

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
CAMPUS DE BOTUCATU**

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SEQUÊNCIAS REPETIDAS DE
DNA NO GENOMA DO CICLÍDEO *Astronotus ocellatus*.**

JULIANA MAZZUCHELLI

**Dissertação apresentada ao Instituto
de Biociências, Câmpus de Botucatu,
UNESP, para obtenção do título de
Mestre no Programa de PG em
Ciências Biológicas/AC: Genética.**

Orientador: Prof. Dr. Cesar Martins

BOTUCATU – SP

2008

AGRADECIMENTOS:

Em primeiro lugar agradeço a Deus por tudo que tenho e tudo que sou!

Em especial aos meus pais, por depositar em mim toda confiança e acreditar na minha capacidade mais do que eu mesma. À Ana Paula e a Andressa, pela convivência familiar, e a todos da minha família pelo carinho demonstrado e pela compreensão nos momentos de ausência. Amo vocês!

Ao Willians que muitas vezes esteve longe dos olhos mas bem perto do meu coração, e contribuiu de maneira essencial para me dar ânimo e vontade de querer sempre mais. Te amo muito!

Ao meu orientador Prof. Dr. Cesar Martins, pela orientação, apoio e confiança depositada durante a realização deste trabalho.

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro e concessão de bolsa de estudos.

A Profa. Dra. Adriane Wasko, Prof. Dr. Paulo Venere, Dr. Ricardo Benine, Dra. Cristiane Shimabukuro Dias, Prof. Dr. Fausto Foresti, Prof. Dr. Cláudio Oliveira, Prof. Celso, pelo exemplo de profissionalismo, pela confiança, pela amizade e pelos conselhos profissionais ou pessoais.

Agradeço o apoio, carinho e amizade dos inúmeros companheiros do Departamento de Morfologia em especial a Andréia Polleto pelos inúmeros momentos de diversão; ao Danilo, Diogo e Kbelo pelos dias gratificantes dentro do laboratório, na padoca ou no Bar do Gordo; ao Caruncho, Claudinha, Fábio, Kelly, Konrado, Marcelinha, Márcio, Rubens, Vanessa e Varvito.

A Daniela pela amizade, companherismo e sugestões em todos os momentos, tanto na realização deste trabalho quanto na convivência do dia a dia dentro de casa, academia ou nas festinhas!

A Irani por sua amizade e todos os ensinamentos, críticas e broncas na realização da técnica de FISH que foram de fundamental importância para a realização deste trabalho e serão muito úteis no meu futuro profissional.

A Tatiane Mariguela pela ajuda e dedicação durante os trabalhos de seqüenciamento, e também nos momentos de diversão e indecisão.

A Sílvia, Lais e a Eli pela convivência do dia a dia, pelo carinho e amizade!

Aos amigos de Campinas pelos finais de semana divertidíssimos que foram de fundamental importância para relaxar da rotina semanal impiedosa deste trabalho.

As minhas “irmãs” de coração que deixei em Londrina, Juliana Mara, Leandra e Georgina, que apesar da distância sempre estiveram dispostas a ajudar e preocupadas com meu trabalho. A saudade é grande, aguardem minha visita!

Aos técnicos do departamento Renato, Ricardo Teixeira e Zé Eduardo pela ajuda em todos os momentos.

Ao Departamento de Morfologia, ao Instituto de Biociências de Botucatu e à Universidade Estadual Paulista, pela estrutura cedida para a realização deste trabalho.

Aos funcionários da pós-graduação, funcionários e professores do Departamento de Morfologia pela amizade, esclarecimentos em todas as solicitações..

Enfim, a todos aqueles que me auxiliaram de alguma forma na elaboração desse trabalho.

Muito obrigada!

LISTA DE FIGURAS:

Figura 1: Diversidade das espécies de ciclídeos.....	13
Figura 2: Representação esquemática dos microssatélites.	18
Figura 3: Diferentes grupos de retrotransposons LTR e Não-LTR.....	23
Figura 4: Esquema representativo do movimento de um transposon.....	25
Figura 5: Exemplar de <i>Astronotus ocellatus</i>	27
Figura 6: Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo para a visualização das amostras de DNA genômico obtidas pela extração com fenol/clorofórmio.....	39
Figura 7: Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo para visualização da digestão utilizando as enzimas <i>HaeIII</i> , <i>HindIII</i> , <i>HinfI</i> , <i>MspI</i> , <i>PvuII</i> , <i>XbaI</i>	40
Figura 8: Eletroforese em gel de agarose 1% para visualização de produto de PCR dos clones positivos (banda menor) oriundos da digestão com a enzima <i>HinfI</i>	41
Figura 9: Eletroforese em gel de agarose 1% para visualização de produto de PCR dos clones oriundos da digestão com a enzima <i>HaeIII</i>	41
Figura 10: Sequências nucleotídicas dos clones positivos (<i>AoHaeIII</i> e <i>AoHinfI</i>).....	42
Figura 10 cont.: Seq. nucleotídicas dos clones positivos (<i>AoHaeIII</i> e <i>AoHinfI</i>).....	43
Figura 11: Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo mostrando produtos de PCR para os elementos transponíveis <i>Rex1</i> e <i>Rex3</i> amplificados de vários indivíduos da espécie <i>A. ocellatus</i>	45
Figura 12: Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo mostrando produtos de PCR para os elementos transponíveis <i>Rex6</i> amplificados de vários indivíduos da espécie <i>A. ocellatus</i>	46
Figura 13: Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo para visualização de produto de PCR dos clones oriundos da banda maior e da banda menor do elemento <i>Rex6</i>	46
Figura 14 : Sequências nucleotídicas dos elementos transponíveis <i>Rex1</i> , 3 e 6.....	47

Figura 15: Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio após a reação de PCR evidenciando o elemento transponível <i>Tc1</i> na espécie <i>Astronotus ocellatus</i>	51
Figura 16: Seqüência nucleotídica do elemento <i>Tc1</i>	52
Figura 17: Cariótipo de <i>Astronotus ocellatus</i> baseado em coloração convencional Giemsa e após o tratamento com o bandamento C.....	54
Figura 18: Hibridação <i>in situ</i> fluorescente utilizando como sonda os retrotransposons <i>Rex1</i> , <i>Rex3</i> , <i>Rex6</i> e o transposon <i>Tc1</i>	55
Figura 18 (continuação): Hibridação <i>in situ</i> fluorescente utilizando como sonda os DNAs repetidos isolados por restrição enzimática <i>AoHaeIII-6</i> , <i>AoHaeIII-15</i> e <i>AoHinfI-4</i> e o DOP-PCR nos cromossomos de <i>Astronotus ocellatus</i>	56

LISTA DE TABELAS:

Tabela 01: Principais clones obtidos por restrição enzimática e suas características.....	43
Tabela 02: Similaridade encontrada para o elemento <i>Rex1</i> de <i>Astronotus ocellatus</i> em relação a outras espécies de peixes.....	48
Tabela 03: Similaridade encontrada para o elemento <i>Rex3</i> de <i>Astronotus ocellatus</i> em relação a outras espécies de peixes.....	49
Tabela 04: Similaridade encontrada para o elemento <i>Rex6</i> de <i>Astronotus ocellatus</i> em relação a outras espécies de peixes.....	50
Tabela 05: Similaridade encontrada para o elemento <i>Tc1</i> de <i>Astronotus ocellatus</i> em relação a outras espécies de peixes.....	52

RESUMO:

Uma grande porção do genoma da maioria dos organismos é composta por seqüências repetidas de DNA que foram considerados, por muitos anos, como DNA “egoísta” ou como DNA “lixo”. Pouca atenção tem sido dada a estes segmentos de DNA uma vez que eles não são transcritos em produtos codificantes ou funcionais. Atualmente diversos trabalhos têm sugerido o envolvimento destas seqüências na regulação e reparo de alguns genes, na diferenciação de cromossomos sexuais e na organização estrutural e funcional do genoma. Os estudos citogenético-moleculares, como o mapeamento físico cromossômico, têm demonstrado que as seqüências de DNA repetidas podem ser muito úteis como ferramentas para definir a estrutura e revelar a organização e evolução do genoma das espécies. No presente trabalho, vários elementos repetidos (*AoHinfI*-4, *AoHaeIII*-6, *AoHaeIII*-15) foram isolados, através de restrição enzimática, do genoma do ciclídeo sul-americano *Astronotus ocellatus*, popularmente conhecido como “Oscar” ou “Apaiari”. Estes elementos foram seqüenciados e utilizados como sondas para hibridação cromossômica para o estudo de seu padrão de distribuição no cariótipo. As seqüências dos elementos repetidos isolados por restrição enzimática apresentaram alta similaridade com outros DNAs repetidos de outras espécies de peixes já depositadas em banco de dados. Os resultados da hibridação *in situ* de todos os elementos utilizados mostraram um acúmulo de marcações preferencialmente centromérica em todos os cromossomos do complemento. Essas marcações também são coincidentes com a localização da heterocromatina evidenciada através do bandamento C, reforçando a idéia do acúmulo de DNA repetitivo em regiões heterocromáticas. Essa distribuição preferencialmente centromérica dos elementos repetidos isolados sugere que tais seqüências devam desempenhar um papel importante na estrutura organizacional e funcional do centrômero e, conseqüentemente, do genoma desta espécie. A maioria dos estudos visando o mapeamento físico cromossômico de espécies de ciclídeos, estão voltados para as espécies africanas. Em relação aos ciclídeos sul-americanos, a maioria das informações existentes sobre genética está relacionada a dados de citogenética básica e filogenia molecular. Os resultados do presente trabalho evidenciam dados relevantes para o conhecimento do genoma do ciclídeo sul-americano *A. ocellatus*.

Palavras-chave: elementos repetidos, hibridação *in situ*, citogenética, heterocromatina, evolução

ABSTRACT:

In most organisms a great portion of the genome is composed of repetitive DNA sequences. However little attention has been given to these segments of DNA, which were considered by many years as "selfish" or "junk" DNA. On the other hand, several works have suggested the involvement of these sequences in the regulation and repair of some genes, in the differentiation of sex chromosomes and in the structural and functional organization of the genome. The cytogenetics and molecular studies, as the physical chromosome mapping, has been demonstrating that repetitive sequences can be very useful as tools to define the structure and to reveal the organization and evolution of the genome of the species. In the present work several repetitive elements (retrotransposons *Rex1*, *Rex3* and *Rex6*; transposon *Tc1*; the elements *AoHinfI*-4, *AoHaeIII*-6, *AoHaeIII*-15) were isolated using PCR and enzymatic restriction digestion of the genome of the cichlid *Astronotus ocellatus*, popularly known as "Oscar" or "Apaiai". These elements were sequenced and their genomic distribution determined by chromosomal *in situ* hybridization. The nucleotide sequences of the isolated elements showed high similarity to repetitive DNAs of other fish species available in public databases. The results of *in situ* hybridization showed an accumulation of all obtained elements preferentially in centromeres of all chromosomes of the complement. The chromosomal signals were also coincident with the location of the heterocromatins evidenced through the C banding, reinforcing the idea of the accumulation of repetitive DNA in heterocromatic areas. These preferential distribution in the centromeres, suggests that such sequences should play an important role in the functional organizational and structure of the centromeres and, thus in the genome of this species. The great majority of the studies using the physical chromosome mapping of cichlid species were done in African species. In relation to the South American cichlids most of the current information on genetics is related to basic cytogenetics and molecular phylogeny. The results of the present work reveal relevant data for the knowledge of the genome of the South American cichlid *A. ocellatus*.

Key-words: repetitive elements, *in situ* hybridization, cytogenetics, heterocromatin, evolution.

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

1. INTRODUÇÃO

1.1. Biologia e Citogenética de Cichlidae.....	11
1.2. DNA repetido como ferramenta para o estudo do genoma.....	14
1.3. Classificação das seqüências repetidas.....	16
1.4. Elementos transponíveis e seu papel na evolução do genoma.....	19
1.4.1 Retrotransposons.....	21
1.4.2 Transposons.....	24

2. OBJETIVOS.....26

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Material Biológico.....	27
3.2. Métodos	
3.2.1. Extração de DNA de tecidos sólidos.....	27
3.2.2. Isolamento de seqüências repetidas por PCR.....	28
3.2.3. Clonagem de fragmentos de DNA obtidos por PCR.....	30
3.2.4. Isolamento de seqüências repetidas por restrição enzimática.....	31
3.2.5. Purificação de fragmentos de DNA de gel de agarose.....	31
3.2.6. Clonagem das seqüências obtidas por restrição enzimática.....	32
3.2.7. PCR para confirmação da presença de insertos.....	33
3.2.8. Eletroforese em gel de agarose.....	33
3.2.9. Seqüenciamento de DNA.....	34
3.2.10. Obtenção de cromossomos mitóticos através de preparações diretas.....	35
3.2.11. Protocolo para obtenção de seqüências repetidas por DOP-PCR.....	36
3.2.12. Hibridação <i>in situ</i> por fluorescência.....	36

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Isolamento e caracterização de seqüências repetidas do genoma de <i>Astronotus ocellatus</i> por restrição enzimática.....	39
4.2. Isolamento e caracterização de seqüências repetidas no genoma de <i>Astronotus ocellatus</i> por PCR.....	45
4.3. Caracterização citogenética e análises de citogenética molecular.....	52
4.4. Discussão Geral.....	57

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
---	-----------

ANEXOS

1. INTRODUÇÃO

1.1 Biologia e Citogenética dos Cichlidae

A família Cichlidae é um dos maiores grupos de teleósteos, pertence à ordem Perciforme e está incluída entre as famílias de peixes com maior número de espécies (Nelson, 1994), sendo estimadas 3.000 espécies que se encontram distribuídas nas águas doces, salobras e salgadas pela América Central e do Sul, Madagascar, Sudeste da Índia e África (Kocher, 2004).

A maior diversidade de espécies de Cichlidae é encontrada principalmente nos grandes lagos africanos (Trewavas, 1983). Estima-se que, entre esses três lagos (Victoria, Tanganyika e Malawi), são encontradas cerca de 1.500 espécies de ciclídeos (Turner e Genner, 2005). Apesar da grande importância evolutiva deste grupo africano as relações filogenéticas ainda são equivocadas (Takahashi *et al.*, 1998). Alguns pesquisadores classificam os ciclídeos africanos em três grandes grupos: Pelmatochromineos, Haplochromineos e Tilapiíneos (Lowe-McConnell, 1991), porém estes grupos não são reconhecidos como unidades taxonômicas válidas por muitos pesquisadores e a classificação correta das espécies africanas ainda permanece indefinida. A espécie de ciclídeo africano mais conhecida é a tilápia do Nilo, mas embora aproximadamente 70 espécies de ciclídeos recebam a denominação de “tilápia”, somente *Oreochromis niloticus*, *O. mossambicus* e *O. aureus*, e seus híbridos, têm grande importância na piscicultura mundial, sendo um dos peixes de água doce mais cultivados em todo o mundo atualmente

Apesar de existirem espécies introduzidas de ciclídeos africanos, principalmente a tilápia do Nilo, o número de espécies válidas para a América do Norte, Central e do Sul é 406, distribuídas em 51 gêneros (Kullander, 1998). Os ciclídeos sul-americanos estão organizados nas seguintes subfamílias: Retroculinae; Cichlinae; Astronotinae; Geophaginae e Cichlasomatinae. Acredita-se que os ciclídeos sul-americanos representem um grupo monofilético que migrou da África e, a partir da América do Sul, se espalharam pela América Central e do Norte (Murray, 2001).

Os ciclídeos têm atraído uma maior atenção dos pesquisadores, nos últimos anos, devido a sua rápida radiação adaptativa nos grandes lagos do leste da África, onde quase 2.000 espécies têm evoluído somente nos últimos 10 milhões de anos (Kocher, 2004). O principal fator que promove este tipo de adaptação a novos ambientes é o fato de que eles se adequam facilmente a condições extremas de habitats e nichos (Moyle e Cech Jr., 2000). Além disso, algumas espécies desta família têm uma grande importância para

a aquicultura mundial. Estes peixes apresentam um colorido fascinante que torna as espécies de pequeno porte preferidas pelos aquarofilistas e as de grande porte são muito utilizadas na alimentação e pesca esportiva (Axelrod, 1996).

Os ciclídeos são peixes de corpo alto, sendo que alguns apresentam a forma de disco. A grande maioria apresenta cabeça larga, sendo que em muitas espécies, na época reprodutiva, o macho exibe uma protuberância adiposa na testa (às vezes também presente na fêmea) (Sterba, 1973). O cuidado parental, assim como a guarda de ovos e larvas são marcantes entre os indivíduos desta família, sendo este papel desempenhado principalmente pelas fêmeas. Os ciclídeos não apresentam um período reprodutivo bem definido e não apresentam dimorfismo sexual marcante, a não ser na época da reprodução, quando algumas características podem diferenciar os sexos (Feldberg, 2003).

A boca das espécies desta família é protrátil e circundada por grossos lábios. Possuem as nadadeiras dorsal e anal com espinhos pungentes na porção anterior e raios moles na porção posterior. Possuem um par de narinas, sendo uma de cada lado; têm grande diversidade de hábitos alimentares e atingem o tamanho máximo de cerca de 80 cm (Nelson, 1994).

De acordo com Britski (1972) uma característica marcante dos representantes dessa família é a linha lateral interrompida, onde a porção superior se estende desde o opérculo até o início dos raios moles da dorsal, enquanto a porção inferior segue um pouco abaixo, como se houvesse ocorrido uma quebra.

No Brasil os ciclídeos representam apenas 6% da fauna dos peixes de água doce (Feldberg, 1983), mas integram 2% do total de peixes exportados. Desempenham um papel muito importante na pesca tanto como fonte de alimento, quanto atividades de recreação e comércio para o ecoturismo. Sua distribuição pelo território nacional é ampla (Britski, 1986).

Uma das espécies mais representativas para o comércio, entre os ciclídeos sul americanos, é *Astronotus ocellatus*, popularmente conhecido como “Oscar” ou “Apaiari” na região Amazônica. Sua coloração varia do marrom ao vermelho-ferrugem, mas não é difícil encontrar indivíduos albinos. Esta espécie é nativa da América do Sul, sendo encontrada na bacia do rio Amazonas, incluindo Peru, Colômbia e Brasil e foi introduzida nas regiões central e sul do país (Pavanelli, 2000). É um animal de grande interesse econômico, principalmente para a aquarofilia. No gênero *Astronotus* existem duas espécies válidas, *Astronotus ocellatus* (Agassiz, 1831) e *Astronotus crassipinnis* (Heckel, 1840).



Figura 1: Diversidade das espécies de ciclídeos

Em se tratando do conhecimento do genoma das espécies de ciclídeos, os dados são poucos, e muito aquém do que já se conhece para o “pufferfish” (*Takifugu rubripes*) e o “zebrafish” (*Danio rerio*), os quais possuem a seqüência nucleotídica do seu genoma quase totalmente conhecida (www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/zebrafish) (Aparício *et al.*, 2002). A maioria das informações existentes sobre genética da família Cichlidae está relacionada a análises da filogenia das espécies e estudos citogenéticos como a determinação do número diplóide. Este número diplóide está intimamente relacionado à distribuição geográfica das espécies, onde os ciclídeos africanos têm um número diplóide modal igual a 44 cromossomos e os da região Neotropical apresentam na sua maioria, 48 cromossomos (Feldberg *et al.*, 2003).

Aproximadamente 135 espécies de ciclídeos foram analisadas citogeneticamente, números que refletem poucos dados visto que a família compreende cerca de 3000 espécies. O número diplóide encontrado varia de 38 a 60 cromossomos, não ocorre a presença de cromossomos sexuais, mas já foi relatada a existência de cromossomos Bs, ou supranumerários, para algumas espécies como, por exemplo, em *Crenicichla reticulata*, *Cichla monoculos* e *Cichla sp.* (Feldberg *et al.*, 2004). O tratamento com nitrato de prata para se determinar a localização das regiões organizadoras de nucléolo mostra que a maioria das espécies só possui um par portador de NOR, e esta região se localiza na porção terminal ou intersticial dos cromossomos.

Poucos estudos genéticos têm sido direcionados aos ciclídeos frente à enorme diversidade de espécies existentes. A maior parte dos estudos está direcionada aos

ciclídeos africanos, com especial ênfase nas espécies de tilápias. Dessa forma, avanços nos estudos genômicos utilizando ferramentas cromossômicas e de análise de DNA neste importante grupo de peixes, incluindo a espécie *Astronotus ocellatus*, se fazem necessários. Este tipo de análise mostra-se promissora para uma melhor compreensão dos mecanismos de evolução genômica e rearranjos cromossômicos que estiveram envolvidos durante a diversificação e história evolutiva dos ciclídeos.

