

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 21/02/2023.

Análise do conteúdo gênico e expressão diferencial de variantes do cromossomo B em *Psalidodon* (Teleostei, Characiformes)

Mateus Rossetto Vidal

Botucatu, SP

2022

Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
Instituto de Biociências de Botucatu

Análise do conteúdo gênico e expressão diferencial de variantes de cromossomo B em *Psalidodon* (Teleostei, Characiformes)

Aluno: Mateus Rossetto Vidal

Orientador: Prof. Dr. Fausto Foresti

Coorientador: Dr. Duílio M. Z. A. Silva

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia).

Botucatu, SP

2022

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

Vidal, Mateus Rossetto.

Análise do conteúdo gênico e expressão diferencial de variantes do cromossomo B em *Psalidodon* (Teleostei, Characiformes) / Mateus Rossetto Vidal. - Botucatu, 2022

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Fausto Foresti

Coorientador: Duílio Mazzoni Zerbinato de Andrade Silva

Capes: 20400004

1. *Astyanax* (Peixe). 2. Expressão gênica. 3. Genômica. 4. Citogenética.

Palavras-chave: *Astyanax*; Citogenética; Expressão gênica; Genômica; *Psalidodon*.

Dedicatória

À minha mãe **Ana Cristina**, com carinho dedico.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente ao Professor Fausto Foresti por ter aceito me orientar e por ter sempre me inspirado e motivado a ir além.

Ao meu Co-Orientador Duílio Mazzoni Zerbinato de Andrade Silva, obrigado por cobrar sempre o melhor de mim e me guiar para obter sempre o melhor resultado.

Ao Professor Cláudio Oliveira, por todo o apoio fornecido para esta pesquisa.

Ao meu colega Lucas Fortino Lasmar pela colaboração neste trabalho e por toda parceria e amizade.

Aos colegas do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, por terem me acolhido tão bem.

Ao Professor Fábio Porto Foresti e a todos os colegas do Laboratório de Genética de Peixes da UNESP Bauru, pela amizade e apoio no desenvolvimento deste projeto.

Aos membros do Laboratório de Biologia Molecular e Reprodutiva da UNESP de Botucatu, em especial ao Professor Rafael Henrique Nóbrega e à colega Maira da Silva Rodrigues pelo suporte.

Aos membros do Laboratório de Biologia do Músculo Estriado Esquelético da UNESP Botucatu, em especial à Professora Maeli Dal Pai e à colega Bruna Tereza T. Zanella pelo suporte.

Aos meus familiares que me deram todo apoio e suporte durante toda minha graduação e pós-graduação, em especial à minha namorada Ariane por me apoiar em todos os momentos da minha formação.

Ao Instituto de Biociências de Botucatu.

Ao programa de Pós-graduação em Zoologia.

Aos funcionários do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional e da seção técnica de Pós-Graduação que, pelo seu trabalho, permitiram que este estudo fosse realizado.

À FAPESP, CAPES e ao CNPq, pelo financiamento deste projeto.

Esta pesquisa foi financiada com recursos da Fundação de
Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
Processos: 2019/15140-9; 2020/01775-0



Somos feitos de poeira das estrelas.
Somos uma maneira de o cosmos conhecer a si mesmo.

