michiels NK (1998) Phenotypic fitness effects of B chromosomes in the pseudogamous parthenogenetic planarian *Polycelis nigra*. *Heredity* 80:594-603.
- Bird A (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes and Development* 16:6-21.

- Breiling A, Lyko F (2015) Epigenetic regulatory functions of DNA modifications: 5-methylcytosine and beyond. *Epigenetics & Chromatin* 8:24.
- Bugno-Poniewierska M, Solek P, Wronski M, Potocki L, Jezewska-Witkowska G, Wnuk M (2014) Genome organization and DNA methylation patterns of B chromosomes in the red fox and Chinese raccoon dogs. *Hereditas* 151:169–176.
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT (2009) The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry* 55(4):611-622.
- Cai X, Hagerdon CH, Cullen BR (2004) Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* 10:1957-1966.
- Camacho JPM, Sharbel TF, Beukeboom LW (2000) B-chromosome evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 355:163-178.
- Camacho JP (2005) B chromosomes. In: Gregory TR, editor. *The evolution of the genome*. San Diego (CA): Elsevier. p. 223–286.
- Camacho JPM, Schmid M, Cabrero J (2011) B chromosomes and sex in animals. *Sexual Development* 5:155-166.
- Carchilan M, Kumke K, Mikolajewski S, Houben A (2009) Rye B chromosomes are weakly transcribed and might alter the transcriptional activity of A chromosome sequences. *Chromosoma* 118:607-616.
- Carmello BO (2015) Organização genômica e análise da expressão do gene hnRNP Q-like (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q-like) retroinserido no cromossomo B de *Astatotilapia latifasciata*. Dissertação de Mestrado, UNESP.
- Carvalho AB, Koerich LB, Clark AG (2009) Origin and Evolution of Y chromosomes: *Drosophila* tales. *Trends in Genetics* 25(6):270-277.
- Castro AJ, Perfectti F, Pardo MC, Cabrero J, López-León MD, Camacho JPM (1998) No harmful effects of a selfish B chromosome on several morphological and physiological traits in *Locusta migratoria* (Orthoptera, Acrididae). *Heredity* 80:753-759.

- Chuang JC, Jones PA (2007) Epigenetics and MicroRNAs. *Pediatric Research* 61(5):24-29.
- Ciccarone F, Malavolta M, Calabrese R, Guastafierro T, Bacalini MG, Reale A, Franceschi C, Capri M, Hervonen A, Hurme M (2016) Age-dependent expression of DNMT1 and DNMT3B in PBMCs from a large European population enrolled in the MARK-AGE study. *Aging Cell* 15:755-765.
- Clark FE, Conte MA, Ferreira-Bravo IA, Poletto AB, Martins C, Kocher T (2017) Dynamic Sequence Evolution of a Sex-Associated B Chromosome in Lake Malawi Cichlid Fish. *Journal of Heredity* 108(1):53-62.
- Cole C, Sobala A, Lu C, ThatcheR SR, Bowman A, Brown JW, Green PJ, Barton GJ, Hutvagner G (2009). Filtering of deep sequencing data reveals the existence of abundant Dicer-dependent small RNAs derived from tRNAs. *RNA* 15:2147–2160.
- Delgado M, Morais-Cecílio L, Neves N, Jones RN, Viegas W (1995) The influence of B chromosomes on rDNA organization in rye interphase nuclei. *Chromosome Research* 3:487-491.
- Delgado M, Caperta A, Ribeiro T, Viegas W, Jones RN, Morais-Cecílio L (2004) Different numbers of rye B chromosomes induce identical compaction changes in distinct A chromosome domains. *Cytogenetics and Genome Research* 106:320–324.
- Di Ruscio A, Ebralidze AK, Benoukraf T, Amabile G, Goff LA, Terragni J, Figueroa ME, Pontes LLF, Alberich-Jorda M, Zhang P et al. (2013) DNMT1-interacting RNAs block gene-specific DNA methylation. *Nature* 503:371-376.
- Eleftheriou M, Pascual AJ, Wheldon LM, Perry C, Abakir A, Arora A, Johnson AD, Auer DT, Ellis IO, Madhusudan S, Ruzov A (2015) 5-Carboxylcytosine levels are elevated in human breast cancers and gliomas. *Clinical Epigenetics* 7:88.
- Enright AJ, John B, Gaul U, Tuschl T, Sander C, Marks MS (2004) MicroRNAs targets in *Drosophila*. *Genome Biology* 5:R1.
- Ellegren H, Parsch J (2007) The evolution of sex-biased genes and sex-biased gene expression. *Nature Reviews Genetics* 8:689-698.

Fantinatti BEA, Mazzuchelli J, Valente GT, Cabral-de-Mello DC, Martins C (2011) Genomic content and new insights on the origin of the B chromosome of the cichlid fish *Astatotilapia latifasciata*. *Genetica* 139:1273:1282.