1.2 DNA repetitivo como ferramenta para o estudo do genoma

Na maioria dos organismos, as seqüências repetidas de DNA compreendem uma grande porção do genoma, cerca de 50% ou mais de todo o DNA dos humanos é composto de DNA repetido (*The Genome International Sequencing Consortium*, 2001). A enorme variação relatada no tamanho do genoma entre os diferentes eucariotos é freqüentemente associada ao acúmulo de seqüências repetidas.

Apesar de não se saber ao certo a função dos DNAs repetidos diferentes estudos vêm sugerindo o envolvimento destas seqüências no processo de replicação do DNA (Li *et al.*, 2002), recombinação (Biet *et al.*, 1999), expressão gênica (Liu *et al.*, 2001), na diferenciação de cromossomos sexuais em peixe (Parise-Maltempi *et al.*, 2007), ou seja, na organização estrutural e funcional do genoma em geral. Essas seqüências repetidas podem também estar envolvidas em rearranjos cromossômicos, tais como deleções, duplicações, inversões e translocações recíprocas, sendo responsáveis por proporções significativas das variações cariotípicas observadas em muitos grupos (Kidwell, 2002).

No entanto, o papel mais significativo das seqüências repetidas pode ser representado pelos segmentos presentes nos centrômeros e telômeros dos cromossomos dos eucariotos, desempenhando funções cruciais na manutenção e propagação do material genético nuclear. Instiga-se que estas seqüências são de fundamental importância para o esclarecimento de uma miríade de questões que norteiam o conhecimento da estrutura centromérica e telomérica, origem e evolução de cromossomos sexuais e cromossomos B (Martins *et al.*, 2004).

A heterocromatina é encontrada em centrômeros, telômeros e posições intersticiais ao longo dos braços cromossômicos. As seqüências repetidas presentes na heterocromatina centromérica desempenham um papel fundamental no comportamento dos cromossomos durante a divisão celular, devido a várias proteínas que se ligam por afinidade a estas seqüências (Csink e Henikoff, 1998). Além disso, a eucromatina, rica em genes, também pode conter algumas seqüências repetidas. Entretanto, estas

seqüências parecem causar mutações prejudiciais aos genes, sendo, eventualmente eliminadas pela pressão seletiva (Deininger *et al.*, 2003).

Atualmente, por conta destes fatores, um leque de questões e estudos se desenrolam ao redor destas seqüências de DNA que até pouco tempo atrás eram considerados como “DNA lixo”, mas estudos nos mostram que estas seqüências são de suma importância e sua formação é um processo contínuo e provavelmente mais antigo que a divergência das primeiras linhagens de eucariotos (Jurka *et al.*, 2005).

Com o conhecimento do genoma completo de alguns organismos através dos projetos de seqüenciamento de DNA, ficou claro que o aumento do tamanho do genoma foi mesmo devido a ganhos de segmentos duplicados. A evolução do genoma parece ter ocorrido em consequência da aquisição destas seqüências (Martins, 2006). Todavia o conhecimento completo da estrutura e função dos cromossomos necessariamente requer o conhecimento das regiões ricas em seqüências repetidas que permanecem obscuras mesmo após o seqüenciamento completo do genoma de vários organismos, as regiões ricas em elementos repetidos permanecem como “falhas” por causa da dificuldade em determinar sua correta posição, arranjo e número de cópias no genoma.

Os estudos genéticos e citogenéticos-moleculares têm demonstrado que as seqüências de DNA repetidos podem ser muito úteis como ferramentas para definir a estrutura e revelar a organização e evolução do genoma das espécies. Elas podem ser facilmente isoladas, encontram-se distribuídas em diversas regiões do genoma e geram sinais de fácil visualização após hibridação nos cromossomos.

Marcadores citogenéticos e genéticos com o uso de seqüências de DNA têm sido desenvolvidos para emprego na aquíicultura, com o objetivo de melhorar traços importantes dos estoques de peixes, como o aumento do crescimento e a resistência a doenças, identificação de estoques, análise de características quantitativas, cruzamentos seletivos, e acesso à variabilidade genética das populações. Os mapas genéticos são de grande importância também para estudos comportamentais, morfológicos, filogeográficos e evolutivos, entre outros.

Atualmente os mapas genéticos podem ser construídos de três maneiras: (1) mapeamentos físicos, que localizam segmentos de DNA nos cariótipos das espécies por metodologias citogenéticas; (2) mapas genéticos de ligação, que se destinam a ordenar os marcadores moleculares nos cromossomos baseando-se na freqüência de recombinação entre os locos gênicos; e (3) o último tipo de mapa que é o seqüenciamento completo de nucleotídeos do genoma de uma espécie (Martins *et al.*, 2004).

A presença constante de DNAs repetidos nos cromossomos de peixes, principalmente em cromossomos sexuais e supranumerários reforça a idéia de que estudos objetivando o isolamento, a caracterização, a organização genômica e o mapeamento cromossômico dessas seqüências representam fontes certas e seguras na obtenção de respostas sobre a origem e evolução desses tipos cromossômicos, amplamente distribuídos nos peixes. Seqüências repetidas como SINEs, LINEs, DNAs satélites, minisatélites, microsatélites e genes repetidos em tandem, têm sido descritas para muitas espécies de peixes. Essas seqüências podem ser utilizadas como marcadores cromossômicos úteis em estudos de evolução e de organização genômica (Martins, 2006). Embora muitas destas seqüências repetidas tenham sido estudadas quanto à seqüência nucleotídica e alguns aspectos de organização genômica, poucos são os trabalhos acerca de seu mapeamento físico nos cromossomos dos peixes (Galetti e Martins, 2004).

Os primeiros trabalhos de mapeamento físico através das hibridações *in situ* utilizando como sondas seqüências de DNAs repetidos foram feitos com seqüências de RNA ribossomais (RNAr) 28S, 18S, 5.8S e 5S (Martins, 2006).

Ressalva-se ainda a importância biológica e econômica das espécies de ciclídeos, tornando-se de grande valia os estudos que visam um melhor conhecimento do genoma deste grupo de peixes como a análise, caracterização e mapeamento das seqüências repetidas. A construção e integração de mapas físicos e genéticos representam a melhor estratégia para o entendimento da estrutura e evolução do genoma de diversas espécies desta família.

1.3 Classificação das seqüências repetidas

Os DNAs repetidos são classificados de acordo com suas características principais e incluem as famílias multigênicas, as seqüências repetidas *in tandem* (lado a lado) e as seqüências dispersas.

As famílias multigênicas são seqüências repetidas de DNA composta por DNAs codificadores, por exemplo, têm-se as famílias compostas de centenas ou milhares de cópias de seqüências, que codificam importantes moléculas como os RNAs ribossomais (RNAr) (Martins, 2006). Uma família multigênica é constituída por um conjunto de genes com notável similaridade estrutural, quanto ao número e organização dos pares de bases nitrogenadas, embora eles possam exibir diferentes funções. Acredita-se que as famílias de multigenes sejam formadas por uma série de eventos de duplicação durante a evolução e que o acúmulo de mutações ocorridas ao longo do tempo é responsável

pelas pequenas diferenças observadas hoje entre esses genes. No entanto, uma característica comum a essas famílias de genes é que possuem um número considerável de pseudogenes, que mostra grande semelhança com os genes funcionais da mesma família, mas perderam sua capacidade de expressão devido a mutações adquiridas (Farah, 2007).

As seqüências repetidas *in tandem* são classificadas em três sub-grupos de acordo com o tamanho do seu fragmento. Inicialmente temos as seqüências satélites, essas seqüências se apresentam altamente repetidas e organizadas em cadeia. Geralmente são compostas de cerca de 100 a 300 pares de base (pb) (DNA altamente repetido) de comprimento e podem variar de 1.000 a mais de 100.000 cópias de uma seqüência básica que ocorre em um ou em alguns locos nos cromossomos. Encontram-se localizadas principalmente nas regiões terminais e centromérica dos cromossomos, e são os principais componentes de heterocromatina. Com exceção dos procariotos e algumas espécies de fungos (Timberlake, 1978), DNAs satélites foram encontrados no genoma de todas espécies analisadas até o presente. O número de cópias de DNAs satélites e sua proporção em relação ao DNA genômico total de uma espécie é bastante variável, por exemplo, em mamíferos esta proporção pode variar entre 5% e 30% do genoma (Walsh, 2001). Assim como para todo DNA repetido não foi elucidada ainda uma função geral que explique a presença de DNAs satélites no genoma.

Um segundo grupo das seqüências organizadas em cadeia compreende os minissatélites ou seqüências com número variável de repetições (VNTR, *variable number of tandem repeats*). São repetições de aproximadamente 10 a 60 pb (DNA moderadamente repetido) encontrados dispersos no genoma e agrupados nos telômeros.

A localização dos minissatélites no DNA através da técnica de *Southern blot* mostrou que cada indivíduo apresenta um padrão particular com relação à quantidade e comprimento das cadeias de minissatélites (Jeffreys *et al.*, 1985). A técnica foi denominada como impressão digital do DNA (*DNA fingerprint*) resultando em marcadores polimórficos que podem distinguir facilmente entre o genoma de um organismo ou outro. Desde a descoberta desta técnica, muitos estudos empregando os minissatélites tem sido desenvolvidos nas pesquisas biológicas tais como mapeamento genômico, genética de populações e evolutiva, programas de seleção e melhoramento e em estudos de ecologia e preservação de espécies (Harris e Wright, 1995).

O último grupo dos elementos repetidos *in tandem* é composto pelos microssatélites. Os microssatélites são repetições mais curtas (1 a 5 pb) do que a classe anterior e ao menos 30.000 loci diferentes de microssatélites estão presentes no genoma

humano. São altamente polimórficos pois apresentam variações no número de repetições e inúmeras variações no tipo podendo ser mono, di, trinucleotídicos, e assim respectivamente (Figura). A maioria dos microssatélites apresenta repetições dinucleotídicas, sendo a repetição mais freqüente o nucleotídeo AC (Chistiakov et al., 2006). Por serem seqüências muito polimórficas são usadas em investigação criminais e de paternidade, e este alto polimorfismo ocorre devido à alta taxa de mutação nessas regiões (Ellegren, 2000) quando comparada a regiões codificantes do genoma, que apresentam taxas de mutações menores (Li, 1997).

São também classificados como perfeitos, imperfeitos ou compostos. Os perfeitos são aqueles que o motivo se repete sem interrupção de um outro motivo ou seqüência. Os compostos são aqueles nos quais existe a repetição de mais de um tipo de motivo. Os imperfeitos são aqueles que apresentam outras seqüências além daquelas repetidas em tandem (Weber, 1989).

Mononucleotídeos	TGCATTGAAAAAAAAAAAAAACTGGATC
Dinucleotídeos	TGCATTGTATATATATATATACTGGATC
Trinucleotídeos	TGCATTGTGATGATGATGATGACTGGATC
Tetranucleotídeos	TGCATTGTGACTGACTGACTGACCTGGATC

Figura 2: Representação esquemática dos microssatélites.

Várias funções importantes têm sido atribuídas aos microssatélites como a participação na organização da cromatina (Epplen *et al.*, 1996), na replicação do DNA (Li *et al.*, 2002), na recombinação (Biet *et al.*, 1999) e na expressão gênica (Liu *et al.*, 2001).

Microssatélites são encontrados em muitos genomas, particularmente em eucariotos, sendo também relatados em menor quantidade em genomas procariotos. Localizam-se em maior proporção nas regiões não-codificantes do genoma, mas também ocorrem em regiões codificantes (Toth *et al.*, 2000).

A vantagem da utilização dos microssatélites como marcadores de DNA em relação às outras seqüências é que sua herança é do tipo co-dominante, permitindo a distinção entre homozigotos e heterozigotos; a análise é baseada em PCR (*Polymerase Chain Reaction*), que permite a utilização de pouca quantidade de DNA possibilitando a

amplificação de DNAs degradados e também de qualidade ruim. Todas essas características fazem dos microssatélites ideais para estudos de mapeamento genômico, genética de populações, teste de paternidade, epidemiologia molecular, patologia e conservação de espécies (Chistiakov *et al.*, 2006).

A terceira classe de seqüências repetidas de DNA, as seqüências dispersas no genoma, compreendem dois tipos de elementos denominados Transposons e Retrotransposons. Com o avanço dos projetos de seqüenciamento, os elementos transponíveis estão sendo considerados como o principal representante do genoma de eucariotos. Hoje se sabe que os transposons compõem 15% a 25% do material genético em mosca-de-fruta e mosquito, 35% a 45% em rato e humanos, e 50% a 80% no milho e na cevada (Feschotte, 2004). Devido a grande diversidade de elementos de transposição existente nos diferentes genomas e as diferenças de seqüências nucleotídicas encontradas e, conseqüentemente proteínas produzidas por esses elementos móveis, foi necessária a construção de uma classificação que facilitasse os estudos destas seqüências. Eles são classificados de acordo com sua organização estrutural e mecanismo de transposição. O primeiro tipo são os Retrotransposons ou elementos de classe I que transpõem via transcrição reversa do seu RNA. O segundo tipo são os Transposons ou elementos de classe II que se movimentam-se pelo genoma através de cópias de DNA. Diversas famílias de elementos transponíveis já foram identificadas, por exemplo: *Tc1/mariner* em *C. elegans* e *Drosophila*, *hobo* também em *Drosophila*, *Helitrons* em *Arabidopsis thaliana* e *C. elegans*, elemento *P* em *Drosophila*, *Ac* e *Mu* no milho, e outros.

1.4 Elementos transponíveis e seu papel na evolução do genoma

Com o advento dos projetos de seqüenciamento foi confirmado que muito do DNA repetitivo disperso do genoma dos procariotos e eucariotos é composto por elementos transponíveis, por exemplo, cerca de 40% do genoma em humano é composto por elementos transponíveis (Böhne *et al.*, 2008). Estes elementos são seqüências capazes de se mudar para outro local do genoma por um processo denominado transposição, catalisado por sua própria enzima, a transposase. Através do seu movimento de excisão e inserção, a adição de cópias em outro local do genoma pode causar mutações resultando ou não em mudanças fenotípicas. Essas mutações muitas vezes podem ser favoráveis e acabam portanto contribuindo para aumentar a diversidade existente na natureza, impulsionando a força evolutiva (Charlesworth *et al.*, 2001). Os elementos transponíveis desempenham também um papel fundamental na

estrutura e organização dos cromossomos podendo induzir a formação de rearranjos cromossômicos ou atuando na prevenção de perdas teloméricas (Charlesworth *et al.*, 2001); ainda são responsáveis também por eventos importantes para o desenvolvimento de alguns organismos (regulação genética e epigenética), deixando de lado aquele pré-conceito de serem apenas parasitas genético presentes no genoma (Böhne *et al.*, 2008).

Os elementos transponíveis são caracterizados por repetições terminais invertidas (TIRs – *Terminal Inverted Repeats*) que indicam o fim do elemento, causam duplicação no sítio alvo no momento da inserção e a maioria contem uma região codificante da enzima transposase. Esta enzima é responsável pela mobilidade do elemento de um local para outro (movimento de excisão e inserção).

A identificação e caracterização destes elementos transponíveis, se tornou algo muito importante para o estudo do genoma, já que além de todas essas possíveis funções listadas acima, eles são votados para representar o componente predominante do genoma de eucariotos (FESCHOTTE, 2004). Cerca de 45 a 50% do genoma dos primatas é constituído por elementos transponíveis, o genoma do rato e do camundongo contem cerca de 39 a 40% e o cachorro possui 34% do seu genoma preenchido por estes elementos móveis (Böhne *et al.*, 2008).

Em se tratando dos peixes, uma característica importante do seu genoma é a diversidade de classes de elementos transponíveis encontrada. No genoma dos peixes já foram identificados transposons e retrotransposons (Volff *et al.*, 2003), muitos deles estão presentes também em invertebrados e a maioria provavelmente foi adquirida por transferência horizontal. No peixe medaka 7% do seu genoma é composto por elementos transponíveis (Kasahara *et al.*, 2007). As espécies *Takifugu rubripes* e *Tetraodon nigroviridis*, usados como modelos genéticos devido a compactação do seu genoma (cerca de 12% do genoma humano), contem cerca de 3 a 4% do seu DNA constituídos por transposons (Aparicio *et al.* 2002, Jaillon *et al.* 2004). Ocorre também similaridade de elementos entre peixes e anfíbios. Pelo menos 12 classes de retrotransposons identificados dentro dos peixes também estão presentes em anfíbios (Volff *et al.*, 2003).

Apesar de uma diversidade mais alta, o número de cópias de transposons é aparentemente mais baixo nas espécies de peixes do que em humano e camundongo. Muitas classes de retrotransposons foram perdidas na linhagem dos tetrápodos e hoje se encontram ausentes em camundongos e humanos mas estão sendo mantidas em teleósteos (peixes) (Böhne *et al.*, 2008). Tais eliminações podem ter favorecido, ou podem ter causado, por exemplo, a expansão impressionante no número de cópias de

um número restringido de classes de retrotransposons no genoma de ambos, os camundongos e os humanos.

Além de dados quantitativos sobre os elementos transponíveis presentes nos vertebrados, dados sobre a localização destes elementos mostram-se de suma importância para o estudo da evolução genômica dos vertebrados, visto que, diferença na localização dos elementos transponíveis vem sendo relatada. Neste contexto podemos relatar que em peixes os retrotransposons estão extremamente compartimentalizado e aglomerados nas regiões heterocromáticas dos cromossomos, sugerindo o envolvimento de uma grande pressão de seleção contra a inserção destes elementos em regiões que contenham genes. A inserção em regiões codificantes pode causar mutação e rearranjos desfavoráveis na molécula de DNA. Isso se mostra distinto do que acontece nos mamíferos, onde estes elementos se encontram dispersos nos cromossomos (Volf *et al.*, 2003). Já no genoma do milho os transposons se acumulam entre as regiões gênicas e por fim nas *Drosophilas* estão concentrados na heterocromatina cêntrica e na heterocromatina adjacente à eucromatina de cada braço.

Entender a dinâmica e a evolução destes elementos é algo de extrema importância, pois os elementos transponíveis já vêm encontrando aplicações em técnicas de biotecnologia como a transgenia (DAVIDSON *et al.*, 2003) possibilitando a inserção de genes no DNA de outros organismos usando a sua propriedade de inserção e excisão, aumentando assim a probabilidade de se selecionar aquele indivíduo necessário para melhorar a produção; também estão sendo aplicados em estudos de resistência a doenças ou para a obtenção de biofármacos (ROCHA *et al.*, 2003).

Os elementos transponíveis são divididos em duas principais classes de acordo com seu mecanismo de transposição: elementos que transpõem através de uma cópia de RNA do elemento (retrotransposons ou elementos de classe I) e elementos que transpõem através de uma cópia de DNA (transposons ou elementos de classe II) (Charlesworth *et al.*, 1994).

1.4.1 Retrotransposons

Os retrotransposons utilizam um mecanismo de transposição que é indistinguível da parte do ciclo de vida de um retrovírus. De maneira bem simples, primeiro ocorre a transcrição completa do elemento, dando origem a uma cópia de RNA. Esta molécula codifica uma enzima, a transcriptase reversa, onde a partir desta molécula de RNA pode-se dar origem a uma fita de DNA, originando um intermediário híbrido DNA/RNA. Esta molécula linear de DNA utiliza outra enzima, a integrase, para se

integrar a lugares aleatórios nos cromossomos. Desde que a cópia original do cromossomo seja mantida no mesmo local original, este mecanismo causa uma duplicação, e, este processo, é o responsável pelo grande número de cópias de retroelementos presente no genoma (Böhne *et al.*, 2008).

Os retrotransposons são encontrados em organismos eucariotos e procariotos. Constituem aproximadamente 2% do genoma de *Drosophila* e mais que 40% do genoma de certas plantas, estão presentes ainda nos mais diversos organismos como leveduras, moscas e mamíferos. São votados a serem os principais responsáveis pelo aumento ou diminuição do tamanho dos genomas dos organismos (Feshotte e Prithman, 2007). Eles podem ser divididos em duas categorias dependendo da sua estrutura nucleotídica:

- Non-LTR retrotransposons (*Non long terminal repeat*):

São chamados de Retrotransposons ou retroposons. Não possuem repetições terminais longas (non-LTR) e esta subclasse é dividida em duas superfamílias. A primeira, inclui os elementos que não codificam as proteínas necessárias para a transcrição reversa e tem como principal componente os elementos curtos dispersos chamados de SINEs (*Short Interspersed Nucleotide Elements*). Na segunda estão os LINEs (*Long Interspersed Nucleotide Elements*), elementos que codificam as proteínas necessárias para a transcrição reversa .

