
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

GABRIELA PESSENDA

**Estudo da organização e mapeamento
cromossômico do elemento transponível *Rex1*
em espécies do gênero *Astyanax* Baird &
Girard, 1854 (CHARACIFORMES:
CHARACIDAE) provenientes de diferentes
bacias hidrográficas**

Rio Claro

2012

GABRIELA PESSENDA

**Estudo da organização e mapeamento cromossômico do
elemento transponível *Rex1* em espécies do gênero *Astyanax*
Baird & Girard, 1854 (CHARACIFORMES: CHARACIDAE)
provenientes de diferentes bacias hidrográficas**

Orientadora: PATRICIA PASQUALI PARISE-MALTEMPI

Co-orientador: Edson Lourenço da Silva

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho” - Campus de Rio Claro,
para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas

Rio Claro

2012

597 Pessenda, Gabriela
P475e Estudo da organização e mapeamento cromossômico do elemento transponível Rex1 em espécies do gênero *Astyanax* Baird & Girard, 1854 (CHARACIFORMES: CHARACIDAE) provenientes de diferentes bacias hidrográficas / Gabriela Pessenda. - Rio Claro : [s.n.], 2012
42 f. : il., figs., tabs. + CD-ROM

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Patricia Pasquali Parise-Maltempi
Co-orientador: Edson Lourenço da Silva

1. Peixe. 2. Retrotransposons. 3. FISH. 4. Lambari. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| RESUMO..... | 4 |
| 1. INTRODUÇÃO | 6 |
| 1.1. DNAs repetitivos: DNA satélites, minissatélites, microsatélites e elementos de transposição | 7 |
| 1.2. Os elementos de transposição | 8 |
| 1.3. Os elementos de transposição <i>Rex</i> | 9 |
| 1.4. O gênero <i>Astyanax</i> Baird & Girard, 1854..... | 12 |
| 1.5. Justificativa | 12 |
| 2. OBJETIVOS | 14 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 16 |
| 3.1. Materiais | 16 |
| 3.2. Métodos | 16 |
| 3.2.1. Amplificação de DNA via <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR) | 16 |
| 3.2.2. Sequenciamento | 17 |
| 3.2.3. Análise das sequências..... | 17 |
| 3.2.4. Hibridação <i>in situ</i> Fluorescente – FISH (PINKEL et al., 1986) | 18 |
| 4. RESULTADOS | 22 |
| 4.1. Amplificação de DNA via PCR..... | 22 |
| 4.2. Sequenciamento | 22 |
| 4.3. Hibridação <i>in situ</i> Fluorescente – FISH..... | 24 |
| 5. DISCUSSÃO | 28 |
| 5.1. Amplificação do elemento <i>Rex1</i> | 28 |
| 5.2. Análise das sequências de <i>Rex1</i> | 28 |
| 5.3. Hibridação de <i>Rex1</i> em espécies de <i>Astyanax</i> | 29 |
| 6. CONCLUSÃO..... | 33 |
| 7. REFERÊNCIAS | 35 |

RESUMO

O gênero *Astyanax* apresenta uma extensa variabilidade em suas fórmulas cariotípicas, as quais acompanham sua diversidade biológica. Estes dados fazem com que a taxonomia do gênero ainda seja confusa, devido à grande plasticidade fenotípica existente entre as populações e a ausência de caracteres morfológicos confiáveis para sua correta identificação. Por outro lado, a análise das sequências e distribuição cromossômica do retrotransposon *Rex1* revelou pouca variabilidade. As diferenças encontradas com relação às sequências deste retrotransposon mostram que as variações podem estar associadas à distribuição geográfica das espécies, visto que as espécies mais distantes geograficamente revelaram maiores diferenças em sua composição nucleotídica. A distribuição cromossômica desse elemento mostrou-se conservada entre as espécies do gênero, com marcações dispersas pelos genomas dos mesmos, contribuindo com a ideia de que esses elementos podem se acumular em regiões genômicas específicas dentro de cada grupo de peixes, sendo que esta tendência é maior para peixes do mesmo grupo e menor para grupos diferentes. Deste modo, a ampla distribuição de *Rex1* observada nas espécies estudadas sugere que esse elemento pode ter sido incorporado há muito tempo nos genomas desses peixes, e que vem desempenhando um papel importante na evolução do grupo. Ainda assim, devido à grande diversidade encontrada no gênero, mais estudos podem contribuir tanto para o melhor entendimento da taxonomia de *Astyanax*, como da dinâmica evolutiva dos retrotransposons no gênero e em outros grupos de peixes.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O genoma de organismos eucariotos possui grande variedade de sequências, que podem ser simples ou repetitivas. Os DNAs de cópia única ou com poucas cópias constituem a maior parte dos genes funcionais de um organismo, embora algumas sequências moderadamente repetitivas também contenham genes (LONG; DAVID, 1980). Os DNAs repetitivos correspondem a sequências individuais que se repetem várias vezes constituindo grandes frações do genoma eucarioto, podendo representar, por exemplo, cerca de 95% do genoma de cebolas (FLAVELL et al., 1974) e 50% ou mais do genoma humano (LANDER et al., 2001).