Fantinatti BEA (2015) Elucidação do efeito de cromossomos supernumerários na espécie de ciclídeo africano *Astatotilapia latifasciata*, com base na análise de expressão de micro-RNAs. Tese de Doutorado, UNESP.

Fantinatti BEA, Martins C (2016) Development of chromosomal markers based on next-generation sequencing: the B chromosome of the cichlid fish *Astatotilapia latifasciata* as a model. *BMC Genetics* 17:119.

Fu Y, Lee I, Lee YS, Bao X (2015) Small Non-coding Transfer RNA-Derived RNA Fragments (tRFs): Their Biogenesis, Function and Implication in Human Diseases. *Genomics & Informatics* 13(4):94-101.

Garcia-Silva MR, Cabrera-Cabrera F, Guida MC, Cayota A (2012) Hints of tRNA-Derived Small RNAs Role in RNA Silencing Mechanisms. *Genes* 3:603-614.

Goll MG, Bestor TH (2005) Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annual Review of Biochemistry* 74: 481-514.

Gosline SJC, Gurtan AM, JnBaptiste CK, Bosson A, Milani P, Dalin S, Matthews BJ, Yap YS, Phillip AS, Fraenkel E (2016) 14:310-319.

Haussecker D, Huang Y, Lau A, Parameswaran P, Fire AZ, Kay MA (2010). Human tRNA-derived small RNAs in the global regulation of RNA silencing. *RNA* 16:673–695.

Holoch D, Moazed D (2015) RNA-mediated epigenetic regulation of gene expression. *Nature Review Genetics* 16(2):71-84.

Houben A, Carchilan M (2011) Plant B Chromosomes: What Makes Them Different? In: *Plant Cytogenetics – Genome Structure and Chromosome Function*, Springer New York.

Huang Y, Rao A (2012) New functions for DNA modifications by TET-JBP. *Nature Structural and Molecular Biology* 19(11):1061-1064.

Huang W, Du Y, Zhao X, Jin W (2016) B chromosome contains active genes and impacts the transcription of A chromosomes in maize (*Zea mays* L.). *BMC Plant Biology* 18:88.

Huetzel B, Kreil DP, Matzke M, Matzke AJM (2008) Effects of Aneuploidy on Genome Structure, Expression, and Interphase Organization in *Arabidopsis thaliana*. *Plos Genetics* 4(10):e1000226.

Ivanov M, Barragan I, Ingelman-Sundberg M (2011) Epigenetic mechanisms of importance for drug treatment. *Trends in Pharmacological Sciences* 35(8):384-396.

Jaenisch R, Bird A (2003) Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature Genetics* 33:245-254.

Jones PA (2012) Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nature Reviews* 13:484-492.

Kumar P, Anaya J, Mudunuri SB, Dutta A (2014) Meta-analysis of tRNA derived RNA fragments reveals that they are evolutionarily conserved and associate with AGO proteins to recognize specific RNA targets. *BMC Biology* 12:78.

Kertesz M, Iovino M, Unnerstall U, Gaul U, Segal E (2007). The role of site accessibility in microRNA target recognition. *Nature Genetics* 39(10):1278-1284.

Klose RJ, Bird AP (2006) Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends in Biochemistry Science* 31:89–97.

Kohli RM, Zhang Y (2013) TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature* 502:472-479.

Krüger J, Rehmsmeier M (2006) RNAhybrid: microRNA target prediction easy, fast and flexible. *Nucleic Acid Research* 1(34):451-454.

Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN (2004) MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO Journal* 23:4051-4060.

Lee YS, Shibata Y, Malhotra A, Dutta A (2009) A novel class of small RNAs: tRNA-derived RNA fragments (tRFs). *Genes Development* 23:2639–2649.

Marques D (2016) Análise funcional da presença de cromossomo B, utilizando o peixe ciclídeo *Astatotilapia latifasciata* como modelo. Tese de Doutorado, UNESP.

Lin HZ, Lin WD, Lin CY, Peng SF, Cheng YM (2014) Characterization of maize B-chromosome-related transcripts isolated via cDNA-AFLP. *Chromosoma* 123:597-607.

Ma W, Gabriel TS, Martis MM, Gursinsky T, Schubert V, Vrána J, Dolezel J, Grundlach H, Altschmied L, Scholz U, Himmelbach A, Behrens SE, Banaei-Moghaddam AM, Houben A (2017) Rye B chromosomes encode a functional Argonaute-like protein with in vitro slicer activities similar to its A chromosome paralog. *New Phytologist* 213(2).

Makunin AI, Dementyeva PV, Graphodatsky AS, Volobouev VT, Kukekova AV, Trifonov VA (2014) Genes on B chromosomes of vertebrates. *Molecular Cytogenetics* 7:99.