Carl Sagan

Resumo

Cromossomos B são elementos supranumerários do genoma de eucariotos, com diversos aspectos ainda incógnitos. Apesar de sua composição pobre em genes codificadores de proteínas, a descrição de transcritos provenientes destes elementos vem alterando a visão de que são estruturas inertes no genoma. Dentre os peixes do gênero *Psalidodon*, uma grande diversidade desses elementos pode ser observada, com a ocorrência de micro a macro cromossomos B com diferentes morfologias. Estudos anteriores demonstram a ocorrência de pelo menos 21 genes nos cromossomos B de *Psalidodon paranae* e *Psalidodon scabripinnis*, sendo que ambas as espécies possuem maior presença de cromossomos B em fêmeas, o que sugere sua atuação nas vias de diferenciação do sexo. Desta forma, o presente estudo visou investigar o conteúdo gênico da variante *BfMa* de *Psalidodon fasciatus* para testar a hipótese de origem comum com outras variantes no gênero, bem como investigar se a presença de cromossomos B leva à expressão diferencial de genes da via de diferenciação do sexo em *P. paranae*. Para isso, foram coletados e analisados indivíduos de *P. paranae* e *P. fasciatus* e as análises de qPCR permitiram identificar oito genes codificadores de proteína na variante *BfMa* de *P. fasciatus* (*amhr2*, *ccpg1*, *cia30*, *g2e3*, *msh4*, *nobox*, *nusap1*, *sbno2*), sendo que seis destes já foram descritos na variante *BfMb* da mesma espécie. Dessa forma, é altamente provável que ambas as variantes possuam uma origem comum e se diversificaram ao ponto de perder ou adquirir genes exclusivos. Ainda, devido ao compartilhamento de cinco genes entre os cromossomos B de *Psalidodon* já analisados, pode-se concluir que a variante *BfMa* também compartilha de uma origem comum com as demais variantes do gênero ocorrida há cerca de 4 milhões de anos e que sua origem não se deu por hibridação interespecífica recente. As análises de RT-qPCR em gônadas de *P. paranae* mostraram a expressão diferencial de três genes em fêmeas (*cyp19a1a*, *esr1* e *nobox*) e de dois em machos (*dmrt1* e *nobox*). A subexpressão dos genes *cyp19a1a* e *esr1* em fêmeas poderia ser reflexo de um processo de desregulação causado pelo cromossomo B, ou uma resposta do genoma A para neutralizar o genoma B, ou ainda um possível efeito funcional destes cromossomos, que levaria a uma distorção do período reprodutivo. A superexpressão do gene *nobox* poderia refletir a existência de um mecanismo de acúmulo destes cromossomos, determinando uma maior eficiência no processo de oogênese e um maior sucesso reprodutivo para fêmeas +B. Em machos, a superexpressão do gene *dmrt1* poderia causar uma alteração do ciclo reprodutivo dos indivíduos, como já foi verificado ocorrer em *P. scabripinnis* por outros autores.

Abstract

B chromosomes are supernumerary elements found in the genome of eukaryotes and have several aspects still unknown. Despite its poor composition in protein-coding genes, the description of transcripts from these elements has changed the view that they are inert structures in the genome. Among the fish of the genus *Psalidodon*, a great diversity of these elements can be observed, with the occurrence of micro to macro B chromosomes, with different morphologies. Previous studies have demonstrated the occurrence of at least 21 genes in the B chromosomes of *Psalidodon paranae* and *Psalidodon scabripinnis*, with both species having a greater presence of B chromosomes in females, which suggests their role in sex differentiation pathways. Thus, the present study aimed to investigate the gene content of the *BfMa* variant of *Psalidodon fasciatus* to test the hypothesis of a common origin with other variants in the genus, as well as to investigate whether the presence of B chromosomes leads to the different expression of genes in the differentiation pathway of the sex in *P. paranae*. For this, individuals of *P. paranae* and *P. fasciatus* were collected and analyzed and the qPCR analysis allowed the identification of eight protein-coding genes in the *BfMa* variant of *P. fasciatus* (*amhr2*, *ccpg1*, *cia30*, *g2e3*, *msh4*, *nobox*, *nusap1*, and *sbno2*), being that six of these have already been described in the *BfMb* variant of the same species. Thus, it is highly likely that both variants have a common origin and have diversified to the point of losing or acquiring unique genes. Still, due to the sharing of five genes between the B chromosomes of *Psalidodon* already analyzed, it can be supposed that the *BfMa* variant also shares a common origin with the other variants of the genus, in a process that occurred about 4 million years ago and that its origin was not due to recent interspecific hybridization. RT-qPCR analyzes in *P. paranae* gonads showed differential expression of three genes in females (*cyp19a1a*, *esr1* and *nobox*), and two in males (*dmrt1* and *nobox*). The under expression of the *cyp19a1a* and *esr1* genes in females could reflect a dysregulation process caused by the B chromosome, or a response of the A genome to neutralize the B genome, or even a possible functional effect of these chromosomes, which would lead to a distortion of the reproductive period. The overexpression of the *nobox* gene could reflect the existence of a mechanism of accumulation involving these chromosomes, determining greater efficiency in the oogenesis process and greater reproductive success for +B females. In males, overexpression of the *dmrt1* gene could cause an alteration in the reproductive cycle, as has already been observed before in *P. scabripinnis*.