As sequências repetitivas já foram denominadas como “DNA lixo” por não apresentarem funções evidentes e não transcreverem produtos codificantes, como proteínas e RNAs (NOWAK, 1994). Já foram também denominadas “DNA egoísta”, que, devido à sua falta de funções, existiriam apenas para a perpetuação de sua existência. Porém, essa idéia começou a mudar com a descoberta de diversas funções dessas regiões, tais como o envolvimento no processo de replicação do DNA (LI et al., 2002), recombinação (BIET et al., 1999), expressão gênica (LIU et al., 2001) e diferenciação de cromossomos sexuais (PARISE-MALTEMPI et al., 2007; CIOFFI; BERTOLLO; CAMACHO, 2010). Além disso, estão também presentes nos centrômeros e telômeros de cromossomos de células eucarióticas, desempenhando funções cruciais na manutenção e propagação do material genético nuclear (MARTINS, 2007).

Essas funções/relações das sequências repetitivas, nos genomas em geral, indicam que as mesmas são importantes para a organização estrutural e funcional do genoma, principalmente pela possibilidade de terem um papel fundamental na evolução destes genomas, especialmente por controlarem a atividade gênica (BIÉMONT; VIEIRA, 2006; MARTINS, 2007).

Em nível cromossômico, as sequências repetitivas podem também estar envolvidas em rearranjos como deleções, duplicações, inversões e translocações recíprocas, sendo responsáveis por proporções significativas das variações cariotípicas observadas em muitos grupos (KIDWELL, 2002).

Embora já tenham sido descritas algumas sequências repetitivas localizadas em diferentes porções de cromossomos de peixes, tais como regiões centroméricas, teloméricas,

regiões consideradas marcadoras específicas de cromossomos sexuais e cromossomos B (LANFREDI et al., 2001; PARISE-MALTEMPI et al., 2007; FERREIRA; MARTINS, 2008, POLETTO; FERREIRA; MARTINS, 2010), ainda há muito a se entender sobre elas neste grupo animal.

1.1. DNAs repetitivos: DNA satélites, minissatélites, microsatélites, elementos de transposição e famílias multigênicas

DNAs repetitivos são constituídos por sequências de diferentes comprimentos e composição, que aparecem repetidas diversas vezes no genoma, e podem ou não ser codificadoras. Entre as sequências repetitivas não codificadoras estão os DNAs repetitivos arranjados *in tandem*, compostos pelos DNAs satélites (DNA altamente repetitivo), as sequências minissatélites e microsatélites (DNA moderadamente repetitivo) e as sequências repetitivas dispersas no genoma, compostas por transposons e retrotransposons (CHARLESWORTH; SNLEGOWSKI; STEPHAN, 1994; KIDWELL, 2002). Já as sequências codificadoras compreendem as famílias multigênicas (NEI; ROONEY, 2005; FARAH, 2007).

As famílias multigênicas indicam um grupo de genes com notável similaridade estrutural e funcional, quanto ao número e organização dos pares de bases nitrogenadas, embora eles possam exibir diferentes funções, sendo descendentes de um gene ancestral comum (NEI; ROONEY, 2005; FARAH, 2007). Como exemplos pode-se citar os genes de RNAs ribossomais (RNAr) e genes codificadores de proteínas histônicas (CABRAL-DE-MELLO, 2011).

DNAs satélites são sequências não codificadoras arranjadas *in tandem*, que podem variar de 100 a 300 pb. Organizam-se em conjuntos e, normalmente, estão localizadas próximas a regiões heterocromáticas dos cromossomos, principalmente centroméricas e teloméricas (CHARLESWORTH; SNLEGOWSKI; STEPHAN, 1994; MARTINS, 2007).