Os SINEs formam uma classe de DNAs repetitivos diferenciados de outros DNAs repetitivos com base em sua estrutura e modo de dispersão no genoma. Como esses elementos não apresentam os genes para a produção dos elementos necessários para a sua própria retrotransposição foi proposto que estes elementos utilizam a maquinaria de transposição de elementos do tipo LINE (Smit, 1996). São encontrados nos genomas de eucariotos tão distintos como plantas e mamíferos (Ohshima *et al.*, 1993). O mais abundante SINE em humanos é chamado de *Alu*, assim porque contêm um sítio alvo para a enzima de restrição *Alu*. Tem sido estimado que haja em torno de 1.000.000 cópias da família *Alu* no genoma humano (Biémont e Vieira, 2006). No genoma de outros mamíferos também existe uma quantidade grande de SINEs.

Os elementos LINEs da mesma maneira também são encontrados em uma variedade de organismos incluindo protistas, plantas, insetos, moluscos e vertebrados. No genoma humano essas seqüências correspondem à cerca de 21% do genoma. O elemento L1 é um dos LINEs mais conhecidos do genoma humano, que por sua vez, está presente em aproximadamente cerca de 850.000 cópias que equivale à cerca de 15% do genoma (Lander *et al.*, 2001).

- LTR retrotransposons (*Long terminal repeats*):

São elementos estruturalmente similares aos retrovírus. Possuem longas repetições nucleotídicas nas extremidades 5' e 3'. De uma maneira geral, estas repetições terminais flanqueiam uma região central conhecida por ORFs (*Open Reading Frame*). A ORF denominada *gag*, produz uma poliproteína integrante do capsídeo dos retrovírus. A outra ORF constitui-se do gene *pol* que codifica as enzimas necessárias à transposição do elemento: protease, transcriptase reversa, RNaseH e integrase. A última ORF está presente em algumas famílias desta classe, podendo ou não produzir uma proteína funcional, ela corresponde ao gene *env*, que codifica a proteína do envelope viral nos retrovírus. As LTRs são necessárias para a transcrição e incorporação do elemento no outro local (Böhne *et al.*, 2008). As três principais famílias de retrotransposons LTR descritas em vertebrados são: Ty1/copia, Ty3/gypsy e família BEL (Eickbush e Malik, 2002).

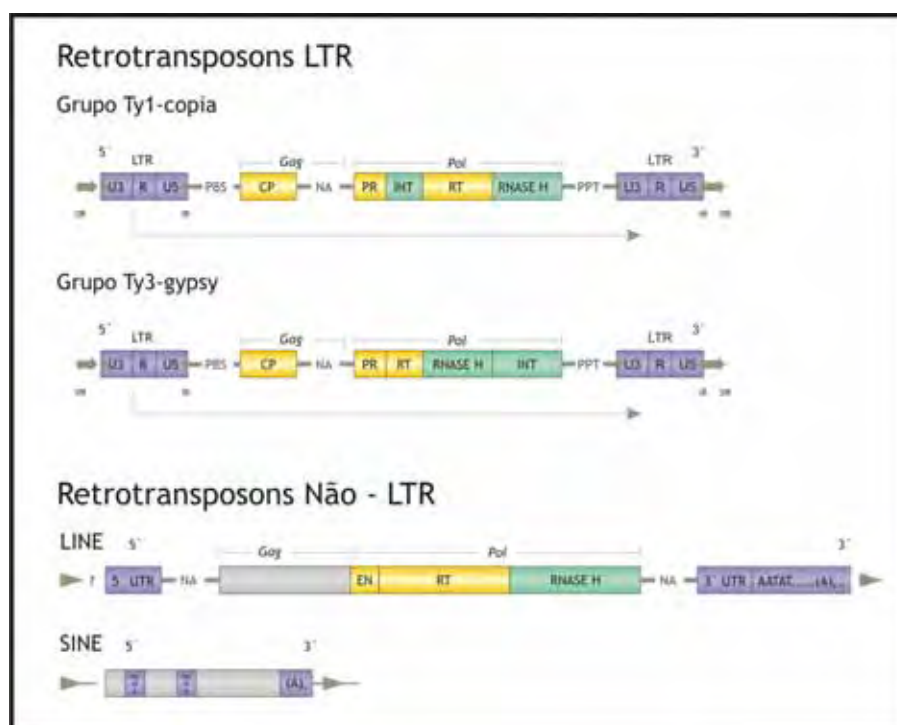


Figura 3 - Diferentes grupos de retrotransposons LTR e Não-LTR. Adaptado: Kumar e Bennetzen, 1999.

1.4.2 Transposons

A segunda classe dos elementos repetidos dispersos são os transposons de DNA. Eles são divididos em subclasses ou famílias de acordo com similaridade entre as suas seqüências e se encontram dispersos pelo genoma de procariotos e eucariotos (Feshotte e Prithman, 2007).

O número de cópias por genoma varia de 10 a milhares dependendo da família do elemento transponível e da espécie analisada (Tarfalla *et al.*, 2006). Vários elementos da mesma família são encontrados em eucariotos diferentes sugerindo que estes divergiram cedo durante a evolução do genoma, antes mesmo da divergência ocorrida entre a linhagem eucarionte (Feschotte, 2004).

O mecanismo de transposição de um elemento pode variar de um elemento para o outro, mas o mecanismo mais conhecido é o “*copy and paste*” onde ocorre a duplicação do elemento obtendo cópia/cópias que se inserem em locais novos. A seqüência inicial se mantém no local original, e portanto a transposição é acompanhada por um aumento no número de cópias do transposon. Pode ocorrer também a transposição não-replicativa onde não ocorre duplicação do transposon, o elemento transponível se desloca diretamente de um local para outro mantendo suas características, mas, este tipo de movimento não favorece um aumento no número de cópias do transposon já que ele é perdido do local original (Lewin, 2004).

Embora alguns transposons usem só um tipo de mecanismo de transposição, outros podem usar várias formas distintas. Os elementos *IS1* e *IS903* usam tanto a forma replicativa e não-replicativa. A escolha do local a ser incorporado o transposon é feita pela transposase, este local pode ser designado ao acaso ou levar em consideração algumas características como, por exemplo, uma seqüência complementar.

Os transposons podem ser classificados em três subclasses. Na primeira subclasse estão aqueles que se movimentam pelo mecanismo de “*copy and paste*”, são os transposons propriamente dito e são reconhecidas dez famílias para tais elementos: Tc1/mariner, haT, elemento P, MuDR/Fokdback, Cacta, PiggyBac, Pif/Harbinger, Merlin, Transib e Banshee. Os elementos da segunda subclasse são chamados de *Helitrons* e o mecanismo pelo qual eles são transpostos é chamado de círculo rolante, estes elementos não possuem repetições terminais invertidas, todavia, são constituídos por curtos *motifs* terminais conservados e cópias autônomas as quais codificam uma proteína chamada de helicase. Os *Mavericks*, também conhecidos como *Polintrons* constituem a terceira subclasse cujo mecanismo de transposição é pouco conhecido. Nos

Maveriks estão presentes longas repetições terminais em sua estrutura, sendo que estes possuem a capacidade de codificar várias proteínas (Feshotte e Prithman, 2007).

Todas essas subclasses e famílias são encontradas nos eucariotos e também nos procariotos, portanto os transposons de DNA divergiram muito cedo na evolução dos organismos (Feshotte e Prithman, 2007).

Durante o seu movimento de transposição esses elementos podem causar mutações afetando a expressão ou alterando a estrutura de genes, e portanto pode levar a uma perda da função deste no organismo (Kappitonov e Jurka, 2007). Embora as maiorias dessas mutações sejam prejudiciais, algumas vezes os transposons podem contribuir para originar diversidade alélica para a criação de novos genes (Feshotte e Prithman, 2007), a principal função dos elementos móveis de DNA é o papel estrutural e funcional desempenhado por estes na evolução genômica dos organismos (Böhne *et al*, 2008).

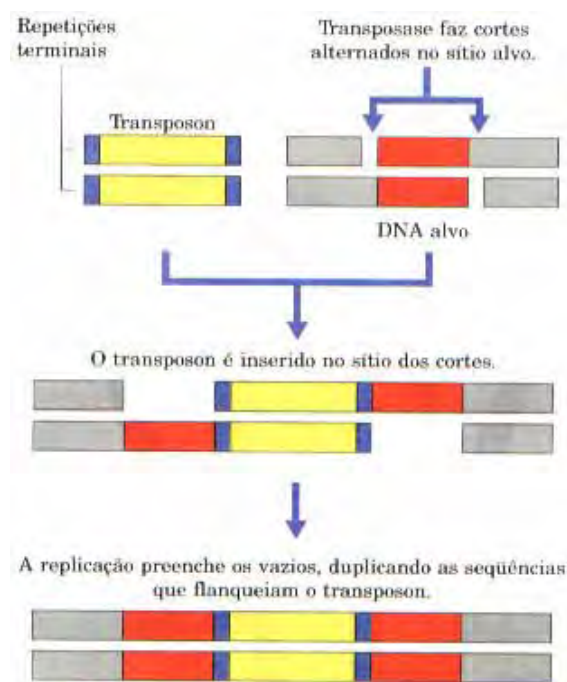


Figura 4: Esquema representativo do movimento de um transposon.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral:

O objetivo deste trabalho foi contribuir para o mapeamento físico do genoma da espécie de ciclídeo *Astronotus ocellatus*, através da técnica de hibridação *in situ* em cromossomos metafásicos utilizando como sondas segmentos de DNA repetidos.

2.2 Objetivos específicos:

a) Isolamento e caracterização de seqüências repetidas de DNA (tranposons, retrotransposons e seqüências resultantes de digestão enzimática) presentes no genoma da espécie *Astronotus ocellatus*;

b) Mapeamento cromossômico da espécie *A. ocellatus* utilizando as seqüências repetidas isoladas;

c) Comparação dos padrões de organização cromossômica dos DNAs repetidos entre *A. ocellatus* e outros peixes.

3. Materiais e métodos

3.1 Material Biológico

Foram analisados no presente trabalho 14 exemplares da espécie *Astronotus ocellatus*, Astronotinae, Cichlidae (Figura 5) provenientes do rio Tiête – SP, sendo 6 machos e 8 fêmeas. Os espécimes foram mantidos em aquário aerado até o momento das preparações cromossômicas e coleta de tecido para extração de DNA. A partir do material coletado foram preparadas suspensões celulares para análises de cromossomos mitóticos sendo também retiradas amostras de tecido (fígado, músculo e nadadeiras) fixadas e estocadas em álcool 100% a -20 °C, para posterior extração de DNA. Os exemplares foram fixados em formol 4% e conservados em álcool 70% para armazenamento no laboratório.



Figura 5: Exemplar de *Astronotus ocellatus*

3.2 Métodos

3.2.1 Extração de DNA de tecidos sólidos

A extração de DNA de tecidos fixados em etanol seguiu basicamente o protocolo apresentado por Sambrook *et al.* (2001) que consiste nos seguintes passos:

- 1 - Em um cadinho, colocar o tecido fixado e uma pequena quantidade de nitrogênio líquido, macerando o material o máximo possível;
- 2 - Acrescentar 5 mL da solução de digestão (NaCl 0,4M; EDTA 0,1M pH 8,0; Proteinase K 100 µg/mL e SDS 0,1%);

3 - Homogeneizar com a solução de digestão, passar o material para tubos Falcon de 15 mL (manter as tampas semi-abertas) e levar ao banho-maria a 50 °C por 4 horas, homogeneizando o material periodicamente;

4 - Acrescentar a cada tubo um volume de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (50:48:2) igual ao da solução homogeneizada. Fechar bem os tubos e agitar suavemente por 30 minutos;

5 - Centrifugar o material a 5.000 rpm por 10 minutos e passar o sobrenadante para um tubo limpo;

6 - Acrescentar NaCl para uma concentração final de 1M e 2 volumes de etanol (100%) gelado e inverter suavemente o tubo para que o DNA precipite;

7 - Centrifugar a 5.000 rpm por 5 minutos, descartar o sobrenadante e acrescentar álcool etílico 70% (3mL) gelado;

8 - Centrifugar novamente a 5.000 rpm por 5 minutos, descartar o sobrenadante e secar o DNA em estufa a 37 °C;

9 - Eluir o DNA em TE (Tris-HCL 10mM, EDTA 1mM) e tratar a amostra com RNase (100 mg/mL) a 37 °C por 1 hora;

10 - Reextrair o DNA com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (50:48:2) e precipitar em NaCl e álcool como já realizado anteriormente. Secar e eluir em TE como descrito anteriormente.

3.2.2 Isolamento de Sequências Repetidas por PCR

Foram testados na espécie *Astronotus ocellatus* primers para amplificar por PCR elementos transponíveis já identificados e caracterizados como conservados nos peixes.

O *primer* Tc1 (5`TAC AGT GCC TTG CAT AAG TAT TCA CC) (Volf *et al.*, 1999,2000,2001) foi aplicado para amplificar o elemento transponível Tc1, através do procedimento de PCR descrito abaixo. A utilização de um único primer para obter o elemento Tc1 está relacionada ao fato deste primer anelar nas repetições invertidas que flanqueiam o elemento.

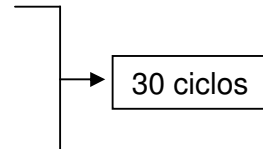
Procedimento para a reação de PCR:

- 1,5 µL do “primer” (10µM)
- 1,0 µL de DNA genômico (100 ng);
- 2,5 µL tampão para Taq DNA polimerase (10X);
- 0,75 µL MgCl₂ (50Mm)
- 4,0 µL de dNTP (8Mm) (dATP, dCTP, dGTP e dTTP);
- 0,5 µL *Taq* DNA polimerase (5U/µL);

- água milliQ q.s.p. 25 µL.

Reação:

- desnaturação inicial com temperatura de 95 °C (5 min.);
- desnaturação com temperatura de 95 °C (1 min.);
- anelamento com temperatura de 55 °C (1 min);
- elongação com temperatura de 72 °C (2 min.);
- extensão final de 72 °C (5min.);
- parar a reação a 4 °C.



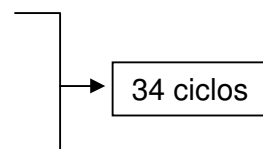
Os retrotransposons *Rex 1* (primers RTX1-F1 5` TTC TTC AGT GCC TTC AAC ACC e RTX1-R3 5` TCC CTC AGC AGA AAG AGT CTG CTC), *Rex3* (primers RTX3-F3 5` CGG TGA YAA AGG GCA GCC CTG e RTX3-R3 5` TGG CAG ACN GGG GTG GTG GT) (Volf *et al.*, 1999,2000,2001) e *Rex6* (primers Rex6-Medf1 5` TAA AGC ATA CAT GGA GCG CCAC e Rex6-Medr1 5` GGT CCT CTA CCA GAG GCC TGGG) (Shimoda *et al.*, 1996) também foram amplificados através da reação de PCR descrita a seguir:

Procedimento para a reação de PCR:

- 0,5 µL de cada “primer” (F e R) (10 µM);
- 1,0 µL de DNA genômico (100 ng);
- 2,5 µL tampão para Taq DNA polimerase (10X);
- 0,75 µL MgCl₂ (50 Mm)
- 0,5 µL de dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) (8 Mm);
- 0,1 µL *Taq* DNA polimerase (5U/µL);
- água milliQ q.s.p. 25 µL.

Reação:

- desnaturação inicial com temperatura de 95 °C (5 min.);
- desnaturação com temperatura de 95 °C (40 seg.);
- anelamento com temperatura de 55 °C (40 seg);
- elongação com temperatura de 72 °C (2 min.);
- extensão final de 72 °C (5min.);
- parar a reação a 4 °C.



Os produtos de PCR obtidos foram analisados em gel de agarose e os fragmentos de DNA obtidos submetidos a clonagem e seqüenciamento.

3.2.3 Clonagem de fragmentos de DNA obtidos por PCR

A clonagem de amostras de DNA (produtos de PCR) foi realizada para a posterior caracterização destes segmentos de DNA. O kit de ligação pGEM-T Easy Vector System I (Promega) foi utilizado para ligação dos fragmentos de interesse ao plasmídeo pGEM-T, seguindo as especificações do fabricante. Posteriormente foi realizada a transformação de células competentes de *Escherichia coli* DH5 α preparadas no próprio laboratório.

Ligação de fragmentos de DNA ao plasmídeo pGEM-T: Em um tubo de 0.5mL, adicionar 2 μ L do inserto de interesse (fragmento de DNA), 1 μ L de T4 DNA ligase, 1 μ L de tampão de reação 10X, 1 μ L do plasmídeo pGEM-T (50ng) e 5 μ L de água destilada autoclavada. Misturar cuidadosamente com uma micropipeta e incubar a reação a 4 °C durante 12-16 horas. Utilizar nas reações de transformação bacteriana.

Transformação de células competentes bacterianas: Colocar 50 μ L de bactérias competentes (acondicionadas a -70 °C) em um tubo de 1.5mL e, posteriormente, adicionar 10 μ L da reação de ligação (inserto-plasmídeo), misturando cuidadosamente com uma micropipeta. Manter o tubo em gelo por 30 minutos. Aplicar um choque térmico, aquecendo o tubo a 37 °C em banho-maria por exatamente 45 segundos. Colocar o tubo imediatamente no gelo e manter por 2 minutos. Adicionar 950 μ L de meio LB líquido (peptona 1%, NaCl 0,17M, extrato de levedura 0.5%, pH 7,5) à temperatura ambiente e incubar a 37 °C por 1 hora, sob agitação a 225 rpm. Centrifugar por 5 segundos a 13.000 rpm e descartar o sobrenadante. Espalhar o produto de transformação em placas de Petri estéreis com meio LB sólido (peptona 1%, NaCl 0,17M, extrato de levedura 0,5%, ágar 1,5%, pH 7,5), contendo 2 μ L de ampicilina (50mg/mL) por mililitro de meio LB e 50 μ L de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-(-D-galactoside) (50mg/mL), para posterior seleção dos recombinantes (colônias brancas). Incubar as placas, com o meio de cultura voltado para cima, em estufa a 37 °C durante 12-16 horas.

A presença de insertos de interesse nos plasmídios recombinantes foi checada por PCR e os clones recombinantes resultantes estocados em glicerol 70% e armazenados em freezer a -80 °C.

3.2.4 Isolamento de Sequências Repetidas por Restrição Enzimática

Foi realizada a fragmentação do DNA genômico por restrição enzimática para a isolamento e identificação de sequências repetitivas de DNA. A presença de sítios de restrição em sequências altamente repetitivas de DNA faz com que bandas sejam formadas em gel de agarose após digestão do DNA genômico. O DNA presente nestas bandas pode ser isolado, clonado e caracterizado. Utilizamos diversas enzimas de restrição disponíveis comercialmente, seguindo o procedimento a seguir:

- 1 - Colocar em um tubo eppendorf de 1,5 mL 8 ug de DNA genômico; 10U da enzima a ser utilizada; tampão de digestão 1X.
- 2 - Incubar em banho-maria a 37 °C durante 14 horas.
- 3 - Para precipitação e purificação do DNA digerido, acrescentar 2µL de NaCl 5M gelado e 2 volumes de etanol (100%) gelado, agitar levemente e colocar em freezer a 70 °C negativos por 1 hora;
- 4 - Centrifugar a 13.000 rpm por 10 minutos a 4 °C;
- 5 - Descartar o sobrenadante e acrescentar 300µL de etanol 70% gelado;
- 6 - Centrifugar a 13.000 rpm por 5 minutos a 4 °C;
- 7 - Descartar o sobrenadante, deixar secar a temperatura de 37 °C por aproximadamente 15 minutos e ressuspender em seguida em 20 µL de água MiliQ estéril.
- 8 - Fracionar as amostras de DNA digerido através de eletroforese em gel de agarose 0,8% objetivando identificar a presença de bandas que serão purificadas para posterior clonagem e seqüenciamento.

3.2.5 Purificação de fragmentos DNA de gel de agarose

A purificação dos fragmentos de DNA de interesse de gel de agarose foi realizada, para posterior clonagem destes, utilizando o kit GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare Amersham Biosciences), seguindo as especificações do fabricante, conforme descrito a seguir.