Sumário

Capítulo 1 - Análise de conteúdo gênico da variante <i>BfMa</i> de <i>Psalidodon fasciatus</i>	10
1.1 Introdução	11
1.1.2 Cromossomos B no gênero <i>Psalidodon</i>	13
1.2 Objetivos	14
1.3 Material e métodos	15
1.3.1 Material	15
1.3.2 Métodos	16
1.3.2.1 Estimulação de mitoses	16
1.3.2.2 Obtenção dos cromossomos metafásicos mitóticos	16
1.3.2.3 Coloração convencional com Giemsa	16
1.3.2.4 Detecção da heterocromatina constitutiva (Banda C)	16
1.3.2.5 Hibridação <i>in situ</i> fluorescente (FISH)	16
1.3.2.6 Estudos cariotípicos	17
1.3.2.7 Extração de DNA genômico	17
1.3.2.8 Análise de conteúdo gênico das variantes do cromossomo B por qPCR	17
1.3.2.9 Análises estatísticas	18
1.4 Resultados	18
1.4.1 Variabilidade cariotípica e presença de cromossomos B em <i>P. fasciatus</i> do Rio Alambari	18
1.4.2 Genes presentes na variante <i>BfMa</i> de <i>P. fasciatus</i>	19
1.5 Discussão	21
1.6 Conclusões	22
1.7 Referências	23
Capítulo 2 - Efeitos do cromossomo B na expressão de genes de diferenciação sexual em <i>Psalidodon paranae</i> ...	29
2.1 Introdução	30
2.2 Material e métodos	32
2.2.1 Coleta e análises cariotípicas	32
2.2.2 Extração de RNA total e conversão para cDNA	32
2.2.3 Desenho de Primers para análise de expressão gênica por RT-qPCR	33
2.2.4 Análise de expressão gênica – RT-qPCR	33
2.2.5 Análise estatística	33
2.3 Resultados	33
2.3.1 Teste de eficiência dos primers desenhados	34
2.3.2 Padronização de genes de referência para análise de expressão gênica por RT-qPCR	34
2.3.3 Expressão de genes associados à diferenciação sexual em <i>P. paranae</i>	35
2.4 Discussão	37
2.5 Conclusões	40
2.6 Referências	41
Considerações Gerais	46
Material suplementar	48

Capítulo 1 - Análise de conteúdo gênico da variante *BfMa* de *Psalidodon fasciatus*

1.1 Introdução

Cromossomos B são elementos supranumerários do genoma de eucariotos descobertos há cerca de 115 anos (Wilson, 1907). Desde então, diversos estudos vêm tentando elucidar o seu papel biológico (Jones, 2017; Valente et al., 2017; Vujošević et al., 2018) e, no entanto, diversos aspectos estruturais e funcionais destes elementos genômicos ainda permanecem incógnitos.

Esses elementos estão presentes em apenas uma porção dos indivíduos de uma determinada população e podem até mesmo apresentar variação intraindividual (Foresti et al., 1989). Devido a essas características, são considerados não essenciais para a sobrevivência dos portadores (Camacho, 2005) e os efeitos fenotípicos causados por eles são pouco perceptíveis (Burt e Trivers, 2006). Entretanto, alguns efeitos fenotípicos causados pela presença dos cromossomos B foram relatados em algumas espécies, tais como resistência à ferrugem da folha em *Avena sativa* (Dherawattana & Satanaga, 1973), coloração do aquênio em *Haplopappus gracilis* (Jackson & Newmark, 1960) e resistência a antibióticos em *Nectria haematococca* (Coleman et al., 2009).

A origem dos cromossomos B em muitos casos ocorre a partir dos cromossomos componentes do complemento padrão da própria espécie e, deste modo, podem carregar informação genética redundante já presente nestes cromossomos (Martis et al., 2012). No entanto, os cromossomos B também podem ser adquiridos de espécies próximas através do processo de hibridação (Camacho, 2005; Tosta et al., 2015). Apesar de sua origem a partir dos cromossomos do complemento padrão, os cromossomos B não se recombinam com os cromossomos do complemento A durante o processo de meiose, seguindo desta forma seu próprio caminho evolutivo (Camacho, 2005). Em geral, os cromossomos B são majoritariamente compostos por heterocromatina e ricos em sequências de DNA repetitivo como DNA satélite, DNA ribossomal e elementos transponíveis (Camacho, 2005). Devido a estas características, alguns autores primeiramente os consideraram como elementos inertes do genoma (Rhoades & McClintock, 1935), enquanto outros os classificavam como elementos parasitas (Östergren, 1945).

Com o surgimento das primeiras evidências moleculares de atividade gênica e presença de genes codificadores de proteínas (GCPs) nos cromossomos B (Leach et al., 2005; Graphodatsky et al., 2005), ficou evidente que não se tratam de elementos geneticamente inertes, mas que podem atuar ativamente e desempenhar um papel biológico.