Os minissatélites são arranjos *in tandem*, com regiões repetitivas de 10 a 100 pb dispersas através do genoma, que se concentram em regiões próximas aos telômeros. Já os microsatélites consistem em sequências curtas (2 a 4 pb), também organizadas *in tandem* (RAMEL, 1997; MARTINS, 2007).

Os elementos de transposição, também chamados de *jumping genes*, podem mudar de posição dentro do genoma e alterar funções de genes associados (KAZAZIAN; MORAN,

1998; BIÉMONT; VIEIRA, 2006; FERREIRA). Dentro desse grupo existem duas classes principais: os transposons, que se movimentam como uma molécula de DNA pelo genoma; e os retrotransposons, que se movimentam via um RNA intermediário (CHARLESWORTH; SNLEGOWSKI; STEPHAN, 1994; VOLFF; KÖRTING; SCHARTL, 2000; BÖHNE et al., 2008). Os retrotransposons podem ainda ser divididos em LTR retrotransposons (*long terminal repeat*) ou LINEs (*long interspersed element*), por possuírem longas repetições terminais em suas cadeias, e non-LTR retrotransposons ou SINEs (*short interspersed elements*), por não possuírem essas repetições em suas cadeias (DEININGER et al., 1992; VOLFF et al., 2001; BIÉMONT; VIEIRA, 2006). Os SINEs variam em tamanho de 90 a 400 pb, enquanto que os LINEs podem ser maiores que 7.000 pb (DEININGER et al., 1992).

1.2. Os elementos de transposição

Dentre os tipos de elementos de transposição, os transposons podem influenciar a trajetória evolutiva do seu hospedeiro de três formas diferentes: (1) através de alterações na função gênica, devido às movimentações dos transposons que se inserem nos genes; (2) através da indução de rearranjos cromossômicos; (3) e como fonte de material codificante e não codificante, o que permite o aumento na variabilidade genética (FESCHOTTE; PRITHAM, 2007). Alguns trabalhos classificam os retrotransposons como os principais responsáveis pelo aumento ou diminuição do tamanho do genoma de eucariotos multicelulares (DASILVA et al., 2002; FESCHOTTE; PRITHAM, 2007).

Ainda não existe um fator único responsável pelo tamanho dos genomas, a discrepância entre o tamanho dos mesmos e sua quantidade de genes deu origem ao chamado “paradoxo do valor C”. Existem disponíveis várias estimativas do tamanho dos genomas de diversas espécies, porém dados sobre o tamanho ocupado pelos elementos transponíveis ainda são escassos (KIDWELL, 2002). Segundo Kidwell (2002), a proporção dos genomas ocupada por esses elementos pode variar de 2% no baiacu *Takifugu rubripes* a mais de 50% em gramíneas, como milho e cevada. Aparentemente, as famílias de elementos transponíveis podem sofrer alterações rapidamente nas espécies, e conseqüentemente, a proporção do genoma ocupada por eles deixa de ser constante dentro da espécie, ou mesmo de uma população local (KIDWELL, 2002).

Em contrapartida, o trabalho de Volff e colaboradores (2003) revelou que não há correlação entre o genoma compactado de *Takifugu rubripes* e a menor diversidade de

retrotransposons, uma vez que o genoma de *T. rubripes* é quatro vezes menor, e com quantidade semelhante de genes e clados de retrotransposons que o genoma do *zebrafish* *Danio rerio*, com o genoma quatro vezes maior e quantidade semelhante de genes (VOLFF et al., 2003). De qualquer maneira, os elementos transponíveis podem representar um mecanismo muito importante na variação e adaptação dos genomas, de acordo com a ação da seleção natural (KIDWELL, 2002).

Existem poucos estudos sobre o impacto genômico dos retroelementos em vertebrados, embora resultados venham mostrando que o papel desses elementos na geração de variações genéticas tem sido importante para a evolução da estrutura genômica e funcionamento gênico nos vertebrados e outros organismos (FESCHOTTE; PRITHAM, 2007). Dados revelam que a maioria dos retrotransposons está presente nos vertebrados e que grande parte deles foi transmitida verticalmente, através de herança. Desse modo, múltiplos clados de retrotransposons provavelmente foram perdidos na linhagem dos tetrápodes, antes da divergência entre camundongos e humanos, porém mantidos na linhagem dos teleósteos (VOLFF et al., 2003).