Martis MM, Klemme S, Banaei-Moghaddam AM, Blattner FR, Macas J, Schmutzer T, Scholz U, Gundlach H, Wicker T, Simkova H, Novak P, Neumann P, Kubalaková M, Bauer E, Haseneyer G, Fuchs J, Dolezel J, Stein N, Mayer KFX, Houben A (2012) Selfish supernumerary chromosome reveals its origin as a mosaic of host genome and organellar sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 109(33):13343-13346.

Mei Q, Li X, Meng Y, Wu Z, Guo M, Zhao Y, Fu X, Han W (2012) A Facile and Specific Assay for Quantifying MicroRNA by an Optimized RT-qPCR Approach. *Plos One* 7(10): e46890.

Miao VP, Covert SF, VanEtten HD (1991) A fungal gene for antibiotic resistance on a dispensable ("B") chromosome. *Science* 254:1773-1776

Muller PY, Janovjak H, Miserez AR, Dobbie Z (2002) Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR. *BioTechniques* 19(11):1439-1440.

Muppirala UK, Honavar VG, Dobbs D (2011) Predicting RNA-protein interactions using only sequence information. *BMC Bioinformatics* 12:489.

Navarro-Domínguez B, Ruiz-Ruano FJ, Cabrero J, Corral JM, López-León MD, Sharbel TF, Camacho JPM (2017) Protein-coding genes in B chromosomes of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Scientific Reports* 7:45200.

Neves N, Barão A, Castilho A, Silva M, Morais L, Carvalho V, Viegas W (1992) Influence of DNA methylation on rye B-chromosome nondisjunction. *Genome* 35:650-652.

Pederson T (2010) Regulatory RNAs derived from transfer RNA. *RNA* 16:1865-1869.

Perry JC, Harrison PW, Mank JE (2014) The Ontogeny and Evolution of Sex-Biased Gene Expression in *Drosophila melanogaster*. *Molecular Biology and Evolution* 31(5):1206–1219.

Poletto AB, Ferreira IA, Martins C (2010) The B chromosomes of the African cichlid fish *Haplochromis obliquidens* harbour 18S rRNA gene copies. *BMC Genetics* 11:1.

Raina M, Ibba M (2014) tRNAs as regulators of biological processes. *Frontiers in Genetics* 5:1-14.

Ramos E, Cardoso AL, Brown J, Marques DF, Fantinatti BEA, Cabral-de-Mello DC, Oliveira RA, O'Neill RJ, Martins C (2017) The repetitive DNA element BncDNA, enriched in the B chromosome of the cichlid fish *Astatotilapia latifasciata*, transcribes a potentially noncoding RNA. *Chromosoma* 126(2):313-323.

Rens W, Wallduck MS, Lovell FL, Ferguson-Smith MA, Ferguson-Smith A (2010) Epigenetic modifications on X chromosomes in marsupial and monotreme mammals and implications for evolution of dosage compensation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(41): 17657–17662.

Ryan B, Joilin G, Williams JM (2015) Plasticity-related microRNA and their potential contribution to the maintenance of long-term potentiation. *Frontiers in Molecular Neurosciences* 8:4.

Simon P (2003) Q-gene: processing quantitative real-time RT-PCR data. *Bioinformatics* 19(11):1439-1440.

Sharma E, Künstner A, Fraser BA, Zipprich G, Kottler VA, Henz SR, Weigel D, Dreyer C (2014) Transcriptome assemblies for studying sex-biased gene expression in the guppy, *Poecilia reticulata*. *BMC Genomics* 15:400.

Shigematsu M, Kirino Y (2015) tRNA-Derived Short Non-coding RNA as Interacting Partners of Argonaute Proteins. *Gene Regulation and System Biology* 9:27-33.

Small CM, Carney GE, Mo Q, Vannucci M, Jones AG (2009) A microarray analysis of sex- and gonad-biased gene expression in the zebrafish: Evidence for masculinization of the transcriptome. *BMC Genomics* 10:579.

Steeves G, Hansen D, Lamboj A (2010). *Cichlids of Africa. Vol. I: Haplochromines*. Grandã Publishing.

Suresh V, Liu L, Adjeroh D, Zhou X (2015) RPI-Pred: predicting ncRNA-protein interaction using sequence and structural information. *Nucleic Acid Research* 43(3):1370-1379.

Terrenoire E, McDonald F, Halsall JA, Page P, Illingworth RS, Taylor AMR, Davison V, O'Neill LP, Turner B (2010) Immunostaining of modified histones defines high-level features of the human metaphase epigenome. *Genome Biology* 11:R110.

Tuorto F, Liebers R, Musch T, Schaefer M, Hofmann S, Kellner S, Frye M, Helm M, Stoecklin G, Liko F (2012) RNA cytosine methylation by Trdmt1 and NSun2 promotes tRNA stability and protein synthesis. *Nature Structural and Molecular Biology* 19(9):900-905.