Neste contexto, a utilização de metodologias genéticas moleculares e o avanço das tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS) permitiram que diversos novos genes fossem identificados nos cromossomos B (Ruban et al., 2017; Ahmad et al., 2019), possibilitando que a pesquisa sobre os cromossomos B dessem um expressivo salto nos últimos 10 anos com relação à caracterização do conteúdo gênico destes cromossomos, tendo sido constatado que vários genes desses componentes genômicos são ativamente transcritos em diversas espécies (Trifonov et al., 2013; Navarro-Domínguez et al., 2017; Ahmad et al., 2020; Blavet et al., 2021; Silva et al., 2021). Com isso, alguns efeitos complexos destes cromossomos estão sendo desvendados, como por exemplo a eliminação dos cromossomos B apenas nas raízes de *Aegilops speltoides* durante a fase embrionária (Ruban et al., 2020), a presença de um gene adquirido por hibridação interespecífica chamado de haploidizador em *Nasonia vitripennis*, que causa uma conversão sexual de fêmeas em machos ao expulsar todo o genoma vindo do espermatozoide (Dalla Benetta et al., 2020) e a presença de um gene determinante de sexo feminino epistaticamente dominante ao Y em peixes ciclídeos (Clark & Kocher, 2019).

De acordo com Ruiz-Ruano et al. (2019), o conteúdo gênico dos cromossomos B parece ser um fator importante para garantir sua perpetuação. A ocorrência e manutenção da frequência destes cromossomos pode ser explicada por dois modelos, ou pela ocorrência simultânea de ambos (Pokorná & Reifová, 2021). No primeiro modelo, os cromossomos B levam a alterações fenotípicas benéficas e, desta forma, conferem vantagem adaptativa para os indivíduos portadores (Dherawattana & Satanaga, 1973; Coleman et al., 2009). Já o segundo modelo assume que estes cromossomos se fixam na população devido à capacidade de burlar a taxa de transmissão mendeliana, se acumulando na prole através de um mecanismo chamado de *drive* (Camacho, 2005). Em muitos casos, esta acumulação ocorre durante o processo meiótico nas fêmeas, em que o cromossomo B preferencialmente segrega para o oócito, ao invés de se fixar no corpúsculo polar (Kayano, 1957; Hewitt, 1976; Zurita et al., 1998). De acordo com Akera et al. (2017), o processo meiótico no oócito feminino providencia uma grande oportunidade para elementos genômicos egoístas se acumularem, devido à assimetria do fuso meiótico. Ao se ligarem preferencialmente ao lado do ovócito no fuso, as taxas de transmissão podem ultrapassar as taxas mendelianas esperadas. É interessante destacar que diversos genes relacionados com o ciclo celular já foram encontrados em cromossomos B (Valente et al., 2014; Makunin et al., 2018; Park et al.,

2019; Silva et al., 2021), sendo possível especular que estes cromossomos consigam manipular a maquinaria celular em benefício próprio (Ruiz-Ruano et al., 2019).

1.1.2 Cromossomos B no gênero *Psalidodon*

Estima-se que a região Neotropical possua cerca de 27% do total de espécies de peixes, o que a torna a região biogeográfica mais rica do mundo com relação à fauna deste táxon (Reis et al., 2016). Dentre os peixes, os componentes da ordem Characiformes ganham grande destaque por serem um dos grupos mais representativos (Fricke et al., 2021). Inserido nesta ordem, o gênero *Psalidodon* (Characiformes, Characidae) recentemente redescrito por Terán et al. (2020), possui ampla distribuição na América do Sul (Ornelas-Garcia et al., 2008). No entanto, este gênero possui uma sistemática complexa (Rossini et al., 2016). O gênero *Psalidodon* é caracterizado pela ocorrência de espécies crípticas (Pansonato-Alves et al., 2013; Gavazzoni et al., 2018) e complexos de espécies, tais como os complexos *P. scabripinnis* (Moreira-Filho & Bertollo, 1991) e *P. fasciatus* (Artoni et al., 2006), sendo que uma variabilidade cariotípica significativa é encontrada entre os componentes destes complexos de espécies que apresentam, além de números diploides distintos, também diferentes variantes de cromossomos B (Maistro et al., 1992; Mizoguchi & Martins-Santos, 1997).