Do ponto de vista cromossômico, estudos recentes têm mostrado que transposons e retrotransposons podem estar arranjados em *clusters*, sendo assim facilmente visualizados nos cromossomos através de técnicas de citogenética molecular, como a hibridação *in situ* fluorescente (VOLFF; KÖRTING; SCHARTL, 2000; FERREIRA; MARTINS, 2008; GROSS et al., 2009; MAZZUCHELLI; MARTINS, 2009; VALENTE et al., 2011).

1.3. Os elementos de transposição *Rex*

Quando se considera a diversidade de espécies de peixes distribuídas em ambientes aquáticos continentais, existem poucas informações sobre a organização molecular e a localização cromossômica dos elementos transponíveis.

As sequências denominadas *Rex1*, *Rex3* e *Rex6*, identificadas como retrotransposons (non-LTR), foram isoladas, pela primeira vez, do peixe modelo *Xiphophorus* e parecem ser amplamente distribuídas nos genomas de outros peixes. A sequência *Rex3* está relacionada à família RTE, que tem como características essenciais regiões que codificam uma endonuclease e uma transcriptase reversa, a maioria das cópias truncadas, uma cauda consistindo de sequências GATG repetidas *in tandem* e curtos sítios alvos de duplicação de comprimento variável (VOLFF et al., 1999). O elemento *Rex6* é um membro da família de

retrotransposons R4, e codifica uma transcriptase reversa e uma enzima de restrição semelhante à endonucleases (VOLFF et al., 2001). O retrotransposon *Rex1*, objeto deste estudo, é uma família de non-LTR, que parece estar relacionado como o clado CR1 dos LINEs, e codifica uma transcriptase reversa e uma endonucleaseapurínica/apiridímic, que é frequentemente removida pela transcrição reversa incompleta (VOLFF; KÖRTING; SCHARTL, 2000).

Estudos envolvendo a família dos *Rex* vêm sendo desenvolvidos em diferentes espécies de peixes. Os resultados demonstraram importantes informações a respeito da evolução destes elementos, como as contidas no trabalho de Deininger e colaboradores (1992), as quais sugerem a presença de numerosas ondas de retrotransposições independentes, que ocorreram a partir de cópias distintas ancestrais, durante a evolução dos genomas. Volff, Körting e Schartl (2000) detectaram um mínimo de dez surtos de transposições principais que podem ter ocorrido durante a evolução dos peixes.

Em estudos realizados em peixes da família Loricariidae, Ferreira, Oliveira e Foresti (2011a) observaram que os retrotransposons *Rex1* e *Rex3* possuem sequências gênicas semelhantes em peixes de diferentes ordens. Esses autores mostraram também que estes dois retrotransposons estão distribuídos por todos os cromossomos das espécies analisadas, incluindo regiões eucromáticas e heterocromáticas, sugerindo que ambas possam estar evoluindo juntas ou através de um mesmo mecanismo (FERREIRA; OLIVEIRA; FORESTI, 2011a).

Um estudo realizado com peixes da Antártica, envolvendo treze espécies de cinco famílias de peixes da subordem Notothenioidei (Bovichtidae, Nototheniidae, Artedidraconidae, Bathydraconidae e Channichthyidae), bem como os retrotransposons *Rex1*, *Rex3* e *Rex6*, mostrou que tanto *Rex1* como *Rex3*, separadamente, formam grupos monofiléticos claramente distintos de elementos correspondentes em outras espécies de peixes (OZOUF-COSTAZ et al., 2004). Provavelmente esses retrotransposons resultaram de ondas de retrotransposição ocorridas após a separação dos grupos de notothenioides de outros grupos de peixes, especialmente dos ciclídeos *Cichlasoma labridens* e *Oreochromis niloticus*, que pertencem à mesma subordem (OZOUF-COSTAZ et al., 2004). Os resultados sugerem ainda que estes elementos permanecem ativos no genoma de peixes antárticos recentes, e o grau de identidade entre as cópias de nucleotídeos interespecíficos pode indicar que a divergência ocorrida entre as espécies estudadas não é tão antiga (OZOUF-COSTAZ et al., 2004).