Valente GT, Conte MA, Fantinatti BEA, Cabral-de-Mello DC, Carvalho RF, Vicari MR, Kocher TD, Martins C (2014) Origin and Evolution of B Chromosomes in the Cichlid Fish *Astatotilapia latifasciata* Based on Integrated Genomic Analyses. *Molecular Biology and Evolution* 31(8): 2061-2072.

Valente G, Nakajima R, Fantinatti BEA, Marques DF, Almeida RO, Simões RP, Martins C (2016) B chromosomes: from cytogenetics to system biology. *Chromosoma* 126(1):73-81.

Yoshida K, Terai Y, Mizoiri S, Aibara M, Nishihara H, Watanabe M, Kuroiwa A, Hirai H, Matsuda Y, Okada N (2011) B chromosomes have a functional effect on female sex determination in Lake Victoria cichlid fishes. *PLoS Genetics* 7(8):e1002203.

Zima J, Piálek J, Macholán M (2003) Possible heterotic effects of B chromosomes on body mass in a population of *Apodemus flavicollis*. *Canadian Journal of Zoology* 81:1312-1317.

Anexo

Tabela 1. Predição de interação entre o elemento BncRNA e a proteína DNMT1 em *A. latifasciata*.

Bnc-RNA (complete sequence)

RNA-Protein Interaction Prediction (RPISeq)

Input Sequences

Protein:

MPTRTSLPLPDDVRKSLQRLDEEGSADEEHVKENLKL VQDFLHVDAQDQLTSLEEK
MKSSEISKEYVYISKVKAVLGKELHLENGSHSDDAEKNGKTNGFSNGSHKDEHDEDV
TMSVQEEEEESVKSPTSSKGGRRSKANS DTKKSPASTRVTRNSGKQPTLLSMFTKV
QKRKSEDLNGEAVNGQNEPKKDDDDVEESREEKRLKVESDDNAAPEESKSDIVKPVS
AVKTPPPKCQDCRQYLDDSDLKFFQGD PDNALDEPEMLTNERLSLFDSNEDGFESYE
DLPQHKITNFSVYDKRGHLCPFDSGLIEKNVELYFSCVVKPIYDDNPCMDGGVPAKK
LGPINAWWITGFDGGEKALIGFTTAFADYILMQPSEEYAPIFALMQEKIYMSKIVVEF
LQKNPDATYEDLLNKIETTVPAGLNFCFTEDTLLRHAQFVVEQVESYDEAGDSDE
QPIIVTPCMRDLIKLAGVTLGKRRAARRQAIRHPTKIEKDSKGPTKATTTKLVYQIFD
AFFSDQIEQNDKESAMKRQRCGVCEVCQSPDCGKCAACKDMIKFGGSGKSKQACR
QRRCPNLA VKEAEDDENIEEEDVPVEKPKKVP HAKRKKQTQCKLTWIGESIHTGKK
QYYRKVSLNDELLEVGDCVSVSSEDPSIPLYLARITSMWEDNNGKMFHAHWFLRGI
DTVLGETSDPLELVIVDECEDMLLN YVQGKVDVMYKAPSNNWFMEGGVDVDLKVI
EDDGKSFFYQFWYDTEYARFEMPPKTSPSEECKFKFCGSCVRTKEREDKDKPRVFEF
LENENHDTKALYAMACFKGEQFRVGDSVYLPPEAFNFSVKPASPVKRSHRKDDVDE
DLYPEYYRKSSDYIKGSNLDAPEPFRVGR IEIFCHRRSNGKPEMSDVKLRLYKFYRP
ENTHKGVKASYHTDINQLYWSDEEVTVMNMGDVLGRCQVEYAEDL NESIQDYSSAGP
ERFYFLEAYNAKAKSFEDPPNHARSTVHKGKGK GKKGKKGKASAAQEQPDSQP
KPKVPKYRTL DVFSGCGLSEG FHQAASET LWAIEMWEPAAQAFRLNNPGTTVFTE
DCNILLKLVMSGEKTNSLGQKLPQKGDVEMLCGGPPCQGFSGMNRFN SRTYSKFKN
SLVVSYSYCDYYRPFLEENVRNFVSFKNSMVLKLT LRCLVRMGYQCTFGVLQA
GQYGVAQTRRRAILAAPGEKLPRYPEPLHVFAPRACSLSVVVG EKRYVSNVTRGN
GGIYRTITVRDTMSDLPEIRNGAAALEISYNGEPQSWFQRQIRGTQYQPILRDHICKD
MSALVEGRMRYIPLAPGSDWRDLPNIEVRLKDGTLTKKLR YTHDKKNGRSGTGAL
RGVCTCAGGKPCDPADRQFN TLIPWCLPHTGNRHNHWAGLYGRLEWDGFFSTTVT
NPEPMGKQGRVLHPEQHRVVSVRECAR SQGFPTYRFFGNILDKHRQVGN AVPPPL
SRAIGLEIKRCITERMKEEQASENIKQEKMELSD