Com relação à variabilidade cariotípica no gênero *Psalidodon*, são encontrados números diploides desde $2n=36$ em *P. schubarti* (Daniel-Silva & Toledo, 2001) até $2n=50$ em diversas outras espécies (Oliveira et al., 2009), além de algumas espécies e populações apresentarem elementos supranumerários ou cromossomos B em seu genoma. De acordo com Oliveira et al. (2009), a morfologia e tamanho dos cromossomos B em *Psalidodon* é variada, podendo ser encontrados desde macro a micro cromossomos. No entanto, de acordo com Moreira-Filho et al. (2004), a variante metacêntrica com tamanho similar ao do primeiro par de cromossomos do complemento A é a mais recorrente. Devido a isso, foi proposta pelos autores a hipótese de que este cromossomo corresponderia à variante ancestral comum em *Psalidodon*. Essa hipótese foi posteriormente confirmada por Silva et al. (2016, 2021) com base no compartilhamento de sequências de DNA repetitivo e de genes codificadores de proteínas (GCPs), com base em análises realizadas nos cromossomos B de *P. paranae*, *P. scabripinnis*, *P. fasciatus* e *P. bockmanni*.

Um efeito funcional interessante dos cromossomos B foi relatado em *P. scabripinnis*, com alterações observadas no período reprodutivo de seus portadores (Castro

2.6 Referências

ANDERSEN, C.L.; JENSEN, J.L.; ØRNTTOFT, T.F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer research**, v. 64, n. 15, p. 5245-5250, 2004.

BRITT, K.L.; KERR, J.; O'DONNELL, L.; JONES, M.E.E.; DRUMMOND, A.E.; DAVIS, S.R. et al. Estrogen regulates development of the somatic cell phenotype in the eutherian ovary. **The FASEB journal**, v. 16, n. 11, p. 1389-1397, 2002.

BUSTIN, S.A.; BENES, V.; GARSON, J.A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M. et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611-622, 2009.

CAPEL, B. Vertebrate sex determination: evolutionary plasticity of a fundamental switch. **Nature Reviews Genetics**, v. 18, n. 11, p. 675-689, 2017.

CASTRO, J.P.; HATTORI, R.S.; YOSHINAGA, T.T.; SILVA, D.M.Z.A.; FORESTI, F.; SANTOS, M.H. et al. Differential expression of *dmrt1* in *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae) is correlated with B chromosome occurrence. **Zebrafish**, v. 16, n. 2, p. 182-188, 2018.

CASTRO, J.P.; HATTORI, R.S.; YOSHINAGA, T.T.; SILVA, D.M.Z.A.; RUIZ-RUANO, F.J.; FORESTI, F. et al. Differential expression of genes related to sexual determination can modify the reproductive cycle of *Astyanax scabripinnis* (Characiformes: Characidae) in B chromosome carrier individuals. **Genes**, v. 10, n. 11, p. 909, 2019.

CHOI, Y.; QIN, Y.; BERGER, M.F.; BALLOW, D.J.; BULYK, M.L.; RAJKOVIC, A. Microarray analyses of newborn mouse ovaries lacking *Nobox*. **Biology of reproduction**, v. 77, n. 2, p. 312-319, 2007.

CLARK, F.E.; KOCHER, T.D. Changing sex for selfish gain: B chromosomes of Lake Malawi cichlid fish. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-10, 2019.

COLEMAN, J.J.; ROUNSLEY, S.D.; RODRIGUEZ-CARRES, M.; KUO, A.; WASMANN, C.C.; GRIMWOOD, J. et al. The genome of *Nectria haematococca*: contribution of supernumerary chromosomes to gene expansion. **PLoS genetics**, v. 5, n. 8, p. e1000618, 2009.

CORNELIO, D.; CASTRO, J.P.; SANTOS, M.H.; VICARI, M.R.; ALMEIDA, M.C.; MOREIRA-FILHO, O. et al. Hermaphroditism can compensate for the sex ratio in the

Astyanax scabripinnis species complex (Teleostei: Characidae): expanding the B chromosome study model. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 27, n. 3, p. 681-689, 2017.

DALLA BENETTA, E.; ANTOSHECHKIN, I.; YANG, T.; NGUYEN, H.Q.M.; AKBARI, O.S. Genome elimination mediated by gene expression from a selfish chromosome. **Science advances**, v. 6, n. 14, p. eaaz9808, 2020.

DHERAWATTANA, A.; SADANAGA, K. Cytogenetics of a Crown Rust-Resistant Hexaploid Oat with 42+ 2 Fragment Chromosomes 1. **Crop Science**, v. 13, n. 6, p. 591-594, 1973.