Mazzuchelli (2008) analisou sequências de *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* e demonstrou que as sequências de *Rex1* e *Rex3* apresentaram similaridade com sequências do genoma de uma variedade de espécies de peixes, distribuídos por várias ordens, como Perciformes, Cyprinodontiformes e Tetraodontiformes. Estes resultados confirmaram estudos já publicados, de que estes elementos estão amplamente distribuídos no genoma de peixes (VOLFF; KÖRTING; SCHARTL, 2000; OZOUF-COSTAZ et al., 2004). O elemento *Rex6* revelou similaridade com sequências de peixes, e também com sequências de organismos de outros grupos, como répteis, *Geochelone pardalis*; plantas, *Arabidopsis lyrata*, *Zostera marina*; micro-organismos, *Prunus necrotic*; primatas, *Lepilemur dorsalis*; e com a espécie humana, *Homo sapiens*. Os dados sugerem que este elemento encontra-se conservado nos diferentes grupos de eucariotos (MAZZUCHELLI, 2008).

Devido à grande diversidade na organização dos elementos transponíveis pode-se supor que o fato de apresentarem um número diferenciado de cópias nas diferentes espécies, justifica os diversos padrões encontrados nos peixes estudados até o presente. E embora existam diferenças entre espécies diferentes, dentro de uma mesma espécie os elementos transponíveis parecem se comportar da mesma maneira (FERREIRA et al., 2011c).

Dados da literatura mostram que os peixes parecem possuir grande número de famílias de retrotransposons, e grande parte pode não ser encontrada em outros vertebrados (VOLFF; KÖRTING; SCHARTL, 2000; VOLFF et al., 2003; OZOUF-COSTAZ et al., 2004). Diante desse fato e dos resultados decorrentes da análise dos transposons em peixes, fica evidente que os peixes representam um grupo bastante importante para o estudo do impacto de elementos retrotransponíveis no genoma de vertebrados, especialmente para os elementos retrotransponíveis que estão ausentes em mamíferos (OZOUF-COSTAZ et al., 2004).

Mesmo com as diversas evidências de que os elementos transponíveis podem desempenhar importante papel na diversidade genômica de vertebrados, o conhecimento atual ainda representa pequena fração do conhecimento, e pouco ainda se sabe sobre o impacto evolutivo dos elementos transponíveis em peixes e outras linhagens de vertebrados (BÖHNE et al, 2008). Dessa forma muitos estudos ainda são necessários para o melhor entendimento da dinâmica destes elementos.

1.4. O gênero *Astyanax* Baird & Girard, 1854

O gênero *Astyanax* Baird & Girard, 1854 foi classificado como *Incertae sedis*, dentro de Characidae, devido à falta de evidências morfológicas consistentes que garantam o monofiletismo do grupo (LIMA et al., 2003), esta família pertence a ordem Characiformes (FINK; FINK, 1981) e agrupa os peixes conhecidos popularmente como “lambaris”. É um dos maiores gêneros em número de espécies dentre os peixes Neotropicais, com cerca de 100 espécies descritas (LIMA et al., 2003; HALUCH; ABILHOA, 2005; MELO; BUCKUP, 2006; BERTACO; GARUTTI, 2007).

As espécies do gênero *Astyanax* estão amplamente distribuídas desde o sul dos Estados Unidos à região central da Argentina, ocupando diversos habitats e sendo um dos gêneros mais complexos entre os peixes de água doce da região Neotropical. Possui uma distribuição compartimentalizada – o que sugere endemismo –, sendo que cada bacia possui formas diferentes, e dentro de cada bacia há relatos da existência de diversas formas com distribuição geográfica restrita (GARUTTI, 1995). A sistemática do gênero ainda não está resolvida, principalmente devido à falta de evidências que corroborem seu status monofilético (WEITZMAN; FINK, 1983; ZANATA, 1995; WEITZMAN; MALABARBA, 1998; MELO; BUCKUP, 2006; BERTACO; GARUTTI, 2007) e devido à grande plasticidade fenotípica existente entre populações e a ausência de caracteres morfológicos confiáveis para sua correta identificação (VICARI et al., 2010). Sendo assim, pode tratar-se de linhagens evolutivas diferentes e independentes (WEITZMAN; FINK, 1983; ZANATA, 1995; WEITZMAN; MALABARBA, 1998; MELO; BUCKUP, 2006; BERTACO; GARUTTI, 2007).