RNA:

AUCAAUGUGUCCAGAACAUGCGGAAGUACUCACGUGACUGACUUUGUUUACA
ACUUAAGAACUGUAAGUCAAUGCAUUCUAAUUUAUUUUCGGAGCCUUAUCC
CGAACGAUUAUCGCCAGAAAACAGGUCAGUAAAACUGAAGGCCAGUGCAGAU
ACUACCACGAAAGCUAAAAGUGUUAAGAUAAAAGUUGAAUUUUGAUGUAGAAG
GCUCAGAGGAAAGUGAGAAACUAAUGUAUGCAGGAUUACCCGCUCCAGCACA
GCAAGGAAGUUUCAGAGGAUGGAAGGAUAAAAGUAGAGAU AUGUGUUUUUAU
UGUGGCUCAGUUUCCAGCAGCCGCAGACACCCAGAGCAAAAUGAAUUUGUG
UAUUUCAUUU AACACAAAGGGUGAAAUGUUUGCUGACACUGAUAACAGCUUA
UGUUUUCUCUGCCUUAUGUACCAUGGAGAAGGAACA UCCUCUGUGUCAGCUG
GACCCUCAGCAGAGAAUGAACUCAACA UCCUUUUUGUCCGGUACUCUAUGUCA
CACACUGUGCCAAAAACGUGUACAGACGCCACUACCAGGUAAUCCCAUGACU
GGGAGCCACACUUUUGUUUCUCUCACACUGUUCAACAACAUGAUAACUGCUCA
CACAAGUGAAGGUCAAACAGUGAUUUUGUCACAUAACUCAGACAUAAGUUUAU
GACAUAACUAUACCAUGUGGACACA UUGAUCAUCG

Interaction probabilities

Prediction using RF classifier **0.7**

Prediction using SVM classifier **0.98**

What do these probabilities mean?

Interaction probabilities generated by RPISeq range from 0 to 1. In performance evaluation experiments, predictions with probabilities > 0.5 were considered “positive,” i.e., indicating that the corresponding RNA and protein are likely to interact. Using this threshold, accuracies of the classifiers ranged from 87 - 90% in cross-validation evaluation experiments on benchmark datasets. When classifiers were tested on independent (blind) datasets of RPIs, accuracies of the classifiers ranged from 57 – 99%.

RPI-Pred

RPI-Pred Result Page

RNA ID	Protein ID	RPI-Pred Results	Remarks
KX196446.1	DNMT1	1	Interaction Possible

[Home](#)

Please, send your comments, suggestions to: lliu@wakehealth.edu

Bnc-RNA (subregion 2)

RNA-Protein Interaction Prediction (RPISeq)

Input Sequences

Protein:

MPTRTSLPLPDDVRKSLQRLDEEGSADEEHVKENLKLVDLHVDAQDQLTSLEEK
MKSSEISKEVYISKVKA VLGKELHLENGSHSDDAEKNGKTNGFSNGSHKDEHDEDV
TMSVQEEEEESVKSP TSSKGGRRSKANS DTKKSPASTRVTRNSGKQPTLLSMFTKV
QKRKSEDLNGEAVNGQNEPKKDDDDVEESREEKRLKVESDDNAAPEESKSDIVKPVS
AVKTPPPKCQDCRQYLDSDLKFFQGD PDNALDEPEMLTNERLSLFD SNEDGFESYE
DLPQHKITNFSVYDKRGHLC PFDSGLIEKNVELYFSCVVKPIYDDNPCMDGGVPAKK
LGPINAWWITGFDGGEKALIGFTTAFADYILMQPSEEYAPIFALMQEKIYMSKIVVEF
LQKNPDATYEDLLNKIETTVP PAGLNFCFTEDTLRHAQFVVEQVESYDEAGDSDE
QPIIVTPCMRDLIKLAGVTLGKRAARRQAIRHPTKIEKDSKGPTKATTTKLVYQIFD
AFFSDQIEQNDKESAMKRQRCGVCEVCQSPDCGKCAACKDMIKFGGSGKSKQACR
QRRCPNLAVKEAEDDENIEEEDVPVEKPKKVP HAKRKKQTQCKLTWIGESIHTEGKK
QYYRKVSLNDELLEVGDCVSVSSEDP S IPLYLARITSMWEDNNGKMFHAHWFLRGI
DTVLGETSDPLELVIVDECEDMLLN YVQGV DVMYKAPSNNWFMEGGVDVDLKVI
EDDGKSFFYQFWYDTEYARFEMPPKTSPSEECKFKFCGSCV RTKEREDKDKPRVFEP
LENENHDTKALYAMACFKGEQFRVGDSVYLPPEAFNFSVKPASPVKRSHRKDDVDE
DLYPEYYRKSSDYIKGSNLD APEPFRVGRIKEIFCHRRSNGKPEMSDVKLRLYKFYRP
ENTHKGVKASYHTDINQLYWSDEE VTNMGDVLGRCQVEYAEDLNESI QDYSSAGP
ERFYFLEAYNAKAKSFEDPPNHARSTVHKGKGKGGKGGKGGKASAAQEQPDSQP
KPKVPKYRTLDFVSGGGLSEGFHQAAISETLWAIEMWEPAAQAFRLNNPGTTVFTE
DCNILLKLVMSGEKTNSLGQKLPQKGDVEMLCGGPPCQGFSGMNRFN SRTYSKFKN
SLVVSYSYCDYYRPFLL ENVRNFVSFKNSMVLKLT LRCLVRMGYQCTFGVLQA
GQYGVAQTRRRAILAAAPGEKLP RYPEPLHVFA PRACSLSVVVG EKRYVSNVTRGN
GGIYRTITVRDTMSDLPEIRNGAAALEISYNGEPQSWFQRQIRGTQYQPILRDHICKD
MSALVEGRMRYIPLAPGSDWRDL PNIEVRLKDGTLTKKLR YTHHDKKNGRS GTGAL
RGVCTCAGGKPCDPADRQFN TLIPWCLPHTGNRHNHWAGLYGRLEWDGFFSTTVT