FORESTI, F.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; TOLEDO, S.A. Polymorphic nature of nucleolus organizer regions in fishes. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 31, n. 3, p. 137-144, 1981.

FRANK, S.A. Polymorphism of attack and defense. **Trends in ecology & evolution**, v. 15, n. 4, p. 167-171, 2000.

GOES, C.A.G.; SILVA, D.M.Z.A.; UTSUNOMIA, R.; NASCIMENTO, N.F.; YASUI, G.S.; SENHORINI, J.A. et al. Sex-Dependent Inheritance of B Chromosomes in *Psalidodon paranae* (Teleostei, Characiformes) Revealed by Directed Crossings. **Zebrafish**, v. 18, n. 6, p. 363-368, 2021.

GUIGUEN Y.; FOSTIER, A.; PIFERRER, F.; CHANG, C.F. Ovarian aromatase and estrogens: a pivotal role for gonadal sex differentiation and sex change in fish. **General and comparative endocrinology**, v. 165, n. 3, p. 352-366, 2010.

GUIGUEN, Y.; BAROILLER, J.F.; RICORDEL, M.J.; ISEKI, K.; MCMEEL, O.M.; MARTIN, S.A.M. et al. Involvement of estrogens in the process of sex differentiation in two fish species: the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and a tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research**, v. 54, n. 2, p. 154-162, 1999.

HERPIN, A.; SCHARTL, M. Plasticity of gene-regulatory networks controlling sex determination: of masters, slaves, usual suspects, newcomers, and usurpaters. **EMBO reports**, v. 16, n. 10, p. 1260-1274, 2015.

HERPIN, A.; SCHARTL, M. Sex determination: switch and suppress. **Current Biology**, v. 21, n. 17, p. R656-R659, 2011.

HO, J.; TUMKAYA, T.; ARYAL, S.; CHOI, H.; CLARIDGE-CHANG, A. Moving beyond P values: data analysis with estimation graphics. **Nature methods**, v. 16, n. 7, p. 565-566, 2019.

HOUBEN, A.; BANAEI-MOGHADDAM, A.M.; KLEMME, S.; TIMMIS, J. N. Evolution and biology of supernumerary B chromosomes. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 71, n. 3, p. 467-478, 2014.

HUNTRISS, J.; HINKINS, M.; PICTON, H. Mc. cDNA cloning and expression of the human *NOBOX* gene in oocytes and ovarian follicles. **MHR: Basic science of reproductive medicine**, v. 12, n. 5, p. 283-289, 2006.

IMARAZENE, B.; DU, K.; BEILLE, S.; JOUANNO, E.; FERON, R.; PAN, Q. et al. A supernumerary “B-sex” chromosome drives male sex determination in the Pachón cavefish, *Astyanax mexicanus*. **Current Biology**, v. 31, n. 21, p. 4800-4809. e9, 2021.

KITANO, T.; YOSHINAGA, N.; SHIRAISHI, E.; KOYANAGI, T.; ABE, S.I. Tamoxifen induces masculinization of genetic females and regulates P450 aromatase and Müllerian inhibiting substance mRNA expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). **Molecular reproduction and development**, v. 74, n. 9, p. 1171-1177, 2007.

KOBAYASHI, T.; KAJIURA-KOBAYASHI, H.; NAGAHAMA, Y. Induction of XY sex reversal by estrogen involves altered gene expression in a teleost, tilapia. **Cytogenetic and genome research**, v. 101, n. 3-4, p. 289-294, 2003.

KROTZ, S. P.; BALLOW, D. J.; CHOI, Y.; RAJKOVIC, A. Expression and localization of the novel and highly conserved gametocyte-specific factor 1 during oogenesis and spermatogenesis. **Fertility and sterility**, v. 91, n. 5, p. 2020-2024, 2009.

LI, M.; SUN, L.; WANG, D. Roles of estrogens in fish sexual plasticity and sex differentiation. **General and comparative endocrinology**, v. 277, p. 9-16, 2019.

LI, Y.; JING, X.A.; ALDRICH, J.C.; CLIFFORD, C.; CHEN, J.; AKBARI, O.S. et al. Unique sequence organization and small RNA expression of a “selfish” B chromosome. **Chromosoma**, v. 126, n. 6, p. 753-768, 2017.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

MAISTRO, E.L.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. New occurrence of a macro B-chromosome in *Astyanax scabripinnis paranae* (PISCES, CHARACIFORMES, CHARACIDAE). **Revista Brasileira de Genética**, v. 17, n.2, p. 153-156, 1994

MAISTRO, E.L.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F. Occurrence of macro B chromosomes in *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characiformes, Characidae). **Genetica**, v. 87, n. 2, p. 101-106, 1992.