1.5. Justificativa

Os estudos citogenéticos vêm auxiliando o entendimento da taxonomia de diferentes grupos de peixes, permitindo a caracterização de cariótipos e suas relações evolutivas (PAZZA, 2005). Considerando a ampla ocorrência das espécies do gênero *Astyanax* e na tentativa de contribuir tanto com informações sobre a classificação do gênero, como com o melhor entendimento a respeito da dinâmica das sequências transponíveis em peixes, os estudos sobre a organização genômica dos elementos transponíveis, como o *Rex1*, poderão contribuir com informações importantes quanto à evolução do grupo e à evolução dessas sequências no genoma das espécies analisadas.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Os objetivos do trabalho foram isolar e caracterizar as sequências do elemento transponível *Rex1* em espécies do gênero *Astyanax* provenientes de rios das bacias do Alto e Baixo Rio Paraná (*A. eigenmanni* Cope, 1894, *A. fasciatus* Cuvier, 1819, *A. paranae* Eigenmann, 1914, *A. altiparanae* Garutti; Britski, 2000), do rio Paraguai (*A. asuncionensis* Géry, 1972) e dos rios da América do Norte e Central (*A. mexicanus* De Filippi, 1853) e mapear sua distribuição cromossômica no genoma dessas espécies, com o intuito de encontrar se existem variações nos retrotransposons entre as diferentes espécies.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

Foram utilizadas preparações citogenéticas e DNA genômico de seis espécies do gênero *Astyanax*: *A. altiparanae*, *A. asuncionensis*, *A. eigenmanniorum*, *A. fasciatus*, *A. mexicanus* e *A. paranae*. Esses materiais foram obtidos da coleção de DNA genômico e preparações citogenéticas já existentes no laboratório de citogenética da UNESP Rio Claro. Para a obtenção de cromossomos mitóticos foi utilizada a técnica descrita por EGOZCUE (1971) e CESTARI (1973) modificada por BERTOLLO e colaboradores (1978).

3.2. Métodos

3.2.1. Amplificação de DNA via *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Os fragmentos obtidos foram amplificados através de *primers* específicos desenhados para a amplificação de *Rex1* em *Astyanax*, com base nas sequências obtidas por um sequenciamento prévio das amostras. Os *primers* desenhados foram *Rex1As F* – 5' CCT GGA TCA CTG ACT ACC T e *Rex1As R* - 5' CAC ACC AAG GTA TTT GTA GG. A amplificação das amostras seguiu o protocolo descrito abaixo.

| Soluções | Volume/Amostra |
|--|----------------|
| Mix PCR (<i>Qiagen</i>) | 12,5µL |
| Água Mili Q | 8,5µL |
| <i>Primer F</i> 10mM (<i>Invitrogen</i>) | 1,0µL |
| <i>Primer R</i> 10mM (<i>Invitrogen</i>) | 1,0µL |
| DNA | 2,0µL |
| Volume final | 25µL |

A reação de PCR seguiu as condições gerais de desnaturação inicial a 95°C durante 5 minutos, 34 ciclos de desnaturação a 95°C por 40 segundos, anelamento a 55°C por 40

segundos, alongação a 72°C por 2 minutos, e extensão final a 72°C durante 5 minutos, com temperatura de manutenção a 12°C.

A visualização dos resultados foi realizada com 2µL de produtos de PCR e 1µL de tampão de corrida *Orange Juice*, aplicados em gel de agarose 1,0%, corado com SYBER Safe (*Invitrogen*). O gel foi visualizado em transiluminador de luz ultravioleta, para verificação da qualidade dos fragmentos amplificados. O tamanho do produto gênico amplificado foi visualizado com o uso do marcador de peso molecular de 1Kb da *Ludwig Biotec*.

Foram amplificadas amostras de três indivíduos *A. mexicanus*, cinco indivíduos *A. paranae*, *A. eigenmanniorum* e *A. asuncionensis* e seis indivíduos *A. altiparanae* e *A. fasciatus*, de acordo com a disponibilidade de amostras no laboratório.

3.2.2. Sequenciamento

As amostras amplificadas com os novos *primers* foram enviadas para o sequenciamento na Macrogen Inc. em Seoul, na Coreia.