Purificação de DNA de gel de agarose: Pesar um tubo de 1,5mL vazio e anotar o peso. Cortar a banda de interesse do gel de agarose, previamente corado com brometo de etídio, sob transiluminador ultravioleta, e colocá-la no tubo. Cortar o pedaço de gel em vários pedaços menores, utilizando uma tesoura ou uma pinça. Pesar novamente o tubo e calcular o peso do fragmento de agarose. Adicionar 10µL de “Capture Buffer” para cada 10mg de gel e misturar em vortex. Incubar a 60 °C em banho-maria até que a

agarose dissolva completamente (5-15 minutos). Centrifugar brevemente o tubo e coletar, com uma micropipeta, a amostra de agarose dissolvida. Transferir a amostra para uma Coluna GFX colocada em um tubo coletor e incubar à temperatura ambiente por 1 minuto. Centrifugar o tubo coletor com a Coluna GFX a 10.000 rpm por 30 segundos. Descartar o líquido do tubo coletor e colocar a Coluna GFX novamente no tubo coletor. Adicionar 500µL de “Wash Buffer” à Coluna GFX e centrifugar a 10.000 rpm por 30 segundos. Descartar o tubo coletor e transferir a Coluna GFX para um novo tubo de 1,5mL. Aplicar 50µL de tampão de eluição TE (Tris-HCl 10mM pH 8.0; EDTA 1mM pH 8.0) diretamente sobre a fibra de vidro da Coluna GFX. Incubar a amostra à temperatura ambiente por 1 minuto e centrifugar a 10.000 rpm por 1 minuto para recuperar o DNA. Estocar o DNA purificado a -20 °C. Estimar a concentração do produto final através de eletroforese em gel de agarose ou em espectrofotômetro.

3.2.6 Clonagem das seqüências obtidas por restrição enzimática.

Todos os fragmentos de DNA isolados através de restrição enzimática foram inseridos em vetores plasmidiais e utilizados para transformar bactérias competentes através do Kit *pMos Blue* (Amersham Biosciences):

Reação de ligação

- 1 - Preparar uma reação de Pk em tubo eppendorf com 2,5µL de H₂O mili-Q, 1 µL do tampão pK 10X, 0,5 µL de DTT 100 mM e 5 µL do produto a ser clonado;
- 2 - Incubar a 22 °C por 40 minutos;
- 3 - Aquecer a reação à 75 °C por 10 minutos e colocar no gelo por 2 minutos;
- 4 - Acrescentar ao produto da reação de Pk 1µL (50ng/µL) do vetor pBluescript II KS+ e 1µL (4U) de DNA ligase;
- 5 - Incubar por um intervalo de 2 a 16 horas a 22 °C;
- 6 - Guardar em freezer a 20 °C negativos até a transformação em bactérias competentes.

Transformação de bactérias competentes *Escherichia coli* DH5α com os vetores plasmidiais recombinantes.

- 1 - Pipetar 20µL de células de células competentes em um tubo Eppendorf;
- 2 - Adicionar 4µL do produto obtido na ligação às células competentes, misturar suavemente;
- 3 - Incubar as células no gelo por 30 minutos;

-
- 4 - Dar um choque térmico nas células por exatos 40 segundos no banho-maria a 42 °C e colocar no gelo por 2 minutos;
 - 5 - Adicionar 80µL de meio SOC (incluído no Kit) em cada tubo;
 - 6 - Colocar para agitar a 150 rpm por uma hora a 37 °C;
 - 7 - Espalhar 30µL de X-gal 2%, e 20µL de IPTG em cada placa de meio de cultura sólido contendo ampicilina (50µL/mL), para a seleção dos clones recombinantes; Plaquear as bactérias e incubar a 37 °C *overnight*.

3.2.7 PCR para confirmação da presença de insertos

Para verificar a presença de insertos de interesse nos clones obtidos, as colônias brancas (potencialmente portadoras do inserto de interesse) foram repicadas em meio sólido LB e submetidas a reações de amplificação (PCR). Os primers M13F e M13R possuem homologia nas regiões que flanqueiam o local de inserção do fragmento no plasmídeo e, portanto, foram utilizados na reação, seguindo o protocolo:

PCR para confirmação da presença de insertos: Em um tubo de 0.5mL adicionar uma fração de DNA obtido diretamente da colônia com auxílio de um tip, 2,5µL de tampão de PCR (10X), 0,5µL de dNTPs (8Mm), 0,5µL de primer M13F (5'-AGCGGATAACAATTTTCACACAGG-3') (10uM), 0,5µL de primer M13R (5'-CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG-3') (10uM), 0,1µL DNA polimerase (5U/µL) e 20,15 µL de água estéril, totalizando um volume final de 25µL. Realizar as reações de amplificação em termociclador com o seguinte programa: um ciclo inicial de 95 °C por 3 minutos, para desnaturação, seguido de 34 ciclos a 95 °C por 30 segundos, 50 °C por 1 minuto para anelamento dos primers, 72 °C por 2 minutos, estendendo a cadeia e, finalmente, uma elongação final a 72 °C por 5 minutos. Analisar os resultados através de eletroforese em gel de agarose.

3.2.8 Eletroforese em gel de agarose

Alíquotas dos produtos de reação de amplificação através de PCR ou digestão enzimática foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose 1%, conforme protocolo descrito por Sambrook & Russel (2001):

Eletroforese em gel de agarose: Diluir a agarose em um volume apropriado de tampão TAE 1X (Tris-Ácido acético-EDTA) para que o gel fique em uma concentração de 1%. Aquecer a solução até que esta fique translúcida. Deixar a solução esfriar um pouco e

aplicar no suporte da cuba de eletroforese horizontal. Ajustar o pente na cuba e deixar a solução de agarose polimerizar. Preencher a cuba de eletroforese com tampão TAE 1X. Aplicar as amostras no gel, utilizando 3µL de tampão de aplicação. Realizar a eletroforese a 110V/150A. Corar o gel em solução de brometo de etídio (10mg/mL) diluída a 0.1% em tampão TAE 1X.

Os géis de agarose foram posteriormente visualizados em transiluminador, sob luz ultravioleta, e a foto-documentação destes realizada com o programa computacional EDAS (Electrophoresis Documentation and Analysis System 120 - Kodak Digital Science 1D). Os pesos moleculares dos fragmentos amplificados foram estimados através de comparação com um marcador de peso molecular conhecido, 1Kb Plus DNA Ladder - Invitrogen Life Technologies.

3.2.9 Seqüenciamento do DNA

O seqüenciamento nucleotídico dos clones de interesse foi realizado utilizando o kit BigDye Terminator Cycle Sequencing (Perking-Elmer) e o seqüenciador automático ABI Prism 3100 DNA Sequencer (Perking-Elmer), seguindo as especificações dos fabricantes, como descrito a seguir:

Seqüenciamento: Preparar a reação de seqüenciamento contendo 2µL de pré-mix (fornecido no kit), 2µL do produto purificado e 1µL de “primer” (10µM). Realizar as reações em termociclador seguindo o programa: desnaturação inicial a 96°C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos com desnaturação a 96°C por 45 segundos, hibridação a 50°C por 30 segundos e extensão a 60°C por 4 minutos. Adicionar às amostras 2µL de acetato de sódio 4,5mM e 80µL de etanol 95%. Centrifugar a 14.000 rpm durante 20 minutos a 20 °C. Remover o sobrenadante e adicionar 400µL de etanol 70%. Centrifugar novamente a 14.000 rpm durante 10 minutos. Remover o sobrenadante e manter o material em estufa a 37 °C por 1 hora, protegido da luz. Dissolver as amostras em solução de formamida e “blue dextran” (Formamide Loading Dye 5:2). Limpar a placa dupla de vidro com álcool, em que será colocado o gel de poliacrilamida. Colocar o pente na placa de vidro para formar os sulcos onde serão aplicadas as amostras de DNA. Colocar a placa em um forno de luz ultravioleta, inserir o gel de poliacrilamida com uma seringa, na placa dupla de vidro. Ligar a luz ultravioleta durante 3 minutos para polimerizar a poliacrilamida. Limpar novamente a placa de vidro, para evitar erros de leitura no seqüenciamento. Colocar o gel no seqüenciador automático e encher as

cubas superior e inferior do seqüenciador com tampão TBE 1X (Tris-Ácido bórico-EDTA). Desnaturar as amostras de DNA a 80 °C por 4 minutos, em termociclador, e colocá-las imediatamente em gelo. Determinar a voltagem (1.400V) e a intensidade do laser de leitura das bases (100) no programa computacional e identificar as linhas de leitura com o número correspondente das amostras. Aplicar 2µL de cada amostra em sua linha correspondente no gel. Iniciar a corrida do gel e realizar a leitura dos resultados.

As seqüências foram processadas retirando-se as regiões dos plasmídios e uma busca por similaridades foi realizada através do sistema de pesquisa Blastn (Altschul *et al.*, 1990) do National Center for Biotechnology Information (NCBI), website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). As seqüências obtidas foram alinhadas *online* utilizando-se o programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1994), website <http://www2.ebi.ac.uk/clustalw> e o alinhamento produzido checado manualmente.

3.2.10 Obtenção dos cromossomos mitóticos através de preparações diretas

Os cromossomos mitóticos foram obtidos de acordo com a metodologia adaptada para peixes por Bertollo *et al.* (1978), descrita a seguir:

1. Injetar intraperitonealmente colchicina 0,0025% na proporção de 0,1 mL para cada 100 g de peso do animal;
2. Deixar o peixe em aquário bem aerado por 40 minutos. Em seguida sacrificá-lo e retirar a porção anterior do rim transferindo-a para uma solução hipotônica de KCl 0,075 M (6-8 mL);
3. Divulsionar bem o tecido com o auxílio de uma seringa de vidro. Retirar o sobrenadante (suspensão celular) com o auxílio de uma pipeta Pasteur e colocar em tubo de centrifuga;
4. Incubar a suspensão celular obtida em estufa a 37 °C por 23 minutos;
5. Pré-fixar com 6 gotas de metanol:ácido acético (3:1) e ressuspender o material pipetando bem devagar por 100 vezes;
6. Deixar descansar por 5 minutos, adicionar fixador até encher o tubo e ressuspender;
7. Centrifugar por 10 minutos a 800 rpm. Desprezar o sobrenadante e completar para 6 mL com fixador pipetando por mais 100 vezes;
8. Centrifugar por 10 minutos a 1000 rpm, desprezar o sobrenadante e completar novamente para 6 mL de fixador, repetindo essa lavagem por mais duas vezes;

-
- 9 - Após a última lavagem, diluir o material acrescentando fixador, de forma que este apresente um aspecto um pouco turvo;
 - 10 - Preparar as lâminas que deverão estar previamente aquecidas em banho-maria a 60 °C.

3.2.11 Protocolo para a obtenção de seqüências repetidas por DOP-PCR

- 1 - Centrifugar uma pequena amostra do DNA genômico, descartar o sobrenadante e deixa secar completamente.
- 2 - Ressuspender o material genético com o Mix de PCR (10µL de água ultra pura, 2µL de 10X Thermosequenase reaction buffer, 4µL de dNTP (2.5 mM) e 2µL de primer DOP (5`CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G3`) (25µM)).
- 3 - Incubar por 15 minutos a 95 °C para desnaturar as proteínas presentes.
- 4 - Adicionar Thermosequenase (8U), ou outra DNA polimerase de alta fidelidade.
- 5 - Utilizar o termociclador para amplificação com o seguinte programa: (1) 95 °C por 3 minutos; (2) 94 °C por 1,5 minutos; (3) 30 °C por 3 minutos; (4) ramp para 72 °C aproximadamente 0,2 °C por segundo; (5) 72 °C por 30 segundos; (6) repetir os passos 2 a 5, 10 vezes; (7) 94 °C 1,5 minutos; (8) 56 °C 1,5 minutos; (9) 72 °C 1,5 minutos; repetir os passos 6 a 8, 35 vezes.

3.2.12 Hibridação *in situ* por fluorescência – FISH

Preparação da sonda: Marcação da sonda: método de nick translation utilizando o Kit BioNick™ Labeling System (Invitrogen).

Mix para uma lâmina: 1µL de DNA (200ng/µL); 1µL de dNTP mix; 1µL de enzima mix; H₂O para completar 9µL.

- 1 - Misturar bem, centrifugar brevemente e incubar por 30 minutos a 16 °C (no termociclador);
- 2 - Parar a reação com a adição de 1µL de Stop Buffer;
- 3 - Acrescentar 1/10 do volume (1µL) de acetato de Sódio 3M e o dobro do volume (22µL) de etanol 100% gelado;
- 4 - Misturar invertendo o tubo, centrifugar rapidamente e colocar no freezer – 70 °C por 1 hora;
- 5 - Centrifugar por 15 minutos a 15.000 rpm a 4 °C;
- 6 - Descartar o sobrenadante e adicionar 50µL de etanol 70% gelado;

-
- 7 - Centrifugar por 5 minutos a 15.000 rpm a 4 °C;
 - 8 - Descartar o sobrenadante com cuidado e deixar secar;
 - 9 - Ressuspender em 6µL de água Milli Q.

Preparação cromossômica: Use lâminas recém preparadas, ou descongelar as lâminas em temperatura ambiente uma hora antes do uso. Desidratar as lâminas em álcool 70, 85 e 100% gelados, por 5 minutos cada.

Desnaturação dos cromossomos

- 1 - Preparar 60mL de formamida 70% em concentração final de 2xSSC, pH 7,0 a 67 °C.
- 2 - Verificar temperatura e pH.
- 3 - Desnaturar as lâminas por 2 min (dependendo da qualidade do material).
- 4 - Desidratar em série alcoólica gelada, 70, 80 e 100%, 2 minutos cada.

Solução de hibridação

- 1 - Em um tubo Eppendorf contendo 6µL da sonda adicionar 15µL de formamida (concentração final 50%), 6µL de sulfato de dextrano 50% (concentração final 10%) e 3µL de 20xSSC (concentração final de 2xSSC).
- 2 - Desnaturar a sonda a 95 °C por 5 minutos e passar imediatamente ao gelo.

Hibridação

- 1 - Colocar 30µL de solução de hibridação sobre a lamínula e inverter a lâmina sobre a lamínula.
- 2 - Manter as lâminas com o material voltado para baixo em câmara úmida (2xSSC) a 37 °C *overnight*.

Lavagem pós-hibridação

- 1 - Remova a lamínula.
- 2 - Lavar em 2xSSC, pH 7,0 a 72 °C, em banho sem agitação, por 5 minutos.
- 3 - Transferir para PBD a temperatura ambiente para proceder à detecção.

Detecção

1. Aplicar 40µL de FITC-Avidina (40µL de Tampão C + 0,1µL de avidina-FITC 0,07%) sobre a lamínula, e inverter a lâmina sobre a lamínula. Incubar 5 minutos em câmara úmida a 37 °C.
2. Remover a lamínula e lavar 3 vezes em 1XPBD a 45 °C, por 2 minutos.
3. Aplicar 40µL de anti-avidina (2µL de anti-avidina estoque em 38 µL de 1XPBD), sobre uma lamínula, e inverter a lâmina sobre a lamínula. Incubar 5 minutos em câmara úmida a 37 °C.
4. Remover a lamínula e lavar 3 vezes em 1XPBD a 45 °C, por 2 minutos.

-
5. Aplicar 40µL de FITC-Avidina (40µL de Tampão C + 0,1µL de avidina-FITC 0,07%) sobre a lamínula, e inverter a lâmina sobre a lamínula. Incubar 5 minutos em câmara úmida a 37 °C.
 6. Remover a lamínula e lavar 3 vezes em 1XPBD a 45 °C, por 2 minutos.
 7. Montar a lâmina com 20µL de antifade + 0,7 de iodeto de propídio (50µg/mL) e cobrir com lamínula. Guardar a +4 °C por poucos dias, ou então a -20 °C permanentemente antes ou após a análise.

Processamento das imagens

Os cromossomos metafásicos mitóticos foram analisados em um fotomicroscópio de fluorescência Olympus BX 61. As imagens foram capturadas através de uma câmera digital (Olympus DP70) e do programa Image-Pro MC 6.0 e processadas através do programa Adobe Photoshop.

4. Resultados e Discussão

4.1. Isolamento e caracterização de seqüências repetidas do genoma de *Astronotus ocellatus* por restrição enzimática

Segmentos de tecidos (nadadeira, fígado, brânquias) fixados em álcool foram submetidos à extração de DNA de acordo com Sambrook *et al.* (2001), obtendo-se uma boa quantidade de DNA genômico de excelente qualidade para a realização dos trabalhos (Figura 6).

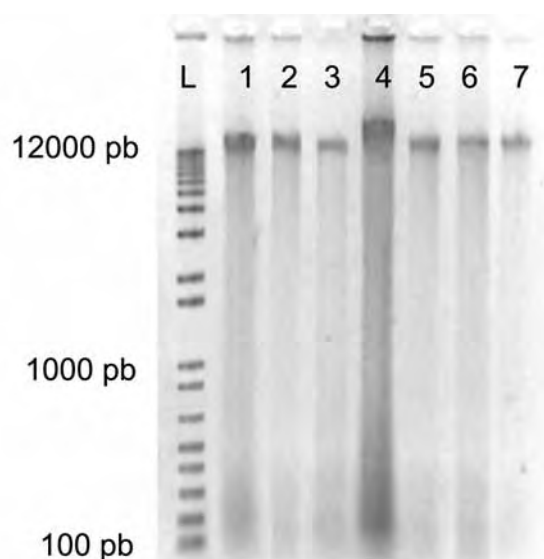


Figura 6: Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio para observação das amostras de DNA genômico.

L – marcador de peso molecular; 1-7 indivíduos da espécie *Astronotus ocellatus*.

Amostras de DNA genômico foram submetidas à fragmentação por restrição enzimática para a identificação e isolamento de seqüências repetidas de DNA. Foram utilizadas as enzimas *HaeIII*, *HindIII*, *MspI*, *PvuI*, *XbaI* e *HinfI*. As enzimas *HinfI* e *HaeIII* permitiram identificar bandas mais evidentes com aproximadamente 280 pares de bases (Figura 7). Com a enzima *HinfI* também foi observada uma segunda banda de tamanho maior, com aproximadamente 1.600 pares de bases (Figura 7).

As bandas de menor tamanho geradas pelas duas enzimas foram purificadas com o kit GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification e inseridas em vetores de clonagem por meio do kit *pMOS* e a construção recombinante resultante utilizada para transformar bactérias *Escherichia coli*. A banda de maior tamanho observada com a digestão da enzima *HinfI* também foi submetida à técnica de purificação e clonagem, porém, não

foram obtidos clones positivos, provavelmente por se tratar de um fragmento de DNA muito grande que dificulta sua inserção em vetores plasmidiais.

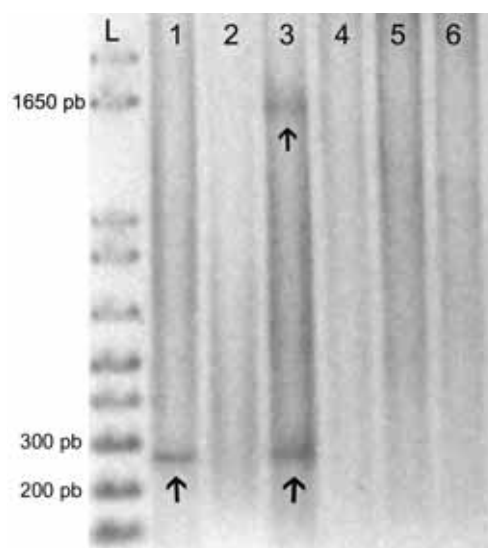


Figura 7: Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo para visualização da digestão utilizando as enzimas *HaeIII* (1), *HindIII* (2), *HinfI* (3), *MspI* (4), *PvuII* (5), *XbaI* (6).

L – marcador de peso molecular.

↑ - bandas com prováveis seqüências de DNA repetido.

Os clones recombinantes foram submetidos à técnica de PCR utilizando *primers* *M13F* e *M13R* que flanqueiam a região de inserção do fragmento no plasmídio para a confirmação da presença dos insertos. O produto de PCR gerou fragmentos em torno de 450 pares de bases (pb) para a banda menor resultante da digestão da enzima *HinfI*, e para o fragmento resultante da digestão com a enzima *HaeIII* (Figuras 8 e 9). Os clones positivos resultam em fragmentos maiores que o tamanho da banda isolada, visto que os *primers* amplificam também pequenos segmentos dos plasmídios que as flanqueiam.