NPEPMGKQGRVLHPEQHRVVSVRECARSQGFPD TYRFFGNILDKHRQVGNAVPPPL
SRAIGLEIKRCITERMKEEQASENIKQEKMELSD

RNA:

UGAUGUAGAAGGCUCAGAGGAAAGUGAGAAACUAAUGUAUGCAGGAUUACCC
GCUCCAGCACAGCAAGGAAGUUUCAGAGGAUGGAAGGAUAAAAGUAG

Interaction probabilities

Prediction using RF classifier **0.55**

Prediction using SVM classifier **0.94**

What do these probabilities mean?

Interaction probabilities generated by RPISeq range from 0 to 1. In performance evaluation experiments, predictions with probabilities > 0.5 were considered “positive,” i.e., indicating that the corresponding RNA and protein are likely to interact. Using this threshold, accuracies of the classifiers ranged from 87 - 90% in cross-validation evaluation experiments on benchmark datasets. When classifiers were tested on independent (blind) datasets of RPIs, accuracies of the classifiers ranged from 57 – 99%.

Tabela 2. Lista de tRFs de *Danio reio* identificados em *Astatotilapia latifasciata*.

Zebra_fish_Zv9trf-3chr9.trna192-MetCAT
Zebra_fish_Zv9trf-5chr23.trna265-LeuTAA
Zebra_fish_Zv9trf-3chr11.trna146-SerTGA
Zebra_fish_Zv9trf-3chr11.trna234-ValAAC
Zebra_fish_Zv9trf-3chr4.trna7489-ValTAC
Zebra_fish_Zv9trf-5chr9.trna192-MetCAT
Zebra_fish_Zv9trf-3chr24.trna179-TrpCCA
Zebra_fish_Zv9trf-3chr20.trna733-MetCAT
Zebra_fish_Zv9trf-3chr5.trna489-ArgGCG

Zebra_fish_Zv9trf-3chr21.trna53-AlaTGC
Zebra_fish_Zv9trf-3chr4.trna2160-ThrCGT
Zebra_fish_Zv9trf-3chr4.trna4338-HisATG
Zebra_fish_Zv9trf-3chr4.trna4653-LeuTAG
Zebra_fish_Zv9trf-3chr6.trna42-SerCGA
Zebra_fish_Zv9trf-3chr22.trna822-GlnTTG
Zebra_fish_Zv9trf-3chr4.trna6261-GlnTTG
Zebra_fish_Zv9trf-3chr4.trna6230-ThrCGT
Zebra_fish_Zv9trf-3chr4.trna1753-PheGAA
Zebra_fish_Zv9trf-3chr4.trna6544-ValCAC
Zebra_fish_Zv9trf-3chr4.trna1318-ValCAC
Zebra_fish_Zv9trf-3chr5.trna794-GlyGCC
Zebra_fish_Zv9trf-3chr4.trna6523-ArgACG
Zebra_fish_Zv9trf-3chr4.trna70-TyrGTA
Zebra_fish_Zv9trf-5chr2.trna186-TrpCCA
Zebra_fish_Zv9trf-5chr4.trna543-SerGCT
Zebra_fish_Zv9trf-5chr4.trna6201-SerGCT
Zebra_fish_Zv9trf-3chr2.trna183-GlyCCC
Zebra_fish_Zv9trf-5chr4.trna1958-GlyGCC
Zebra_fish_Zv9trf-5chr4.trna8013-GlyCCC
Zebra_fish_Zv9trf-5chr4.trna6499-GlyGCC
Zebra_fish_Zv9trf-5chr4.trna4596-GlyGCC
Zebra_fish_Zv9trf-5chr4.trna6287-GlyCCC
Zebra_fish_Zv9trf-5chr4.trna6798-SupTTA
Zebra_fish_Zv9trf-5chr15.trna345-SeCeTCA
Zebra_fish_Zv9trf-5chr4.trna4708-ThrCGT
Zebra_fish_Zv9trf-5chr12.trna468-MetCAT
Zebra_fish_Zv9trf-5chr3.trna249-PheGAA