MARTINEZ-BENGOCHEA, A.; DORETTO, L.; ROSA, I.F.; OLIVEIRA, M.A.; SILVA, C.; SILVA, D.M.Z.A. et al. Effects of 17 β -estradiol on early gonadal development and expression of genes implicated in sexual differentiation of a South American teleost, *Astyanax altiparanae*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 248, p. 110467, 2020.

MARTIS, M.M.; KLEMME, S.; BANAEI-MOGHADDAM, A.M.; BLATTNER, F.R.; MACAS, J.; SCHMUTZER, T. et al. Selfish supernumerary chromosome reveals its origin as a mosaic of host genome and organellar sequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 33, p. 13343-13346, 2012.

MIURA, C.; HIGASHINO, T.; MIURA, T. A Progestin and an Estrogen Regulate Early Stages of Oogenesis in Fish. **Biology of Reproduction**, v. 77, p. 822-828, 2007.

MIZOGUCHI, S.M.H.N.; MARTINS-SANTOS, I.C. Macro-and microchromosomes B in females of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Hereditas**, v. 127, n. 3, p. 249-253, 1997.

NOKKALA, S.; GROZEVA, S.; KUZNETSOVA, V.; MARYANSKA-NADACHOWSKA, A. The origin of the achiasmatic XY sex chromosome system in

Cacopsylla peregrina (Frst.) (Psylloidea, Homoptera). **Genetica**, v. 119, n. 3, p. 327-332, 2003.

NAKAMURA, M.; BHANDARI, R.K.; HIGA, M. The role estrogens play in sex differentiation and sex changes of fish. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 28, p. 113-117, 2003.

OGAWA, S.; AKIYOSHI, M.; HIGUCHI, M.; NAKAMURA, M.; HIRAI, T. Post-sex differentiation's sex reversal in the female common carp (*Cyprinus carpio*). **Cybium**, v. 32, n. 2, p. 102-103, 2008.

PIFERRER, F. Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. **Aquaculture**, v. 197, n. 1-4, p. 229-281, 2001.

PORTO-FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; MAISTRO, E.L.; FORESTI, F. Estimated frequency of B-chromosomes and population density of *Astyanax scabripinnis* paranae in a small stream. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 20, n. 3, 1997.

RAJENDIRAN, P.; JAAFAR, F.; KAR, S.; SUDHAKUMARI, C.; SENTHILKUMARAN, B.; PARHAR, I. Sex Determination and Differentiation in Teleost: Roles of Genetics, Environment, and Brain. **Biology**, v. 10, n. 10, p. 973, 2021.

RHOADES, M.M.; MCCLINTOCK, B. The cytogenetics of maize. **The Botanical Review**, v. 1, n. 8, p. 292-325, 1935.

ROCON-STANGE, E.A.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F. Supernumerary B chromosomes restricted to males in *Asyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Revista Brasileira de Genética**, v. 16, p. 601-615, 1993.

SALVADOR, L.B.; MOREIRA-FILHO, O.B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Heredity**, v. 69, n. 1, p. 50-56, 1992.

SERRANO-FREITAS, E.A.; SILVA, D.M.Z.A.; RUIZ-RUANO, F.J.; UTSUNOMIA, R.; ARAYA-JAIME, C.; OLIVEIRA, C. et al. Satellite DNA content of B chromosomes in the characid fish *Characidium gomesi* supports their origin from sex chromosomes. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 295, n. 1, p. 195-207, 2020.

SILVA, D.M.Z.A.; DANIEL, S.N.; CAMACHO, J.P.M.; UTSUNOMIA, R.; RUIZ-RUANO, F.J.; PENITENTE, M. et al. Origin of B chromosomes in the genus *Astyanax* (Characiformes, Characidae) and the limits of chromosome painting. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 291, n. 3, p. 1407-1418, 2016.

SILVA, D.M.Z.A.; PANSONATO-ALVES, J.C.; UTSUNOMIA, R.; ARAYA-JAIME, C.; RUIZ-RUANO, F.J.; DANIEL, S.N. et al. Delimiting the origin of a B chromosome by FISH mapping, chromosome painting and DNA sequence analysis in *Astyanax paranae* (Teleostei, Characiformes). **PLoS One**, v. 9, n. 4, p. e94896, 2014.