Os produtos de PCR foram purificados através do tratamento com a enzima ExoSAP-IT (*GE Healthcare*TM), utilizando-se 10µL de produto de PCR, 2µL da enzima ExoSAP-IT e 2µL de H₂O. A reação ocorreu em um ciclo de 60 minutos a 37°C seguido por um ciclo de 15 minutos a 80°C.

Após a purificação, as amostras foram enviadas à Macrogen Inc., empresa coreana que realiza um serviço de sequenciamento terceirizado. Na empresa foram realizadas as reações de sequenciamento e purificação da reação. O equipamento utilizado foi o MEGABACE 1000 (*GE HealthCare*TM), com uso do kit DYEnamic ET *terminator reagent premix* para MEGABACE (*Amersham Biociences*).

3.2.3. Análise das sequências

As sequências foram editadas com o uso do programa BioEdit (HALL, 1999). Foram retiradas as extremidades de baixa qualidade e substituídas as bases “N”, que não haviam sido identificadas pelo sequenciador, através da comparação de bases entre o sequenciamento *forward* e *reverse* e entre as sequências das diferentes espécies. Em seguida, as sequências foram alinhadas através da ferramenta ClustalW.

A ferramenta BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool* (ALTSCHUL et al., 1990), do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), *website* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) foi utilizada para comparação das sequências obtidas com outras já depositadas no banco de dados.

Para a análise da composição nucleotídica e distância genética foi utilizado o programa MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) (TAMURA et al., 2007). Foram analisadas as sequências de três indivíduos *A. mexicanus*, cinco indivíduos *A. paranae*, *A. eigenmanniorum* e *A. asuncionensis* e seis indivíduos *A. altiparanae* e *A. fasciatus*.

3.2.4. Hibridação *in situ* Fluorescente – FISH (PINKEL et al., 1986)

A técnica de FISH foi realizada com marcação das sondas por PCR com biotina ou digoxigenina. Segue abaixo o protocolo utilizado:

Marcação da sonda por PCR

29µL de H₂O
 1µL do produto de PCR
 1µL de *primer Rex1As F* (10mM - *Invitrogen*)
 1µL de *primer Rex1As R* (10mM - *Invitrogen*)
 0,5µL de Taq Polimerase
 5µL de tampão
 8µL de MgCl₂ (25mM)
 1µL de dATP (2mM)
 1µL de dGTP (2mM)
 1µL de dCTP (2mM)
 0,5µL de dTTP (2mM)
 1µL de digoxigenina ou biotina (1mM - *Roche*)
Volume final: 50µL

O programa para a marcação da sonda por PCR seguiu as condições gerais de desnaturação inicial a 95°C durante 5 minutos, 34 ciclos de desnaturação a 95°C por 40 segundos, anelamento a 55°C por 40 segundos, alongação a 72°C por 2 minutos, e extensão final a 72°C durante 5 minutos, com temperatura de manutenção a 12°C.

Tratamento das lâminas

1. As lâminas foram incubadas em solução de Pepsina 0,005% a 37°C por aproximadamente 10 minutos e lavadas 2x por 2 minutos em 2xSSC.
2. As lâminas foram incubadas em 100µl de RNase (0,4% RNase/2xSSC) a 37° C por 1 hora em câmara úmida e lavadas 3x por 5 minutos em 2xSSC. Cada lâmina foi então desidratada em série alcoólica a 70, 90 e 100% por 5 minutos e secas a temperatura ambiente.

Desnaturação dos cromossomos

3. O DNA cromossômico foi desnaturado com formamida 70% em 2xSSC, a 70°C por 2 minutos.
4. Cada lâmina foi desidratada em série alcoólica (gelada a -20°C) a 70, 90 e 100% por 5 minutos e secas a temperatura ambiente.

Desnaturação da sonda

5. Foram utilizados 5µL da sonda marcada precipitada e 12µL do tampão de hibridação (*Hybuffer*) por lâmina. A desnaturação foi realizada em termociclador a 95°C por 10 minutos. A hibridação se deu a 37°C *overnight* em câmara úmida.
6. As lamínulas foram removidas e as lâminas lavadas em 2xSSC, pH 7,0 a 72°C, em banho sem agitação por 5 minutos.
7. Em seguida, foram transferidas para 1xPBD (20mL 20xSSC, 1mL Triton 100x, 1g de leite em pó, água destilada q.s.p. 100mL) em temperatura ambiente, por 15 minutos, para proceder a detecção.