Zebra_fish_Zv9trf-5chr4.trna6273-TyrGTA
Zebra_fish_Zv9trf-3chr13.trna509-IleTAT
Zebra_fish_Zv9trf-5chr19.trna269-MetCAT
Zebra_fish_Zv9trf-5chr4.trna6544-ValCAC
Zebra_fish_Zv9trf-5chr5.trna855-LysTTT
Zebra_fish_Zv9trf-5chr4.trna7719-LysTTT
Zebra_fish_Zv9trf-5chr5.trna653-GlyCCC
Zebra_fish_Zv9trf-5chr6.trna92-GlyTCC
Zebra_fish_Zv9trf-5chr4.trna142-GlyTCC
Zebra_fish_Zv9trf-5chr23.trna25-GlyTCC
Zebra_fish_Zv9trf-5chr7.trna509-SerTGA
Zebra_fish_Zv9trf-5chr6.trna78-IleAAT
Zebra_fish_Zv9trf-5chr16.trna304-ThrTGT
Zebra_fish_Zv9trf-5chr5.trna1092-Undet
Zebra_fish_Zv9trf-5chr4.trna8483-LeuAAG
Zebra_fish_Zv9trf-5chr3.trna578-AlaAGC
Zebra_fish_Zv9trf-5chr24.trna62-AlaAGC
Zebra_fish_Zv9trf-5chr21.trna529-ValTAC
Zebra_fish_Zv9trf-5chr21.trna701-AlaAGC
Zebra_fish_Zv9trf-5chr20.trna234-PheGAA
Zebra_fish_Zv9trf-5chr3.trna657-CysGCA
Zebra_fish_Zv9trf-5chr10.trna264-LeuTAG
Zebra_fish_Zv9trf-5chr12.trna50-LeuTAG
Zebra_fish_Zv9trf-5chr21.trna693-ValTAC
Zebra_fish_Zv9trf-5chr14.trna193-ValTAC
Zebra_fish_Zv9trf-5chr4.trna5950-SupCTA
Zebra_fish_Zv9trf-5chr20.trna13-SerTGA
Zebra_fish_Zv9trf-5chr4.trna6908-SerTGA

Zebra_fish_Zv9trf-5chr9.trna352-SerCGA
Zebra_fish_Zv9trf-5chr20.trna246-PheAAA
Zebra_fish_Zv9trf-5chr4.trna7704-LeuTAG
Zebra_fish_Zv9trf-3chr7.trna3-ArgTCT
Zebra_fish_Zv9trf-3chr4.trna6798-SupTTA
Zebra_fish_Zv9trf-3chr7.trna50-ArgTCG
Zebra_fish_Zv9trf-3chr4.trna2792-LysTTT
Zebra_fish_Zv9trf-3chr4.trna980-GluCTC
Zebra_fish_Zv9trf-3chr5.trna117-AspGTC
Zebra_fish_Zv9trf-3chr4.trna2862-GlyCCC
Zebra_fish_Zv9trf-5chr16.trna139-SerAGA
Zebra_fish_Zv9trf-5chr5.trna713-ValTAC
Zebra_fish_Zv9trf-5chr4.trna8265-ValCAC
Zebra_fish_Zv9trf-5chr4.trna7489-ValTAC
Zebra_fish_Zv9trf-5chr17.trna288-ValTAC
Zebra_fish_Zv9trf-5chr4.trna638-AlaAGC
Zebra_fish_Zv9trf-5chr4.trna5597-ValTAC
Zebra_fish_Zv9trf-5chr4.trna1864-ValTAC
Zebra_fish_Zv9trf-5chr15.trna381-GluTTC
Zebra_fish_Zv9trf-5chr4.trna676-Undet
Zebra_fish_Zv9trf-3chr21.trna292-Undet
Zebra_fish_Zv9trf-5chr22.trna992-AspGTC