SILVA, D.M.Z.A.; RUIZ-RUANO, F.J.; UTSUNOMIA, R.; MARTÍN-PECIÑA, M.; CASTRO, J.P.; FREIRE, P.P. et al. Long-term persistence of supernumerary B chromosomes in multiple species of *Astyanax* fish. **BMC biology**, v. 19, n. 1, p. 1-17, 2021.

SUMNER, A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Exp. Cell Res.**, v. 75, p. 304-306, 1972.

TAKASHIMA, T.; FUJIMARU, T.; OBATA, Y. Effect of in vitro growth on mouse oocyte competency, mitochondria and transcriptome. **Reproduction**, v. 162, n. 4, p. 307-318, 2021.

VICENTE, V.E.; MOREIRA-FILHO, O.; CAMACHO, J.P.M. Sex-ratio distortion associated with the presence of a B chromosome in *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 74, n. 1-2, p. 70-75, 1996.

WANG, D.S.; KOBAYASHI, T.; ZHOU, L.Y.; PAUL-PRASANTH, P.; IJIRI, S.; SAKAI, F. et al. Foxl2 up-regulates aromatase gene transcription in a female-specific manner by binding to the promoter as well as interacting with ad4 binding protein/steroidogenic factor 1. **Molecular Endocrinology**, v. 21, n. 3, p. 712-725, 2007.

Considerações Gerais

O desenvolvimento deste projeto forneceu um melhor entendimento sobre a origem e as relações evolutivas dos cromossomos B do gênero *Psalidodon*, bem como sobre os mecanismos de atuação destes cromossomos a nível de expressão gênica.

A presença de cromossomos B no gênero *Psalidodon* está associada a um complexo histórico evolutivo. No entanto, o compartilhamento de genes entre a variante *BfMa*, analisada no presente estudo, e outras variantes do gênero, indica que esta variante também teria se originado em um mesmo processo de formação há cerca de 4 milhões de anos atrás. Dentre os genes compartilhados entre todas as variantes, pelo menos três estão relacionados a funções do ciclo celular, e desta forma é possível especular que tenham sido genes importantes para o sucesso evolutivo destes cromossomos. O compartilhamento de seis genes da variante *BfMa* dentre os 11 genes encontrados em *BfMb* de *P. fasciatus* indica que estes cromossomos são capazes de perder ou adquirir genes exclusivos e seguir caminhos evolutivos distintos dentro de uma mesma espécie. Ainda, apesar da ocorrência de hibridação interespecífica entre *P. fasciatus* e *P. paranae*, o acúmulo de diferenças estruturais entre as variantes *BfMa* e *BpM*, bem como o acúmulo de diferenças no conteúdo gênico, permitem descartar a hipótese de surgimento da variante *BfMa* por hibridação específica recente.

Em seguida, a análise de expressão diferencial de genes associados com a via de diferenciação do sexo em *P. paranae* ajuda elucidar os possíveis efeitos funcionais destes cromossomos. As análises indicam que os genes envolvidos com a produção e ação de hormônios estrógenos encontram-se subexpressos em fêmeas +B. Essa subexpressão poderia levar a menor produção e ação destes hormônios e poderia ser um reflexo da distorção dos feedbacks regulatórios causados pelos cromossomos B, bem como um mecanismo de supressão da ação destes cromossomos por parte do genoma A. Neste sentido, a superexpressão do gene *dmrt1* em machos +B poderia ser um indício desta supressão, indicando uma corrida armamentista entre os genomas A e B. Ainda, a subexpressão de genes da via estrogênica também poderia ser entendida como um efeito funcional dos cromossomos B, levando a uma menor produção de estrógeno e alterando o ciclo reprodutivo da espécie. A superexpressão do gene *nobox* em fêmeas +B poderia levar a uma maior produção de ovócitos e conferir um importante efeito adaptativo para os cromossomos B, indicando assim um mecanismo de acúmulo destes cromossomos.

Por fim, consideramos que os resultados e as hipóteses aqui apresentados fornecem novas perspectivas para o estudo de cromossomos B em peixes. Ainda, posteriores análises de NGS podem elucidar de forma mais ampla as relações evolutivas entre diferentes variantes de cromossomo B em *Psalidodon*. Também, análises dos efeitos dos cromossomos B na expressão de gônadas de juvenis em período de determinação sexual podem elucidar de forma completa o mecanismo de atuação destes cromossomos durante o ciclo de vida.