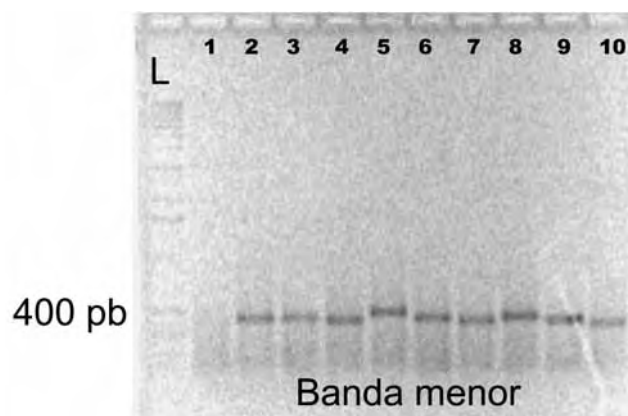


Figura 8: Eletroforese em gel de agarose 1% para observação de produto de PCR dos clones positivos (banda menor) oriundos da digestão com a enzima *HinfI*.

L – marcador de peso molecular.

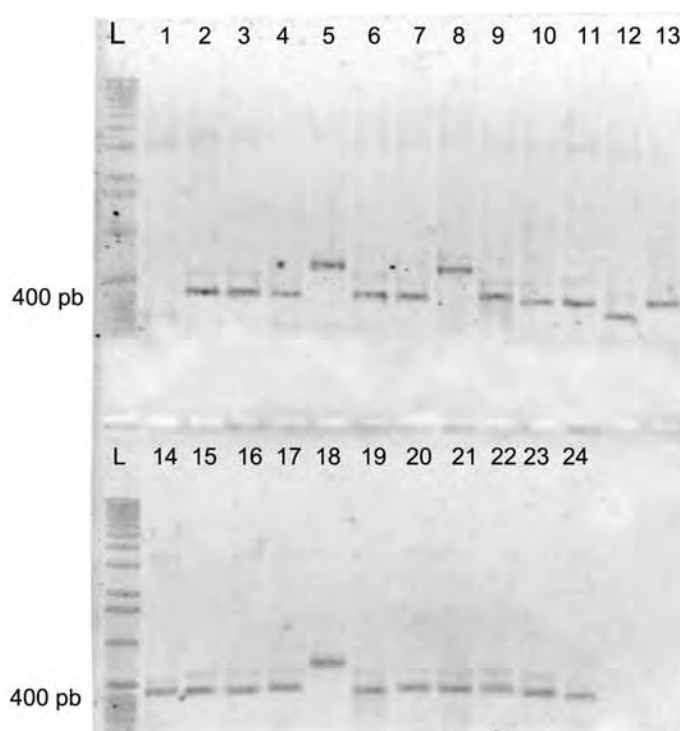


Figura 9: Eletroforese em gel de agarose 1% para observação de produto de PCR dos clones positivos oriundos da digestão com a enzima *HaeIII*.

L – marcador de peso molecular

Os clones positivos foram denominados *AoHinfI* e *AoHaeIII* e foram submetidos ao processo de seqüenciamento, sendo a seqüência nucleotídica obtida para 13 clones (Figura 10). As seqüências de DNA obtidas foram analisadas no banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information) através do programa BLAST/N

(Altschul *et al.*, 1990) para a busca de seqüências similares às seqüências isoladas. A Tabela 01 agrupa as principais seqüências e suas características:

```
>AoHaeIII-2
CCTTATCTCGGCGAGAAAAGCTCGAGAGTCACATAAAAAGACGTGCCGCTTAAGGCGCTCCTTTCTCGGT
GTGACAAGTTTCTGCGCACCGCTAAACTGTATCTTGACATCCTCTGTTGAAACAAGCATTAATTCTAAAA
GTAACACACTGGGACACAGTGTCTGTGCTTGGAACATAAGGGGATTGAGGAAACATGATGTGCATGCATG
TTTTGAAGCAGTTTGAACAAAGTGTGTGAAATTACACGCAGACGCTCAGAAATGG

>AoHaeIII-3
CCTTATCTCGGCGAGAGAAGCTTCGAGAGTCACATAAAAAGATGTGCCGCTTAAGGCGCTCCTTTCTCGN
GTGTGACAAGTTTCTGCGCACCGCTAAAGTGGTATCTTGACAGCCTCTGTTGAGACAAGCATTAATTCTC
AAAGTAAGACACAGGGACACAGTGTCTGTGCTTGGAACATAAGGGGATTGAGGAAACATGATGTGCATG
CATGTTTTGAAGCAGTTTGACCAAAGTGTGTGAAATTACACGCAGACGCTCAGAAATGG

>AoHaeIII-5
CCTTATCTCGGCGAGAAAAGCTCGAGAGTGCCATAAAAAGACGTGCCGATTAAAGGCGCTCCTTTCTCGGT
GTGACAAGTTTCTGCGCACCGCTAAACTGTATCTTGACATCCTCTGGTGAAGACAAAGCATTAATTCTC
NAAAAAACACACAGGGGACACAGTGTCTGTGCTTGGAACATAAGGGGATTGAGAAACATGATGTGCATG
CATGTTTTGAAGCAGTTTGAACAAAGTGTG

>AoHaeIII-6
CCTTATCTCGGCGAGAAAAGCTCGAGAGTCACATAAAAAGACGTGCCGCTTAAGGCGCTCCTTTCTCGGT
GTGACAAGTTTCTGCGCACCGCTAAACTGTATCTTGACATCCTCTGTTGAAACAAGCATTAATTCTAAAA
GTAACACACTGGGACACAGTGTCTGTGCTTGGAACATAAGGGGATTGAGGAAACATGATGTGCATGCATG
TTTTGAAGCAGTTTGAACAAAGTGTGTGAAATTACACGCAGACGCTCAGAAATGG

>AoHaeIII-9
CCCCAGTCCGCGAGATCTTCAACTCCCACCTCCGGCAGAACTTCGACAGCATTCCGAGGGAGGCTGAGGA
CATTGAGTCTTGAATGGACCATGTTCCGCACCTCCATTGTTGAGGCTGCTGCTGACAGCTGTGGCTGCAA
GGTGGTTGGTGCCTGTCGCGGTGGTAATCCCCGAACCAGATGGTGGTCACCCGGAGGTGAAGGGAGCCAT
CAAGCTGAAGAAGGAGTCTATCGGGCTGGTTAGCCTGTGGAACCCCGAAGCAGCTGACCGGTACCCGG
CAG

>AoHaeIII-15
CCATGGATAAAGACTTTTCGGATGTCCTTGAAGCAATTCTGGCAAACCCGTCAGGCAACTCAGGAGGAGAA
AGTGGTGCTTTACTCACACAGTCTATAGTGCGGGTTGGGCGCTGCTGACTTCAACTGAGGCTATAGTCAG
GTGGTGAATAAATACTTCAAGGACCTCCTTAATCCCACTGACATGCCTTCTGTAGTGAAGCAGAGTCT
GGGGGTGAGGGGGATGACTCCCCATCACGGGGTGAGGTCACTGAGGTGGTTAAACGTTTCCGGAANGNC
AGNGTCN

>AoHaeIII-16
TTATCTCGGCGAGAAAAGCTCGAGAGTCACATAAAAAGACGTGCCGCTTAAGGCGCTCCTTTCTCGGTGT
GACAAGTTTCTGCGCACCGCTAAACTGTATCTTGACATCCTCTGTTGAGACAAGCATTAATTCTCAAAAA
AACACACTGGGACACAGTGTCTGTGCTTGGAACATAAGGGGATTGAGGAAACATGATGTGCATGCATGTT
TTGAAGCAGTATTGAACAAAGTGTGTGAAATTACACGCAGACGCTCAGAAATGGATCCATATTACTAGTT
A

>AoHaeIII-17
CCAGATCTTCATTAAGGTAGCCCATATATCAGTCTAAATAATGTACATCTGGAATGCAGTTCACAAAC
AATGCTGTTGGATCTAAAAGTTGGCAACCCCAATCACCAGTATCACCAGTTAGCTAGTGAGTTATTAAA
GAGTCAAGGGTACATTTGGTACATTTAAACCGCATGATTTTAACAAGATAAAACACACCCTCAGCCATGC
ACAGGCTATCTGACCAAGGACAGTGACGTGTGCTGCATCAGATGATCTGG
```

Figura 10: Seqüências nucleotídicas dos clones positivos (*AoHaeIII* e *AoHinfI*).

>AoHaeIII-24
CCTTATCTCGGCGAGAAAAGCTCGAGAGTCACATAAAAAGACGTGCCGCTTAAGGCGCTCCTTTCTCGGT
GTGACAAGTTTCTGCGCACCGCTAAACTGTATCTTGACATCCTCTGTTGAAACAAGCATTAATTCTAAAA
GTAACACACTGGGACACAGTGTGCTGCTTGGAACTATAAGGGGATTGAGGAAACATGATGTGCATGCATG
TTTTGAAAGCAGTTTGAACAAAGTGTGTGAAATTACACGCAGACGCTCAGAAATGG

>AoHinfI-2R
ATTCAAACCCAGGACCTTCTAGCTGTGAGGCAACCGTGCTGACAACCGTGCCGCCCCAAAATGAAAAAGCA
AATTATAAAAAAATAATAATAATTTTGCAGATAAAGAAGTTTTTCTTTGCACTGTAATATTATAATCTT
TTATGGCTATCATATATATNTACAGCCTGCTCTTTTTTTCTGANAGCCTCAAANAACCTCTGTGGTTATT
TATTTACTCACTTNGGTGTTTTCTTCTTTAGGAAT

>AoHinfI-4R
ACTCTGNGGTTTANCTCTCAGANGCGCAGNTTAAAGCANATANCCCGTAAGCTGGANAGGAAATGGNGTC
TACTAATTTATAAGATGCTCATTTATCCTGGAANAAGAGTTNTTTGNTCNATAAAAAGCCNCCGTACA
GCANGGACATCTTACTGATTCTCANAATAGAAGAAAATAAGAACANCCCCGGGTTTGTTCAGCTCTG
TANCCACGCTGACAAANAGT

>AoHinfI-8R
GTCACATAAAAAGACGTGCCGCTTAAGGCGCTCCTTTCTCGGTGTGACAAGTTTCTGCGCACCGCTAAAC
TGTATCTTGACATCCTCTGTTGAGAAAAGCATTAATTCTCAAAGTAACACACAGGGACACTGTGTGCTGC
TTGGAACATAAGGGGATTGAGGAAACATGATGTGCATGCATGTTTTGAAGCAGTTTGAACAAAGTGTGT
GAAATTACACGCAGACGCTCAGAAATGGCCTTATCTCGGCGAGAAAAGCTCGAGAGT

>AoHinfI-10R
CGCACCGCTAAACTGTATCTTGACATCCTCTGTTGAAACAAGCATTAATTCTAAAAGTAACACACTGGGA
CACAGTGTCTGCTTGGAACTATAAGGGGATTGAGGAAACATGATGTGCATGCATGTTTTGAAGCAGTTT
GAACAAAGTGTGTGAAATTACACGCAGACGCTCAGAAATGGCCTTATCTCGGCGAGAAAAGCTCGAGAGT

Figura 10 continuação: Seqüências nucleotídicas dos clones positivos (*AoHaeIII* e *AoHinfI*).

Tabela 01: Principais clones obtidos por restrição enzimática e suas características.

Clones	N de acesso GeneBank*	Similaridade %	Similaridade encontrada
<i>AoHaeIII</i> -2 <i>AoHaeIII</i> -3 <i>AoHaeIII</i> -5 <i>AoHaeIII</i> -6 <i>AoHaeIII</i> -16 <i>AoHaeIII</i> -24	AJ 270048 CT971502 [#] CR847973 [#] AL663117 [#] AL160033 [#]	100% 92% 92% 96% 92%	Curta seqüência de 20 pb com similaridade a DNA satélite centromérico de <i>Tetraodon nigroviridis</i> . [#] Curtas seqüências dispersas em outros organismos como peixes, roedores e humanos
<i>AoHaeIII</i> -9 <i>AoHaeIII</i> -15	AF 125982 AY 298859 AJ621035	75% 80% 78%	Retrotransposon <i>Rex3</i> , gene da transcriptase reversa de <i>Xiphophorus maculatus</i> Seqüência completa do <i>Rex3</i> retrotransposon, <i>Rex2</i> retrotransposon, e <i>Rex1</i> retrotransposon de <i>Xiphophorus maculatus</i> . <i>Tetraodon nigroviridis</i> non-LTR retrotransposon <i>Rex3</i>

	CU302436 [#] CU570883 [#] CU041413 [#]	76% 75% 74%	[#] Vários clones dispersos no genoma de Zebrafish
<i>AoHaeIII-17</i>	EF 685957	76%	<i>TcI</i> -like transposon de <i>Salmo salar</i>
<i>AoHinfI-2</i>	BX 276115 CR933017 CR 407702 AC195119 AC146540	87% 100% 85% 84% 86%	Seqüências repetidas dispersas em vários peixes, principalmente “zebrafish” e <i>Gasterosteus aculeatus</i> .
<i>AoHinfI-4</i>	BX005402 AB 270897 AJ 459419 DQ386647	95% 83% 81% 75%	Seqüências repetidas dispersas de vários peixes incluindo ciclídeos (tilápia), takifugo, linguado e “zebrafish”.
<i>AoHinfI-8</i> <i>AoHinfI-10</i>	AJ 270048 CR847973 [#] CR388171 [#] CT971502 [#]	95% 92% 93% 92%	DNA satélite centromérico de <i>Tetraodon nigroviridis</i> , clone COAA010CA04A1. [#] Clones de seqüências dispersas de zebrafish.

*código de identificação das seqüências no GeneBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) que possuem similaridade às seqüências isoladas.

A comparação das seqüências isoladas neste trabalho com as seqüências depositadas no GeneBank mostrou alta similaridade com diversas classes de seqüências repetidas de outros organismos, principalmente espécies de peixes. Vários clones isolados apresentaram similaridade com transposons, retrotransposons e seqüências de microsátélites. Isto reflete a abundância destas seqüências, como observado em diversos genomas eucariontes.

Entre as seqüências isoladas, merecem destaque às seqüências *AoHaeIII-2*, *3*, *5*, *6*, *16* e *24* que apresentam similaridade a um DNA satélite centromérico de *Tetraodon* e aparentemente se mantêm conservado no genoma de *Astronotus ocellatus*. Esse DNA satélite centromérico também foi isolado com a utilização da enzima *HinfI*, como podemos observar nos clones *AoHinfI-8* e *10*. Apesar de oriundos de digestões utilizando enzimas distintas, esses clones são muito semelhantes e por conta disso apresentaram similaridade com o mesmo tipo de DNA repetido (Anexo 1). Embora a similaridade encontrada entre a seqüência isolada de *A. ocellatus* e a seqüência

depositada no banco de dados para o genoma de *Tetraodon* seja de apenas 20 pb, este pequeno segmento encontra-se repetido em tandem no genoma de *Tetraodon*.

As seqüências *AoHaeIII-9* e *AoHaeIII-15* se apresentaram muito similares à seqüência correspondente aos elementos retrotransponíveis da família *Rex* presentes no genoma de *Xiphophorus maculatus* e *Tetraodon nigroviridis*, além de vários clones dispersos no genoma de zebrafish. Outra similaridade com elementos transponíveis observada foi em relação ao clone *AoHaeIII-17* que se mostrou similar (76%) ao transposon *Tc1* de *Salmo salar*.

Outras seqüências que merecem destaque são as seqüências *AoHinfI-2* e *AoHinfI-4* que correspondem a vários elementos repetidos dispersos em outros peixes, inclusive em membros da família Cichlidae.

4.2. Isolamento e caracterização de seqüências repetidas no genoma de *Astronotus ocellatus* por PCR

Por PCR os retrotransposons *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* e o transposon *Tc1* foram amplificados e identificados do DNA genômico. Os primers utilizados mostraram-se bastante eficientes na amplificação de fragmentos de DNA por PCR e já haviam sido empregados para o isolamento destes elementos repetidos em diversos grupos de peixes (Ozouf-Coastaz *et al.*, 2004; Capriglione *et al.*, 2002).

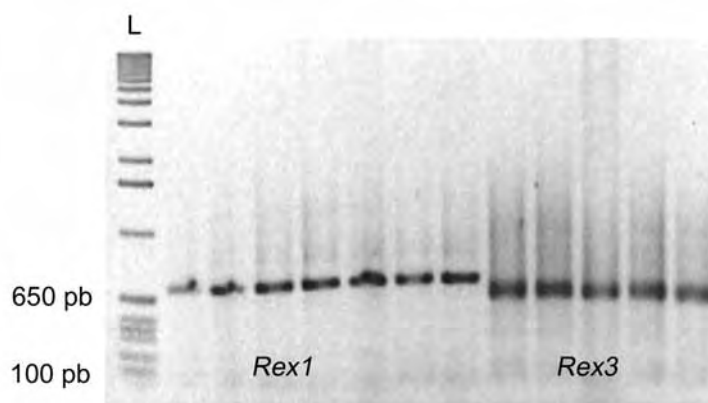


Figura 11: Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio mostrando produtos de PCR para os elementos transponíveis *Rex1* e *Rex3* amplificados de vários indivíduos da espécie *A. ocellatus*.

L – marcador de peso molecular.

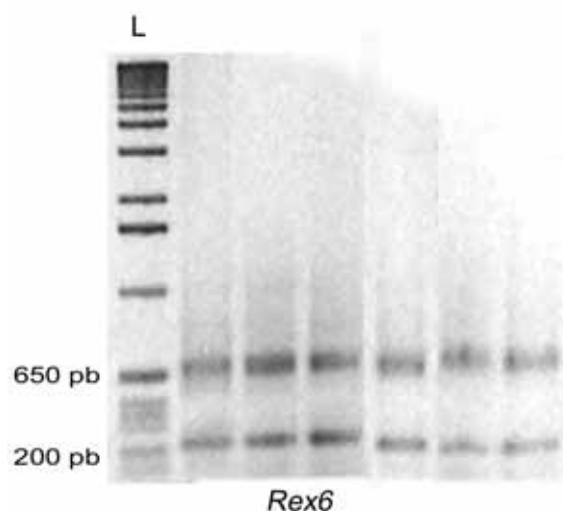


Figura 12: Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio mostrando produtos de PCR para os elementos transponíveis *Rex6* amplificados de vários indivíduos da espécie *A. ocellatus*.

L – marcador de peso molecular.

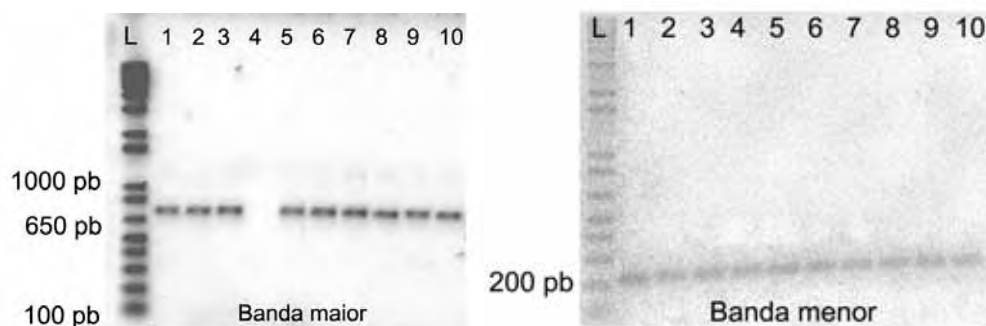


Figura 13: Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio dos produtos de PCR dos clones oriundos da banda maior e da banda menor do elemento *Rex6*.

L – marcador de peso molecular.

Os elementos *Rex1* e *Rex3* resultaram em fragmentos com o tamanho de 650 pb (Figura 11). O elemento *Rex6* resultou em duas bandas, uma menor com 200 pb e outra maior com 650 pb (Figura 12). Para elucidar qual dos dois fragmentos correspondia corretamente ao elemento *Rex6*, as duas bandas foram purificadas com o Kit GFX e clonadas através do Kit *pGEM-T* (Figura 13). O produto de PCR dos elementos *Rex1* e *Rex3*, juntamente com os clones positivos do elemento *Rex6* foram submetidos ao processo de seqüenciamento.

Após a análise de similaridade das seqüências no sistema de dados do NCBI foi possível detectar que os retrotransposons isolados *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* apresentaram alta similaridade com clones destes elementos identificados em outras espécies de peixes, incluindo algumas espécies de ciclídeos como *Cichlasoma labridens*, *Oreochromis niloticus*, *Hemichromis bimaculatus*. Uma alta similaridade entre os elementos *Rex* e elementos identificados em peixes considerados modelos de estudos na área da genética também foi detectada, como por exemplo em *Danio rerio*, *Tetraodon nigroviridis*, *Takifugu rubripes* (Tabelas 2, 3 e 4).