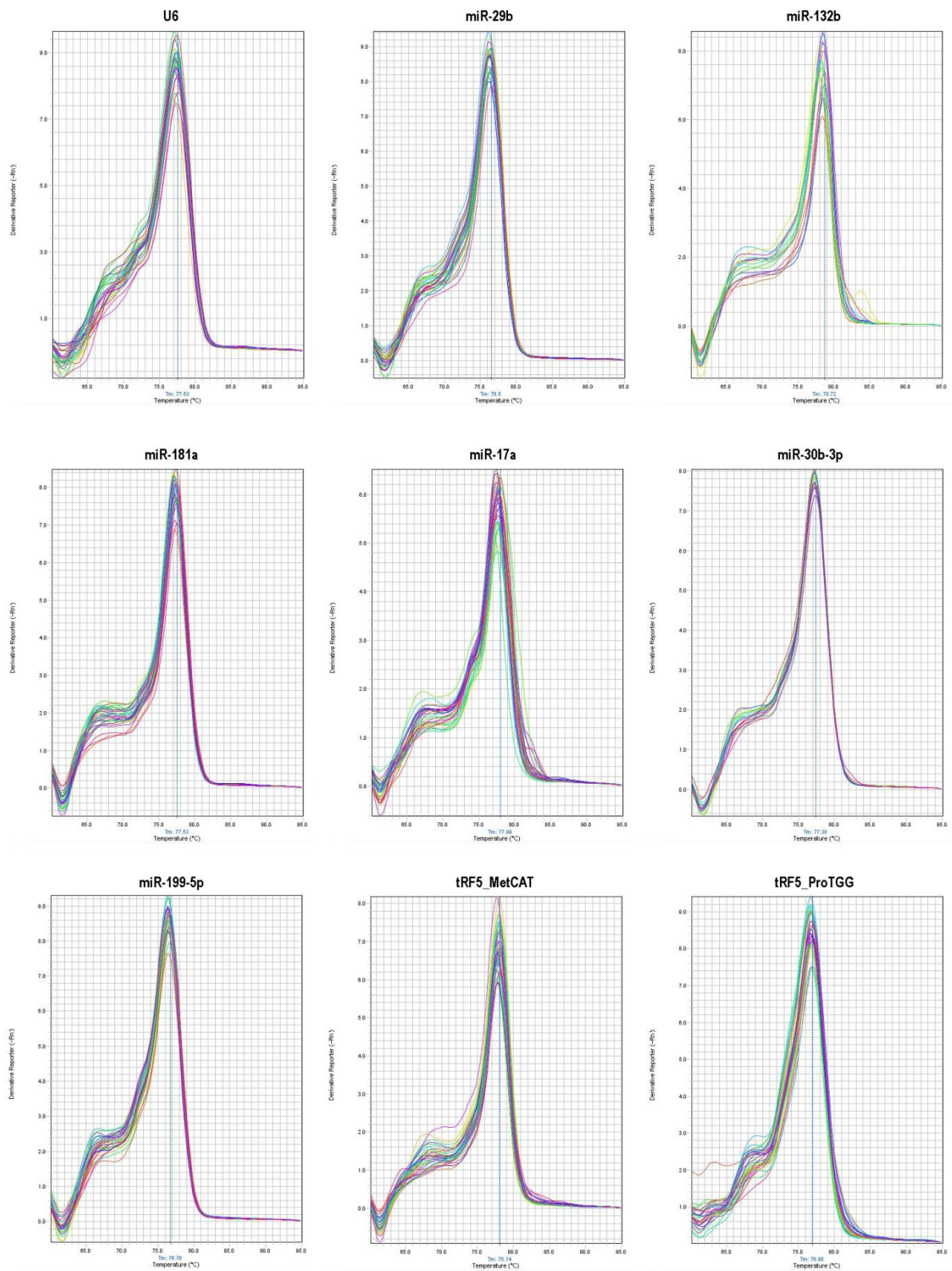


Figura 1. Curvas de dissociação dos *primers* usados para amplificação de pequenos RNAs no ensaios de qPCR.

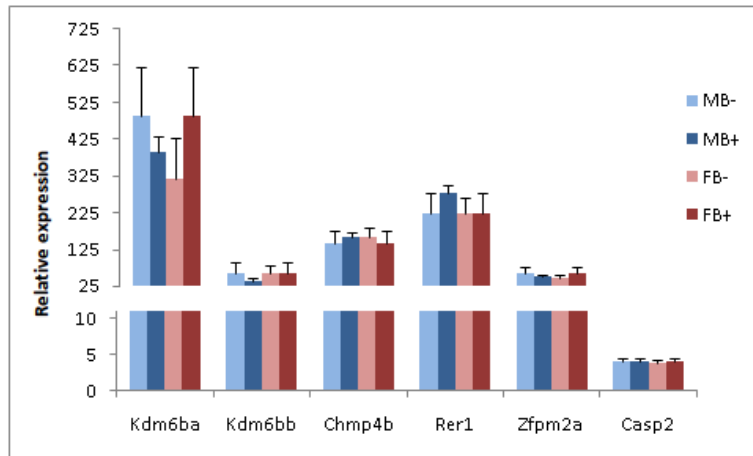


Figura 2. Expressão relativa dos alvos do miR-29b-3p.