Com esta análise de similaridade também foi possível detectar que o fragmento de maior tamanho, 650 pb, correspondia ao elemento *Rex6* de *Astronotus ocellatus* (Figura 13). A seqüência deste fragmento maior quando submetido à análise se mostrou similar com seqüências depositadas do elemento *Rex6* de outros peixes (Tabela 4). Já o fragmento menor, da amplificação com o primer *Rex6*, depois da análise de similaridade se mostrou inespecífico.

A - *Rex1*

```
CCTTNATCANCACNACTTCTGAGGGACAAGCTGGAGCTGTCAGGAGTGGACCACCACATGTCCCAGTGGG
TACTGGACTACCTCACTGGCNGCCACAGTATGTGAAGACACAGGGCTGTGTCTCCNACAGGCTGGTCTGC
AGTACTGGGGCCCCACANGGAAGTGTGCTNNGACCNITCCTCTTCACCCTCTACACTGGATAATTTCTCC
ATCNACTCCCCANACTGGCATCTACAGAAGTTCTCTGACGACTCTTGCCATAATCGGGCTCATCACAGGT
GAGGATGACTCANAGTACNGACAGTGGACTCAGGACTTTGTGGACTGNTGCCAGTGGAAACNCTNCTGA
TCAATGCTGCTNAAACCAAGGAGNTAGTGGTGGATTTCGCGANGTGCAGACCCACCACACTGGACACCGG
TGAACATTCCAGGGGAGTGGATATTGAGATAGTGGACTCTTTTAAAGTACCTGGGGTGGT
```

B - *Rex3*

```
GGAGTCAACACCACAGGAAANGAGTCCGACTTATTGCCGGCAATACGGACCAAGCTCTCGCTGCGGTTGT
ACAGGGGACTGAATGGCCCGCAACAATGGGCCAGACACCCCATACTCCCGCAGCACCTCCACAGGATACC
CCGAGGGANGCGGTCTGAATGCCTTCTCCAAGTCCACAAAACACATGTAGACTGGATGGGCAAACTCCAC
GCACACTCAAATATCCTCGAGAGGATAAAGAGCTGGTCCAGTGTTCCNCGACCAGGACGAAAACCGCATT
GTTCTCTTGAATCTGAGGTTGACTAACAGANGGACCCTCCTTTCCAGCACCTGGCATANACCTTACC
GGGGAGGCTGAGGAGTGTGATCCCCGATAGTTGGANCACACCCTCCGGTCTCCCNCTCTTAAAGATGGGG
ACCACCACCCC
```

C - *Rex6*

```
TTGATACGCCAAGCTATTTAGGTGACACTATAGAATACTCAAGCTATGCATCCAACGCGTTGGGAGCTCT
CCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGCGAATTCAGTAGTGATTGGTCTCTACCAGAGGCTGGGAGCT
TGAGGGTCTGACAGTATCTTAGCTGTTCCAGTATTGCGCTCTTCTGGACAGAGATCTCAGATGTTAT
TCCAGGAATCTGCTGTAGCCACTTGGGGGTCACTGCCCCGAGTGTTCCAATTACCACGGGGACCACTGTC
ACCTTCATTTTCCACATCCTTTCCAGTTCTTCTGAGCCCTTGGTATTTATCAAGCTTCTCATGTTCTCT
TCTTCTGATGTTGCCGTCACTTGGTATCGCAACGTCTATCACTACGACTGTCTTCCCTGTTTGTCCAC
CACTACGATGTCCGGTTGGTTCGCCATCACAAGTCTATCTGTCTGTATCTGGAANTCCACANGATCTTA
GCCTCA
```

Figura 14 : Seqüências nucleotídicas dos elementos transponíveis *Rex1* (A), 3 (B) e 6 (C).

É importante ressaltar que as seqüências encontradas desses elementos mostraram similaridade com o genoma de outras espécies de peixes distribuídas por muitas ordens como Perciformes, Cyprinodontiformes, Tetraodontiformes, e outras. Estes resultados concordam com estudos previamente publicados que demonstraram que estes elementos se encontram amplamente distribuídos no genoma dos peixes (Volff *et al.*, 2000; Ozouf-Coastaz *et al.*, 2004).

Outra característica interessante é que o elemento *Rex6* revelou similaridade não apenas com seqüências depositadas de outros peixes, mas também com organismos de outros grupos como répteis, *Geochelone pardalis*; plantas, *Arabidopsis lyrata*, *Zostera marina*; microorganismos, *Prunus necrotic*; primatas, *Lepilemur dorsalis*; até mesmo com a espécie humana, *Homo sapiens* (Tabela 4). Este elemento se encontra conservado nos mais diferentes grupos de eucariotos.

Tabela 02: Similaridade encontrada para o elemento *Rex1* de *Astronotus ocellatus* em relação a outras espécies de peixes.

Espécies	Similaridade encontrada	N de acesso Gene Bank	Similaridade %
<i>Cichlasoma labridens</i>	transposon <i>Rex1</i> clone <i>Rex1</i> -Cil3 transposon <i>Rex1</i> clone <i>Rex1</i> -Cil1	AJ288469 AJ288470	86% 87%
<i>Oreochromis niloticus</i>	transposon <i>Rex1</i> clone <i>Rex1</i> -Orn5 <i>Rex1</i> retrotransposon	AJ288473 AF155735	86% 85%
<i>Hemichromis bimaculatus</i>	transposon <i>Rex1</i> clone <i>Rex1</i> -Heb2 transposon <i>Rex1</i> clone <i>Rex1</i> -Heb1	AJ288478 AJ288480	85% 84%
<i>Fundulus sp.</i>	transposon <i>Rex1</i> clone <i>Rex1</i> -Fun2 transposon <i>Rex1</i> clone <i>Rex1</i> -Fun1	AJ288483 AJ288484	74% 72%
<i>Anguilla japonica</i>	transposon <i>Rex1</i> clone <i>Rex1</i> -Anj2 transposon <i>Rex1</i> clone <i>Rex1</i> -Anj3	AJ288465 AJ288466	74% 74%
<i>Notothenia coriiceps</i>	non-LTR retrotransposon <i>Rex1a</i> non-LTR retrotransposon <i>Rex1b</i>	AY331095 AY331096	73% 73%
<i>Trematomus newnesi</i>	non-LTR retrotransposon <i>Rex1b</i> non-LTR retrotransposon <i>Rex1a</i>	AY331098 AY331097	73% 71%
<i>Anguilla anguilla</i>	transposon <i>Rex1</i> <i>Rex1</i> retrotransposon	AJ288463 AF155736	72% 72%
<i>Dissostichus mawsoni</i>	non-LTR retrotransposon <i>Rex1a</i> non-LTR retrotransposon <i>Rex1b</i>	AY331101 AY331102	72% 72%
<i>Gymnodraco acuticeps</i>	non-LTR retrotransposon <i>Rex1a</i> non-LTR retrotransposon <i>Rex1b</i>	AY331099 AY331100	72% 72%
<i>Batrachocottus baikalensis</i>	orf1 and orf2 genes transposon <i>Rex1</i> clone <i>Rex1</i> -Bab1	BBU18939 AJ288461	71% 70%
<i>Oryzias latipes</i>	transposon <i>Rex1</i> clone <i>Rex1</i> -Ori2	AJ288455	70%

	<i>Rex1</i> retrotransposon variant A <i>Rex1</i> retrotransposon variant B	AF155733 AF155734	70% 68%
<i>Takifugu rubripes</i>	C16orf8-like protein, hemoglobin alpha 3 subunit, hemoglobin beta subunit, hemoglobin alpha 4 subunit, and leucine carboxyl methyltransferase genes protocadherin gene locus 1	AY170464 DQ986917	72% 71%
<i>Astatotilapia burtoni</i>	clone BAC 19E16 Hoxdb gene cluster	EF594316	66%
<i>Gambusia affinis</i>	<i>Rex1</i> retrotransposon	AF155730	70%
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	----- non-LTR retrotransposon <i>Rex1</i> BAC 30B15 of library A Full-length cDNA	BX908814 AJ621040 AL808032 CR696588	67% 65% 66% 64%
<i>Xiphophorus maculatus</i>	transposon <i>Rex1</i> clone <i>Rex1</i> -XimJ3	AJ288451	72%
<i>Xiphophorus helleri</i>	transposon <i>Rex1</i> clone <i>Rex1</i> -Xih4	AJ288450	69%
<i>Zebrafish</i>	DNA sequence from clone DKEY-242N9 in linkage group 3 DNA sequence from clone DKEY-18H4 in linkage group 3	CR392003 CT583642	80% 80%

Tabela 03: Similaridade encontrada para o elemento *Rex3* de *Astronotus ocellatus* em relação a outras espécies de peixes.

Espécie	Similaridade encontrada	N de acesso Gene Bank	Similaridade %
<i>Cichlasoma labridens</i>	<i>Rex3</i> retrotransposon	AJ400374	92%
<i>Oreochromis niloticus</i>	<i>Rex3</i> retrotransposon <i>Rex3</i> retrotransposon	AJ400370 AJ400372	89% 88%
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	non-LTR retrotransposon <i>Rex3</i> A B ----- non-LTR retrotransposon <i>Rex3</i>	AJ621035 BX908814 BX908814 BX629355 AJ312226	82% 82% 81% 80% 82%
<i>Fugu rubripes</i>	pecanex (Pcnx11) gene immunoglobulin heavy chain gene cluster	AF154413 FRIGVH2	81% 84%
<i>Xiphophorus maculatus</i>	retrotransposon <i>Rex3b</i> retrotransposon <i>Rex3a</i>	AF125982 AF125981	80% 80%
<i>Batrachocottus baikalensis</i>	<i>Rex3</i> retrotransposon	AJ400359	81%
<i>Esox lucius</i>	<i>Rex3</i> retrotransposon	AJ400446	81%
<i>Xiphophorus helleri</i>	<i>Rex3</i> retrotransposon	AJ400395	80%
<i>Phallichthys amates</i>	<i>Rex3</i> retrotransposon	AJ400407	80%
<i>Poecilia formosa</i>	<i>Rex3</i> retrotransposon	AJ400379	80%
<i>Takifugu rubripes</i>	clone 283N9 clone 263O5	AC091293 AC091292	81% 81%

<i>Gambusia affinis</i>	<i>Rex3</i> retrotransposon	AJ400408	80%
<i>Cyprinus carpio</i>	<i>Rex3</i> retrotransposon	AJ400450	80%
<i>Zebrafish</i>	DNA sequence from clone DKEY-246C17 in linkage group 17	CR628327	79%
	DNA sequence from clone CH211-14C11 in linkage group 22	BX640467	78%
	DNA sequence from clone CH211-9A18 in linkage group 24	BX897669	78%

Tabela 04: Similaridade encontrada para o elemento *Rex6* de *Astronotus ocellatus* em relação a outras espécies de peixes.

Espécie	Similaridade encontrada	N acesso Gene Bank	Similaridade %
<i>Cichlasoma labridens</i>	<i>Rex6</i> retrotransposon clone <i>Rex6</i> -Cla-2	AJ293549	89%
	<i>Rex6</i> retrotransposon clone <i>Rex6</i> -Cla-1	AJ293548	76%
<i>Oreochromis niloticus</i>	MHC class IA antigen UBA1, UBA2, UAA1 genes, partial cds, UAA3 and UAA2 pseudogenes, UAA4, UAA5 and UAA6 pseudogene fragments	AB270897	82%
	<i>Rex6</i> retrotransposon clone <i>Rex6</i> -Oni-1	AB270897	77%
	<i>Rex6</i> retrotransposon clone <i>Rex6</i> -Oni-2	AJ293545	82%
	<i>Rex6</i> retrotransposon clone <i>Rex6</i> -Oni-3	AJ293546	81%
		AJ293547	80%
<i>Oryzias latipes</i>	gene for membrane guanylyl cyclase OIGC1	AB021490	81%
	<i>Rex6</i> retrotransposon	AJ293522	81%
<i>Heterandria bimaculata</i>	<i>Rex6</i> retrotransposon clone <i>Rex6</i> -Hbi-4	AJ293542	79%
	<i>Rex6</i> retrotransposon clone <i>Rex6</i> -Hbi-6	AJ293544	78%
<i>Poeciliopsis gracilis</i>	<i>Rex6</i> retrotransposon clone <i>Rex6</i> -Pgr-1	AJ293523	79%
	<i>Rex6</i> retrotransposon clone <i>Rex6</i> -Pgr-3	AJ293525	78%
<i>Geochelone pardalis</i>	voucher MVZ 241333 mitochondrion	DQ080041	77%
<i>Gambusia affinis</i>	<i>Rex6</i> retrotransposon clone <i>Rex6</i> -Gaf-4	AJ293530	78%
	<i>Rex6</i> retrotransposon clone <i>Rex6</i> -Gaf-1	AJ293527	78%
	<i>Rex6</i> retrotransposon clone <i>Rex6</i> -Gaf-3	AJ293529	78%
<i>Xiphophorus maculatus</i>	<i>Rex6</i> retrotransposon clone <i>Rex6</i> -Xma-5	AJ293516	78%
	<i>Rex6</i> retrotransposon clone <i>Rex6</i> -Xma-3	AJ293514	78%
<i>Poecilia formosa</i>	<i>Rex6</i> retrotransposon clone <i>Rex6</i> -Pfo-2	AJ293534	78%
<i>Astatotilapia burtoni</i>	clone BAC 20D21 platelet-derived growth factor receptor beta b and colony-stimulating factor 1 receptor b genes	DQ386647	75%
<i>Takifugu rubripes</i>	dmd gene upstream region 5 – 1	AJ544599	75%
	dmd gene upstream region 5 - 2	AJ544599	88%
<i>Zostera marina</i>	mitochondrial cox1 gene for cytochrome c oxidase	AB290315	100%
<i>Lepilemur dorsalis</i>	genomic fragment, RAPD with primer operon OPH4, clone A9c	AJ244005	100%
<i>Arabidopsis lyrata</i>	clone SINE9 transposon-insertion display band	EU558534	100%
	genomic sequence clone SINE8 transposon-insertion	EU558533	100%
<i>Homo sapiens</i>	mRNA for polyglutamine binding protein variant 4	AJ973596	100%
<i>Prunus necrotic</i>	ringspot virus mRNA for coat protein (CP gene)	AM408910	100%

<i>Spodoptera frugiperda</i>	mRNA for allatotropin	AJ488180	100%
<i>Uncultured Bacteroidetes</i>	partial 16S rRNA gene	AM706605	100%
<i>Uncultured alpha proteobacterium</i>	partial 16S rRNA gene	AM706708	100%

Outro elemento repetido obtido por PCR foi o elemento *Tc1*. Este elemento pertence a uma superfamília de transposons extensamente distribuído de protozoários a vertebrados, inclusive em muitas espécies de peixes teleósteos (Capriglione *et al.*, 2002). Essa imensa distribuição do elemento *Tc1* pode estar ligada aos eventos de transferência horizontais já relatados (Pocwierz-Kotus, 2007) difundindo-se de maneira muito ampla a todos os organismos, mesmo que pertencentes a taxa muito distantes. O elemento *Tc1* amplificado do genoma de *A. ocellatus* resultou em um fragmento de aproximadamente 400 pb observado por meio de eletroforese em gel de agarose (Figura 15).

Os fragmentos amplificados deste elemento também foram submetidos ao processo de clonagem, seqüenciamento e a análise comparativa das seqüências pelo sistema Blastn do NCBI. Esta análise possibilitou detectar altos níveis de similaridade (acima de 70%) com outras seqüências do elemento *Tc1* de três diferentes espécies de peixes da ordem Pleuronectiformes: *Platichthys flesus*, *Pleuronectes platessa*, *Scophthalmus maximus* (Tabela 05).

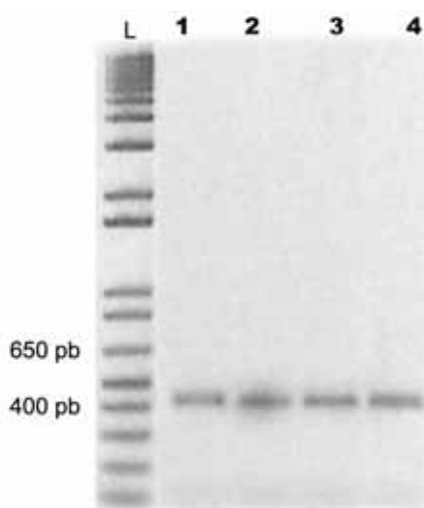


Figura 15: Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio após a reação de PCR evidenciando o elemento transponível *Tc1* na espécie *Astronotus ocellatus*.

L – marcador de peso molecular.

Tc1

TACAGTGCCTTGCATAAGTATTCACCGAACAGGTATATTTATACTGAGACTAAGTTACACACAGCTGGAC
TCTATTAATAAATTAAGTGANTTCTGAAGGCAATTGATTGCACTGGATTTTATTAGGGGTATCAGAGTA
CAGGGGGCTGAATACTTCTGCACGTCACACTTTTAAGAGTTTTATNTGATTAAATTTTGAAAACCATGT
ATCATTTTTTCATTCCACTTCACAATTATGTGGTNCCTTTGTGTTGGTCTATCACTTGAAATCTCAATAAAA
TACATTTAANTTAGTGGTTGNAAGGTGACAAAATNTCAAAANATTNNANGGGTGAANACNTATGCAAGGN
ACTGCA

Figura 16: Sequência nucleotídica do elemento *Tc1*.

Tabela 05: Similaridade encontrada para o elemento *Tc1* de *Astronotus ocellatus* em relação a outras espécies de peixes.

Espécie	Similaridade encontrada	N acesso Gene Bank	Similaridade %
<i>Platichthys flesus</i>	isolate pGEM7 transposon <i>Tc1-like</i> isolate pGEM102 transposon <i>Tc1-like</i> isolate pGEM95 transposon <i>Tc1-like</i>	DQ778485 DQ778418 DQ778504	75% 76% 71%
<i>Pleuronectes platessa</i>	<i>Tc1-like</i> transposon, tn5 gene <i>Tc1-like</i> transposon, transposase pseudogene isolate PG50G-12 transposon <i>Tc1-like</i>	AJ303068 AJ249083 DQ778360	71% 71% 71%
<i>Scophthalmus maximus</i>	isolate PG11SKB-12 transposon <i>Tc1-like</i> isolate PG11SKB-10 transposon <i>Tc1-like</i> isolate PG11SKB-28 transposon <i>Tc1-like</i>	DQ778400 DQ778398 DQ778412	71% 72% 72%

Outra metodologia empregada para o isolamento de seqüências repetidas de DNA foi o procedimento de DOP-PCR. O princípio do DOP-PCR está baseado na utilização de um primer degenerado (5'CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G3') que tem a capacidade de anelamento aleatório em diferentes regiões genômicas. Esta metodologia permite a amplificação de seqüências de todo o genoma, com amplificação preferencial de seqüências repetidas de DNA (Telenius *et al.*, 1992). Esta metodologia se mostrou interessante, possibilitando o isolamento da fração repetitiva do genoma e sua utilização como sonda cromossômica. Os resultados de hibridação cromossômica obtidos com esta sonda serão apresentados no tópico 4.3.

4.3. Caracterização citogenética e análises de citogenética molecular

Preparações cromossômicas foram obtidas para 14 exemplares do ciclídeo *Astronotus ocellatus* coletados no rio Tietê - SP, mostrando a presença de 48 cromossomos, sendo 16 cromossomos m/sm e 32 cromossomos st/a (Figura 17A). Este número diplóide se mostra correspondente ao número modal das espécies de ciclídeos sul-americanas (60% das espécies). Exemplares desta espécie coletados nos rios Miranda, MS e Amazonas, AM já foram analisados citogeneticamente (Feldberg *et al.*,

2003) e também foi observado um número diplóide de 48 cromossomos em ambos os sexos e a presença de apenas um par de cromossomos portadores de RONS.

Utilizando a técnica de bandamento C pode-se observar claramente a heterocromatina da região centromérica de todos os cromossomos de *A. ocellatus* e também uma região heterocromática intersticial no primeiro par cromossômico (Figura 17B).

Os retrotransposons *Rex1*, *Rex3* e *Rex6*, isolados por PCR, foram utilizados como sondas para hibridação cromossômica na espécie *A. ocellatus*. As análises dos resultados mostraram marcações similares para os três elementos na região do centrômero de todos os cromossomos do complemento desta espécie e algumas fracas marcações intersticiais (Figura 18 A, B e C). Marcações mais intensas e alguns sinais de hibridação telomérica e intersticiais foram observadas para o elemento *Rex6* indicando que provavelmente este elemento está presente em um maior número de cópias no genoma desta espécie (Figura 18C). O elemento transponível *Tc1* também foi utilizado como sonda na técnica de hibridação *in situ*, mostrando fracas marcações por todos os cromossomos e alguns acúmulos de sinais nos centrômeros, coincidindo com as marcações dos elementos *Rex* (1, 3 e 6), porém, em menor intensidade (Figura 18D).

Os clones isolados por restrição enzimática *AoHaeIII-6*, *AoHaeIII-15* e *AoHinfI-4* igualmente foram utilizados como sondas em hibridação para determinar a sua localização nos cromossomos desta espécie. Esses clones foram selecionados porque, após a análise de similaridade, eles se mostraram similares a seqüências repetidas interessantes para estudo como, um DNA satélite centromérico de *Tetraodon nigroviridis*, seqüências de elementos transponíveis da família *Rex* de *Xiphophorus maculatus* e *Tetraodon nigroviridis* e seqüências repetidas dispersas no genoma de vários peixes, incluindo ciclídeos (Tabela 01). Em todas as metáfases analisadas foi verificada a presença de fortes marcações preferencialmente centroméricas nos cromossomos para as sondas oriundas da digestão com a enzima *HaeIII*, ou seja os clones *AoHaeIII-6* (Figura 18E) e *AoHaeIII-15* (Figura 18F). Esse padrão de marcação pode estar ligado a característica da seqüência utilizada como sonda, pois ambas são seqüências de característica centromérica (DNA satélite centromérico e elemento *Rex*). Já para a enzima *HinfI*, clone *AoHinfI-4* os sinais de hibridação também se acumularam nos centrômeros, mas sinais dispersos ao longo dos braços puderam também ser percebidos (Figura 18G).

Adiciona-se aos resultados já relatados, a localização citogenética de diversas seqüências repetidas através do procedimento de DOP-PCR. Apesar do método DOP-

PCR amplificar principalmente seqüências repetidas de DNA, o uso deste método como sonda de hibridação, não nos revela que tipo específico de DNA está sendo localizado, pois, se trata de um primer não específico e conseqüentemente amplifica várias regiões repetidas.

Na espécie *Astronotus ocellatus*, o produto de DOP-PCR também foi utilizado como sonda nas preparações cromossômicas e marcações preferencialmente centroméricas foram evidenciadas. Além disso, marcações menos evidentes também foram detectadas em regiões intersticiais de alguns cromossomos (Figura 18H). Estes dados são muito relevantes pois confirmam de maneira clara que as seqüências repetidas presentes no genoma deste ciclídeo se acumulam nas regiões centroméricas, mas alguns sinais fracos de hibridação nas regiões intersticiais estão também presentes, pois certamente algumas seqüências repetidas se encontram dispersas.

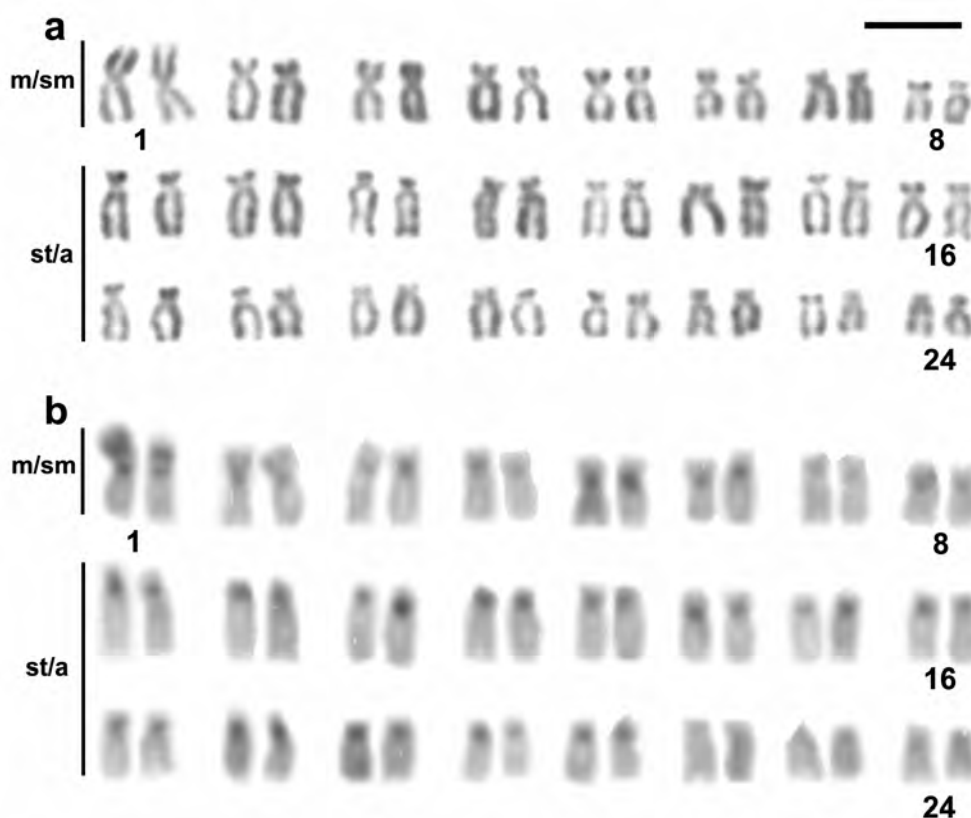


Figura 17: Cariótipo de *Astronotus ocellatus* baseado em coloração convencional Giemsa (a) e após o tratamento com o bandamento C (b).

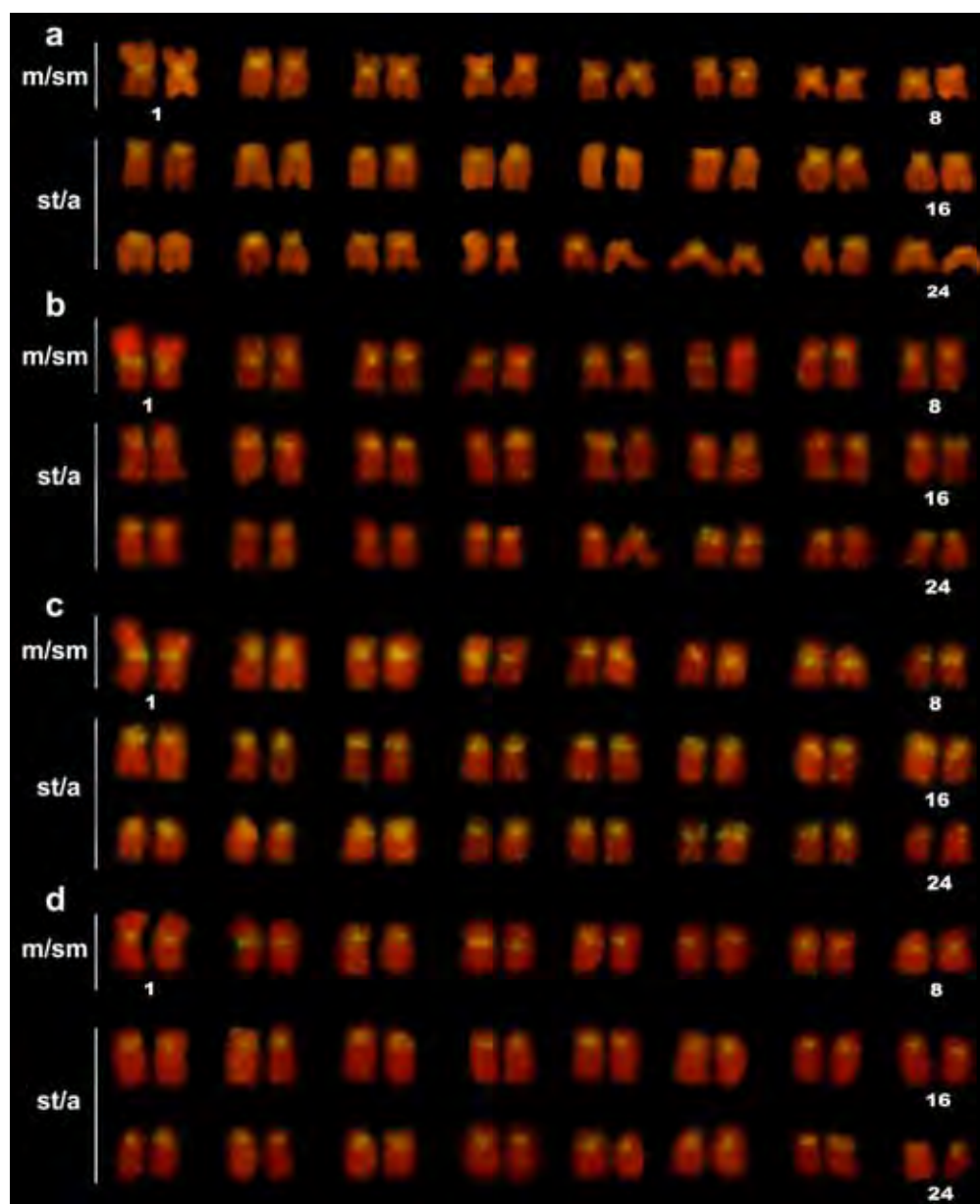


Figura 18: Hibridação *in situ* fluorescente utilizando como sonda os retrotransposons *Rex1* (a), *Rex3* (b), *Rex6* (c) e o transposon *Tc1* (d) nos cromossomos de *Astronotus ocellatus*.

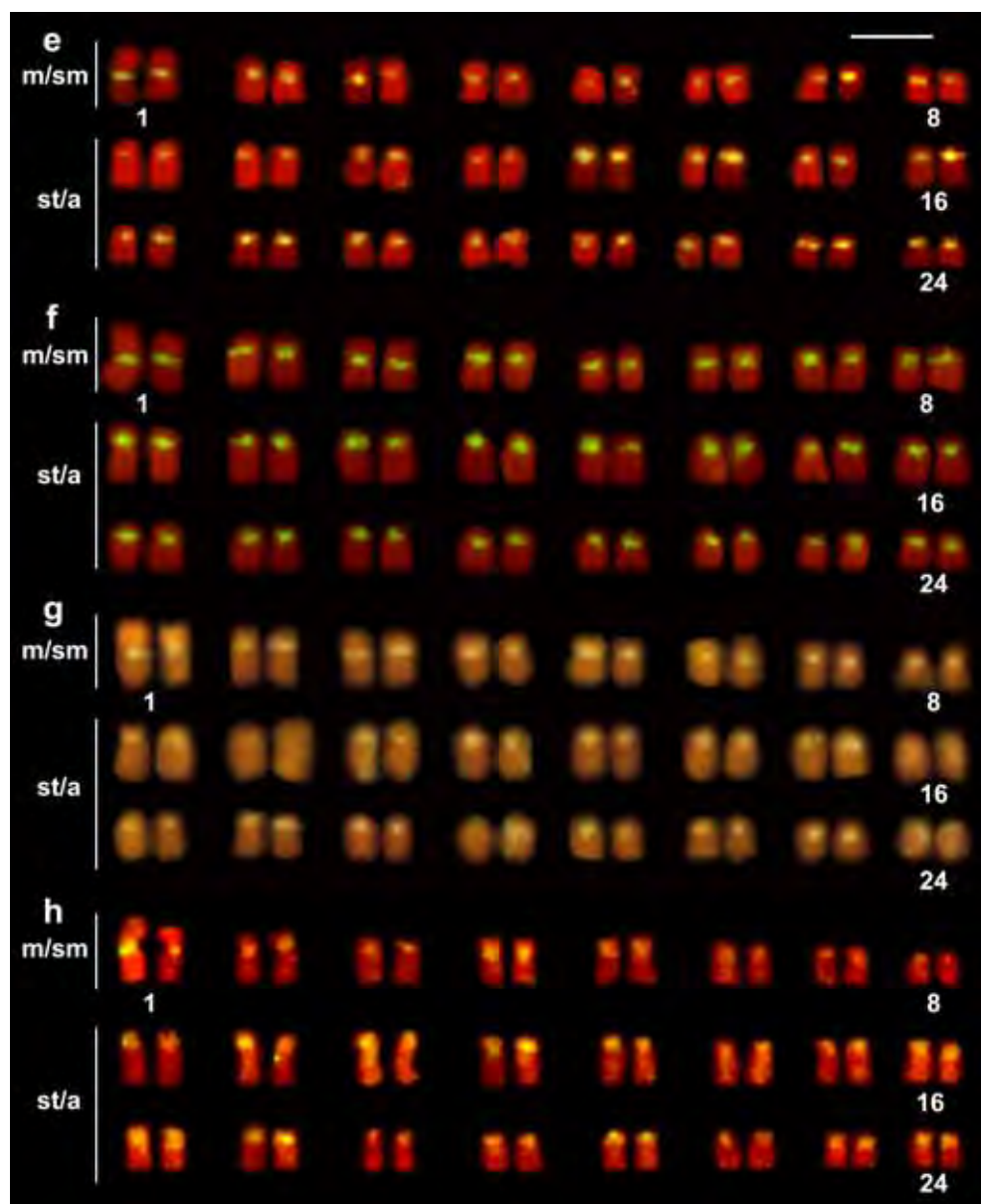


Figura 18 (continuação): Hibridação *in situ* fluorescente utilizando como sonda os DNAs repetidos isolados por restrição enzimática *AoHaeIII*-6 (E), *AoHaeIII*-15 (F) e *AoHinfI*-4 (G) e o DOP-PCR (H) nos cromossomos de *Astronotus ocellatus*.

4.4 Discussão geral

Os resultados apresentados com os elementos da família *Rex* no nosso trabalho se mostram similares aos obtidos para *Rex3* em *Tetraodon nigroviridis* (Fisher *et al.*, 2004) onde estão acumulados em regiões pericentroméricas e heterocromáticas, além de regiões intersticiais marcadas com menor intensidade. Esses retroelementos, *Rex1*, *Rex3* e *Rex6*, também já foram utilizados como sonda para hibridação *in situ* nos cromossomos de peixes marinhos da ordem Perciformes. Os elementos *Rex1* e *Rex3* evidenciaram sinais abundantes espalhados pelos cromossomos, acumulando-se regiões heterocromáticas. Já o elemento *Rex6* não pode ser identificado através da hibridação por estar provavelmente ausente ou muito disperso (Ozouf-Costaz *et al.*, 2004). No genoma da espécie *Astronotus ocellatus* o elemento *Rex6* pode ser detectado com sinais muito mais abundante que os elementos *Rex1* e *Rex3*, mostrando uma diferença relevante na característica do genoma entre a nossa espécie estudada e as espécies da ordem Perciformes.

Capriglione *et al* (2002) utilizando o transposon *Tc1* evidenciou marcações preferencialmente nas regiões heterocromáticas (pericentromérica ou telomérica) e raramente intersticiais similares ao encontrado por Ozouf-Costaz *et al.* (2004) com o elemento *Rex3* e *Tc1* na espécie *Chionodraco hamatus*. Os sinais do elemento *Tc1*, assim como no nosso trabalho se encontram na heterocromatina e coincidem com a localização de outros elementos transponíveis, como por exemplo os elementos *Rex*.

O retrotransposon *Zebulon*, isolado do genoma do pufferfish *Tetraodon nigroviridis*, também se associa as regiões heterocromáticas (braços curtos dos cromossomos subtelocêntricos e regiões pericentroméricas) quando aplicado como sonda na técnica de FISH (Bouneau *et al.*, 2003). Quando co-hibridado com o elemento *Rex3*, outro retrotransposon abundante no genoma de *T. nigroviridis*, os sinais dos dois elementos se sobrepõem, mostrando que a região de hibridação dos elementos coincide, ou seja, ambos estão presentes em grande quantidade nas heterocromatinas (Bouneau *et al.*, 2003).

Presume-se que em peixes os transposons estão aglomerados nas regiões heterocromáticas dos cromossomos. O envolvimento de uma grande pressão de seleção contra a inserção destes elementos em regiões ricas em genes já foi sugerido, tendo como base o poder que os transposons têm de causar mutações através dos eventos de transposição. Essas mutações podem ser inversões, deleções ou até mesmo inserção do transposon dentro de um gene ou sequência regulatória. A seleção natural, portanto,

vem agindo contra os efeitos negativos dos elementos transponíveis (Bartolomé *et al.*, 2002). Em outros animais, os elementos transponíveis também se encontram localizados em regiões de heterocromatina. O melhor exemplo documentado acontece em *Drosophila melanogaster* onde os elementos transponíveis formam clusters proeminentes na heterocromatina (Bartolomé *et al.*, 2002). Entretanto isso se mostra distinto do que acontece nos mamíferos, onde estes elementos se encontram dispersos nos cromossomos e muitas vezes ocupam regiões eucromáticas (Volff *et al.*, 2003). Em plantas como *Oryzias sativa* ou *Arabidopsis thaliana*, as regiões centroméricas e pericentroméricas acumulam uma grande quantidade de elementos transponíveis. Em ambas, os retroelementos aparecem acumulados na região do centrômero e os transposons aparecem predominantemente na região pericentromérica (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000; Lenior *et al.*, 2001).

O acúmulo de elementos transponíveis em regiões preferenciais, principalmente regiões heterocromáticas, tem sido relatada para muitos elementos analisados (Dimitri e Junakovic, 1999, Bartolomé *et al.*, 2002, Da Silva *et al.*, 2002) sugerindo que a heterocromatina pode funcionar também como um refúgio de elementos transponíveis funcionais ou degenerados. Porém, não podemos correlacionar este acúmulo de transposons na heterocromatina com a especificidade do elemento, ou da família do elemento em questão. O mesmo elemento pode ser encontrado em regiões divergentes, isso vai depender da interação entre o transposon e o genoma hospedeiro (Dimitri e Junakovic, 1999).

Além dos elementos transponíveis outros tipos de DNAs repetidos se acumulam preferencialmente na heterocromatina. Nosso trabalho localizou três tipos de DNAs repetidos distintos (clones *AoHaeIII-6*, *AoHaeIII-15* e *AoHinfl-4*) e a localização encontrada para todos foi principalmente na região centromérica dos cromossomos da espécie estudada, local este que coincide com o local das regiões heterocromáticas.

A localização preferencial de DNA repetidos em regiões heterocromáticas tem sido observada freqüentemente no genoma de outros organismos além de peixes. Este acúmulo de seqüências repetidas em regiões heterocromáticas pode também ser observada no milho (Dimitri e Junakovic, 1999; Bartolomé *et al.*, 2002), répteis (Yamada *et al.*, 2005) e também em roedores (Yamada *et al.*, 2006).

Com técnica de bandamento C pode-se observar claramente que as regiões de heterocromatina desta espécie estão localizadas na região centromérica dos cromossomos de *Astronotus ocellatus*, exatamente onde ocorreu acúmulo de hibridação das sondas de DNA repetidos utilizadas. Isto reforça a idéia do acúmulo de DNA

repetido em regiões heterocromáticas, principalmente de elementos transponíveis. Infere-se que esta região contenha poucos genes e uma baixa taxa de recombinação, permitindo assim o acúmulo de seqüências repetidas (Dimitri e Junakovic, 1999).

A análise da localização cromossômica desta classe de seqüências se mostra de grande valia porque elas representam uma fração significativa e estão presentes em uma enorme diversidade no genoma dos peixes. Análises comparativas da quantidade e diversidade dos transposons já identificados mostraram que os mamíferos possuem uma maior quantidade de elementos transponíveis no seu genoma comparado com peixes. Por outro lado, embora presente em menor quantidade, a diversidade destes elementos presentes no genoma dos peixes é muito maior (Volf *et al.* 2003). Acredita-se que a maior diversidade destes elementos presentes no genoma dos peixes tenha reflexo na ampla diversidade de espécies que o grupo apresenta. Estudos realizados mostram a enorme variedade de famílias de DNAs repetidos que vem sendo descobertas, não apenas nos peixes, mas em todos os eucariotos, devido ao grande número de genomas seqüenciados nos últimos anos.

Os resultados do nosso trabalho, e outros trabalhos já relatados, indicam uma forte conservação destes elementos repetidos na região heterocromática dos cromossomos. Isto sugere que estes elementos devem desempenhar papéis fundamentais na heterocromatina, como manutenção da estrutura centromérica. Além disso, a presença dos elementos repetidos preferencialmente na região centromérica dos cromossomos, fornece um bom marcador molecular centromérico com aplicação nos estudos evolutivos e de rearranjos cromossômicos.

5. Referências bibliográficas

- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**. v215, p.403-410, 1990.
- Aparício S., Chapman J., Stupka E., Putnam N. Whole-genome shotgun assembly and analysis of the genome of *Fugu rubripes*. **Science**. v297, p1301-1310, 2002.
- Axelrod, H.R. **The most complete colored lexicon of cichlids**. 2nd Edition. TFH Publications. NJ, USA. p864, 1996.
- Bartolomé C., Maside X., Charlesworth B. On the abundance and distribution of transposable elements in the genome of *Drosophila melanogaster*. **Molecular Biology and Evolution**. v19, n6, p926-937. 2002.
- Bertollo L.A.C., Takahashi C.S., Moreira-Filho O. Citotaxonomic consideration on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Brazilian Journal of Genetics**. v1, p103-120, 1978.
- Biémont C., Vieira C. Genetics: Junk DNA as an evolutionary force. **Nature**. v443, p521-524. 2006.
- Biet E., Sun J., Dutreix M. Conserved sequence preference in DNA binding among recombinant proteins: abnormal effect of ssDNA secondary structure. **Nucleic Acids Research**. v27, p596-600, 1999.
- Böhne A., Brunet F., Galiana-Arnoux D., Schultheis C., Volff J.N. Transposable elements as drivers of genomic and biological diversity in vertebrates. **Chromosome Research**. v16, p203-215. 2008.
- Bouneau L., Fisher C., Ozouf-Costaz C., Froschauer A., Jaillon O., Coutanceau J.P., Körting C., Weissenbach J., Bernot A., Volff J.N. An active Non-LTR retrotransposon with tandem structure in the compact genome of the pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. **Genome Research**. v13, p1686-1695. 2003.
- Britski H.A. Peixes de água doce do estado de São Paulo: sistemática. In: **Poluição e Piscicultura**, Faculdade de Saúde Pública da USP- Instituto de Pesca da C.P.R.N. da Secretaria de Agricultura. p79-108. 1972.
- Britski H.A., Sato Y., Rosa A.B.S. **Manual de identificação de peixes da região de três Marias**. 2ª edição. Brasília, CODEVASP. 1986.
- Capriglione T., Odierna G., Caputo V., Canapa A., Olmo E. Characterization of *Tc* 1-like transposon in Antarctic ice-fish *Chionodraco hamatus*. **Gene**. v295, p193-198. 2002.
- Charlesworth B., Sniegowski P., Stephan W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature**. v371, p215-220. 1994.
- Chistiakov A.D., Hellemans B., Volckaert A.M.F. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. **Aquaculture**. v255, p1-29. 2006.

Csink A.K., Henikoff S. Large-scale Chromosomal Movements During Interphase Progression in *Drosophila*. **The Journal of Cell Biology**. v143, n1, p13-22. 1998.

Dasilva C., Hadji H., Ozouf-Costaz C., Nicaud S., Jaillon O., Weissenbach J., Crollius H.R. Remarkable compartmentalization of transposable elements and pseudogenes in the heterochromatin of the *Tetraodon nigroviridis* genome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v99, n21, p1636-1641. 2002.

Davidson A.E., Balciunas D., Mohn D., Shaffer J., Hermanson S., Sivasubbu S., Cliff M.P., Hackett P.B., Ekker C. Efficient gene delivery and gene expression in zebrafish using the sleeping beauty transposon. **Developmental Biology**. v263, p191– 202. 2003.

Deininger P.L., Moran J.V., Batzer M.A., Kazazian H.H.Jr. Mobile elements and mammalian genome evolution. **Current Opinion in Genetics & Development**. v13, p651-658. 2003.

Dimitri P., Junakovic N. Revising the selfish DNA hypothesis. New evidence on accumulation of transposable elements in heterochromatin. **Trends in Genetics**. v15, p123-124. 1999.

Eickbush T.H., Malik H.S. Origins and evolution of retrotransposons. **Mobile DNA II**. 2002.

Ellegren H. Microsatellites mutations in the germline: implications for evolutionary inference. **Trends in Genetics**. v16, p551-558. 2000.

Epplen J.T., Kyas A., Mauler W. Genomic simple repetitive DNA are targets for differential binding of nuclear proteins. **FEBS Letters**. v389, p92-95. 1996.

Farah S.B. Decifrando o genoma humano. In: **DNA Segredos e Mistérios**. 2007.

Feldberg E., Porto J.I.R., Bertollo L.A.C. Chromosomal changes and adaptation of cichlid fishes during evolution. p285-308. In: Val, A.L., Kapoor, B.G. **Fish adaptations**. Science Publishers, Inc. New Dehli & New York. 2003.

Feldberg E., Porto J.I.R., Alves-Brinn M.N., Mendonça M.N.C., Bezaquem D.C. B Chromosomes in Amazonia cichlid species. **Cytogenetic and Genome Research**. Switzerland. v106, p195-198. 2004.

Feschotte C. Merlin, a New Superfamily of DNA Transposons Identified in Diverse Animal Genomes and Related to Bacterial IS1016 Insertion Sequences. **Molecular Biology and Evolution**. v21, n9, p1769-1780. 2004.

Feschotte C., Pritham E.J. DNA transposons and the evolution of eukaryotic genomes. **Annual Review of Genetics**. v41, p331-368. 2007.

Fisher C., Bouneau L., Coutanceau J.P., Weissenbach J., Volff J.N., C. Ozouf-Costaz. Global heterochromatic colocalization of transposable elements with minisatellites in the compact genome of the pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. **Gene**. v336, p175-184. 2004.

Galetti Jr. P.M., Martins C. Contribuição da hibridação *in situ* para o conhecimento dos cromossomos dos peixes. p61-88. In: **FISH: Conceitos e Aplicações na Citogenética** (Ed. M Guerra). Editora da SBG. 2004.

Harris A.S., Wright J.M. Nucleotide sequence and genomic organization of cichlids fish minisatellites. **Genome**. v38, p177-184. 1995.

Jaillon O. *et al.* Analysis of the Tetraodon nigroviridis genome reveals the protokaryotype of bony vertebrates and its duplication in teleost fish. **Nature**. v431, p946-957. 2004.

Jeffreys A.J., Wilson V., Thein S.L. Hypervariable minisatellite regions in human DNA. **Nature**. v314, p67-74. 1985.

Jurka J., Kapitonov V.V., Pavlicek A., Klonowski P., Kohany O., Walichiewicz J. Repbase Update, a database of eukaryotic repetitive elements. **Cytogenetic and Genome Research**. v110, p462-467. 2005.

Kapitonov V.V., Jurka J. Helitrons on a roll: eukaryotic rolling-circle transposons. **Trends in Genetics**. v23, n10, p521-9. 2007.

Kasahara M., et al. The medaka draft genome and insights into vertebrate genome evolution. **Nature**. v447, n7145, p714-9. 2007.

Kidwell M.G. Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. **Genetica**. v115, p49-63. 2002.

Kocher T.D. Adaptive evolution and explosive speciation: the cichlid fish model. **Nature**. v5, p288-298. 2004.

Kumar A., Bennetzen J.L. Plant retrotransposons. **Annual Review of Genetics**. v33, p479-532, 1999.

Lander E.S., *et al.* Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature**. v409, n6822, p860-921. 2001.

Lewin, B. Retrovirus and retrotransposons. In: **Genes VIII**. Carlson G. Ed: Pearson Prentice Hall. NJ. p. 493-509. 2004.

Li, W.H. Molecular Evolution. **Sinauer Associates Sunderland** 177-213. 1997.

Li Y.C., Kord A.B., Fahima T., Berles A., Nero E. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutation mechanisms: a review. **Molecular Ecology**. v11, p2453-2465. 2002.

Liu Z., Li P., Kocabas A., Karsi A., Ju Z. Microsatellite containing genes from the channel catfish brain: evidence of trinucleotide repeat expansion in the coding region of nucleotide excision repair gene RAD23B. **Biochemical and Biophysical Research Communication**. v289, p317-324. 2001.

Lohe A.R., Moriyama E.N., Lidholm D.A., Hartl D.L. Horizontal transmission, vertical inactivation, and stochastic loss of *mariner-like* transposable elements. **Molecular Biology and Evolution**. v12, p62-72. 1995.

Lowe-McConnell R.H. **Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais**. EDUSP. São Paulo. 536p. 1999.

Maside X., Bartolomé C., Assimacopoulos S., CharlesWorth B. Rates of movement and distribution of transposable elements in *Drosophila melanogaster*: *in situ* hybridization vs Southern blotting data. **Genetics Research**, v78, p121-136. 2001.

Martins C., Oliveira C., Wasko A.P., Wright J.M. Physical mapping of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) genome by fluorescent *in situ* hybridization of repetitive DNAs to metaphase chromosomes - A review. **Aquaculture**. v231, p37-49. 2004.

Martins C. Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome. In: **Fish Cytogenetics**. Eds: Pisano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F and Kapoor BG. Science Publisher, Inc., USA. 2007.

Moyle P.B., Cech-Junior J.J. **Fishes: an introduction to ichthyology**. 4ª edição. Upper Sadlle River: Prentice-Hall. 2000.

Murray A.M.. The fossil record and biogeography of the Cichlidae (Actinopterygii, Labroidei). **Biological Journal of the Linnean Society**. v74, p517-532, 2001.

Nelson J.S. **Fishes of the world**. 4th Edition. John Wiley & Sons, Inc. NY, USA. 2006.

Ohshima K., Koishi R., Matsuo M. Okada N. Several short interspersed repetitive elements (SINEs) in distan spesces may have originated from a common ancestral retrovirus: characterization of a squid SINE and a possible mechanism for generation of tRNA-derived retroposons. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v90, p6260-6264. 1993.

Ozouf-Costaz C., Brandt J., Körting C., Pisano E., Bonillo C., Countaceau J.P., Volff J.N. Genome dynamics and chromosomal localization of the non-LTR retrotransposons *Rex1* and *Rex3* in Antarctic fish. **Antarctic Science**. v16, n1, p51–57. 2004.

Pavanelli G.C. Sanidade de peixes, rãs, crustáceos e moluscos. In: Valenti, W.C, Poli, C.R, PEREIRA, J.A, BORGHETTI, J.R. **Aqüicultura no Brasil: bases para um desenvolvimento sustentável**, p208-209. CNPQ: Brasília. 2000.

Pocwierz-Kotus A. Family of *Tc1*-like elements from fish genomes and horizontal transfer. **Gene**. v390, p243-251. 2007.

Rocha A., Ruiz S., Estepa A., Coll J.M. Fish as biofactories: inducible genetic systems and gene targeting. **Spanish journal of agricultural research**. v1, p3–11. 2003.

Sambrook J., Russel D.W. **Molecular cloning. A laboratory manual**. 3ªedição. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 2001.

Shimoda N., Chevrette M., Ekker M., Kikuchi Y., Hotta Y., Okamoto H. *Mermaid*, a family of Short Interspersed Repetitive Elements, is useful for Zebrafish genome mapping. **Biochemical and Biophysical Research Communication**. v220, p233-237. 1996.

Smit A.F.A. The origin of interspersed repeats in the human genome. **Current Opinion in Genetics and Development**. v6, p743-748. 1996.

Sterba G. **Freshwater fishes of the world**. T.F.H. Publications, USA v1-2, p877. 1973.

Sumner A.T. A simple technique to demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**. v75, n1, p304-306. 1972.

Takahashi K., Terai Y., Nishida M., Okada N. A Novel Family of Short Interspersed Repetitive Elements (SINEs) from Cichlids: The Patterns of Insertion of SINE at Orthologous Loci Support the Proposed Monophyly of Four Major Groups of Cichlid Fishes in Lake Tanganyika. **Molecular Biology and Evolution**. v15, n4, p391-407. 1998.

Tarfalla C., Estepa A., Coll J.M. Fish transposons and its potential use in aquaculture. **Journal of biotechnology**. p1-16. 2006.

Telenius H., Polmear A.H., Tunnacliffe A., Carter N.P., Behmel A., Ferguson-Smith M.A., Nordenskjold M., Pfragner R., Ponder B.A.J. Cytogenetic analysis by chromosome painting using DOP-PCR amplified flow-sorted chromosomes. **Genes, Chromosomes & Cancer**. v4, p257-263. 1992.

THE GENOME INTERNATIONAL SEQUENCING CONSORTIUM. Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature**. v409, p860-921, 2001.

THE ARABIDOPSIS GENOME INITIATIVE: Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. **Nature**. v408, p796-815. 2000.

Timberlake W.E. Low repetitive DNA content in *Aspergillus nidulans*. **Science** v202, p973-975. 1978.

Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic acids research**. v22, p4673-4680. 1994.

Toth G., Gaspari Z., Jurka J. 2000. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. **Genome Research**. v10, p967-981. 2000.

Trewavas E. **Tilapiine fishes of the genera *Sarotherodon*, *Oreochromis* and *Danakilia***. London. British Museum (Natural History). 1983.

Turner G.F., Genner M.J. The mbuna cichlids of Lake Malawi: a model for rapid speciation and adaptive radiation. **Fishes and fisheries**. v6, p1-34. 2005.

Volff J.N., Korting C., Sweeney K., Scharl M. The non-LTR retrotransposon *Rex3* from the fish *Xiphophorus* is widespread among teleosts. **Molecular and Biology Evolution**. v16, p1427–1438. 1999.

Volff J.N., Korting C., Scharl M. Multiple lineages of the non-LTR retrotransposon *Rex1* with varying success in invading fish genomes. **Molecular and Biology Evolution**. v17, p1673–1684. 2000.

Volff J.N., Hornung U., Scharl M. Fish retrotransposons related to the Penelope element of *Drosophila virilis* define a new group of retrotransposable elements. **Molecular genetics and genomics**. v265, p711–720. 2001.

Volff J.N., Bouneau L., Ozouf-Costaz C., Fischer C. Diversity of retrotransposable elements in compact pufferfish genomes. **Trends in Genetics**. v19, n12, p 674-678. 2003.

Walsh J. B. Genome Evolution: Overview. **Enciclopedia of life sciences**. 2001.

Weber J.L., May P.E. Abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerase chain reaction. **American journal of human genetics**. v44, n3, p388-396. 1989.

Yamada K., Kamimura E., Kondo M., Tsuchiya K., Nishida-Umehara C., Matsuda Y. New families of site-specific repetitive DNA sequences that comprise constitutive heterochromatin of the Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*, Cricetinae, Rodentia). **Chromosoma**. v115, p36–49. 2006.

Yamada K., Nishida-Umehara C., Matsuda Y. Molecular and cytogenetic characterization of site-specific repetitive DNA sequences in the Chinese soft-shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*, Trionychidae). **Chromosome Research** . v13, p33–46. 2005.

ANEXO

AoHaeIII-6	CCTTATCTCGGCGAGAAAAGCT-CGAGAGT C ACATAAAAAGACGTGCCGCTTAAGGCGCT	59
AoHaeIII-24	CCTTATCTCGGCGAGAAAAGCT-CGAGAGT C ACATAAAAAGACGTGCCGCTTAAGGCGCT	59
AoHaeIII-5	CCTTATCTCGGCGAGAAAAGCT-CGAGAGT C CCATAAAAAGACGTGCCGCTTAAGGCGCT	59
AoHaeIII-16	--TTATCTCGGCGAGAAAAGCT-CGAGAGT C ACATAAAAAGACGTGCCGCTTAAGGCGCT	57
AoHaeIII-2	CCTTATCTCGGCGAGAAAAGCT-CGAGAGT C ACATAAAAAGACGTGCCGCTTAAGGCGCT	59
AoHaeIII-3	CCTTATCTCGGCGAGAGAAGCTTCGAGAGT C ACATAAAAAGATGTGCCGCTTAAGGCGCT	60
AoHinfI-8R	-----G T CACATAAAAAGACGTGCCGCTTAAGGCGCT	32
AoHinfI-10R	-----	
AoHaeIII-6	CCTTTCTCGG-TGTGACAAGTTTCTGCGCACCCTAAACTG-TATCTTGACATCCTCTGT	117
AoHaeIII-24	CCTTTCTCGG-TGTGACAAGTTTCTGCGCACCCTAAACTG-TATCTTGACATCCTCTGT	117
AoHaeIII-5	CCTTTCTCGG-TGTGACAAGTTTCTGCGCACCCTAAACTG-TATCTTGACATCCTCTGT	117
AoHaeIII-16	CCTTTCTCGG-TGTGACAAGTTTCTGCGCACCCTAAACTG-TATCTTGACATCCTCTGT	115
AoHaeIII-2	CCTTTCTCGG-TGTGACAAGTTTCTGCGCACCCTAAACTG-TATCTTGACATCCTCTGT	117
AoHaeIII-3	CCTTTCTCGNGTGTGACAAGTTTCTGCGCACCCTAAAGTGGTATCTTGACAGCCTCTGT	120
AoHinfI-8R	CCTTTCTCGG-TGTGACAAGTTTCTGCGCACCCTAAACTG-TATCTTGACATCCTCTGT	90
AoHinfI-10R	-----CGCACCCTAAACTG-TATCTTGACATCCTCTGT	33
	***** ** *****	
AoHaeIII-6	TG--AAACAA-GCATTAAATTCT-AAAAGTAACACACTGGG-ACACAGTGTCTGCTTGGA	172
AoHaeIII-24	TG--AAACAA-GCATTAAATTCT-AAAAGTAACACACTGGG-ACACAGTGTCTGCTTGGA	172
AoHaeIII-5	TGGAAGACAAAGCATTAAATTCTCNAAAAAACACACAGGGGACACAGTGTCTGCTTGGA	177
AoHaeIII-16	TG--AGACAA-GCATTAAATTCTCAAAAAA-CACACTGGG-ACACAGTGTCTGCTTGGA	170
AoHaeIII-2	TG--AAACAA-GCATTAAATTCT-AAAAGTAACACACTGGG-ACACAGTGTCTGCTTGGA	172
AoHaeIII-3	TG--AGACAA-GCATTAAATTCT-CAAAGTAAGACACAGGG-ACACAGTGTCTGCTTGGA	175
AoHinfI-8R	TG--AGAAAA-GCATTAAATTCT-CAAAGTAACACACAGGG-ACACTGTGTCTGCTTGGA	145
AoHinfI-10R	TG--AAACAA-GCATTAAATTCT-AAAAGTAACACACTGGG-ACACAGTGTCTGCTTGGA	88
	** * * * ***** * *****	
AoHaeIII-6	ACTATAAGGGGATTGAGG-AAACATGATGTGCATGCATGTTTTGAAAGCAGT-TTGAACA	230
AoHaeIII-24	ACTATAAGGGGATTGAGG-AAACATGATGTGCATGCATGTTTTGAAAGCAGT-TTGAACA	230
AoHaeIII-5	ACTATAAGGGGATTGAG--AAACATGATGTGCATGCATGTTTTGAA-GCAGT-TTGAACA	233
AoHaeIII-16	ACTATAAGGGGATTGAGG-AAACATGATGTGCATGCATGTTTTGAA-GCAGTATTGAACA	228
AoHaeIII-2	ACTATAAGGGGATTGAGG-AAACATGATGTGCATGCATGTTTTGAA-GCAGT-TTGAACA	229
AoHaeIII-3	ACTATAAGGGGATTGAGGAAACATGATGTGCATGCATGTTTTGAA-GCAGT-TTGACCA	233
AoHinfI-8R	ACTATAAGGGGATTGAGG-AAACATGATGTGCATGCATGTTTTGAA-GCAGT-TTGAACA	202
AoHinfI-10R	ACTATAAGGGGATTGAGG-AAACATGATGTGCATGCATGTTTTGAA-GCAGT-TTGAACA	145
	***** ***** *****	
AoHaeIII-6	AAGTGTGTGAAATTACACGCAGACGCTCAGAAAT GG -----	266
AoHaeIII-24	AAGTGTGTGAAATTACACGCAGACGCTCAGAAAT GG -----	266
AoHaeIII-5	AAGTGTG-----	240
AoHaeIII-16	AAGTGTGTGAAATTACACGCAGACGCTCAGAAAT GG ATCCATATTACTAGTTA-----	281
AoHaeIII-2	AAGTGTGTGAAATTACACGCAGACGCTCAGAAAT GG -----	265
AoHaeIII-3	AAGTGTGTGAAATTACACGCAGACGCTCAGAAAT GG -----	269
AoHinfI-8R	AAGTGTGTGAAATTACACGCAGACGCTCAGAAAT GGCC TTATCTCGGCGAGAAAAGCTCG	262
AoHinfI-10R	AAGTGTGTGAAATTACACGCAGACGCTCAGAAAT GGCC TTATCTCGGCGAGAAAAGCTCG	205

AoHaeIII-6	-----	
AoHaeIII-24	-----	
AoHaeIII-5	-----	
AoHaeIII-16	-----	
AoHaeIII-2	-----	
AoHaeIII-3	-----	
AoHinfI-8R	AGAGT 267	
AoHinfI-10R	AGAGT 210	

Os sítios de restrição das enzimas *HaeIII* (**GGCC**) e *HinfI* (**GAGTC**) estão destacados.