Detecção de sondas marcadas com digoxigenina

8. Cada lâmina foi incubada com 30µL de anticorpo anti digoxigenina rodamina (4µL de anti digoxigenina rodamina (*Roche*) e 26µL de tampão de bloqueio (1mL 2xSSC, 10µL Triton 100x, 0,05g de leite em pó, centrifugado a 10.000 rpm por 5 minutos) durante 45 minutos em câmara escura a 37° C.
9. As lâminas foram lavadas três vezes em 1xPBD a 45°C, por 5 minutos cada lavagem.

Montagem das lâminas

10. As lâminas foram montadas com 15µL de solução de DAPI + *antifading* (*Vectashield*) e armazenadas em geladeira no escuro.

Detecção de sondas marcadas com biotina

11. Cada lâmina foi incubada com 1,5 μ L:400 μ L (Avidina-FITC:PBD). Foram utilizados 0,04 μ L de Avidina-FITC e 100 μ L de PBD, durante 45 minutos em câmara escura a 37° C.
12. As lâminas foram lavadas três vezes em 1xPBD a 45°C, por 5 minutos cada lavagem.
13. Foram aplicados 1 μ L de Anti-Avidina e 40 μ L de PBD e incubados por 15 minutos em câmara úmida a 37°C.
14. As lamínulas foram removidas e as lâminas lavadas 3x em 1xPBD a 45°C por 5 minutos cada lavagem.
15. Novamente foram aplicados 0,04 μ L de Avidina-FITC e 100 μ L de PBD, durante 15 minutos em câmara escura a 37° C.
16. As lamínulas foram removidas e as lâminas lavadas 3x em 1xPBD a 45°C por 5 minutos cada lavagem.

Montagem das lâminas

17. As lâminas foram montadas com 15 μ L de solução DAPI + *antifading* e armazenadas em geladeira no escuro.

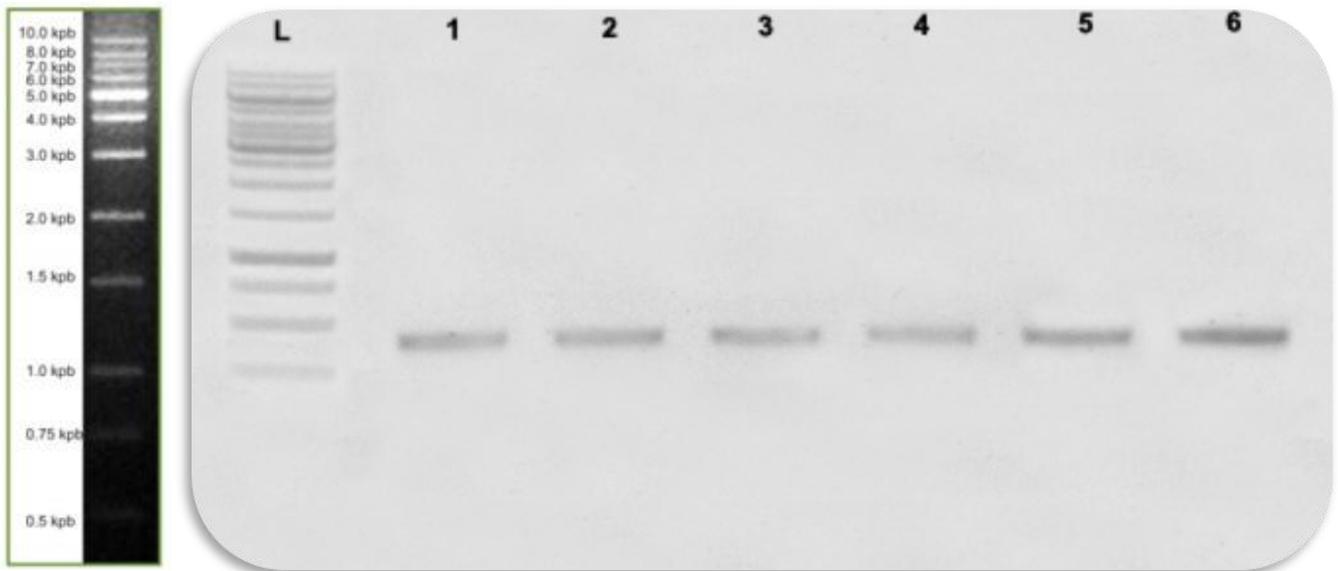
RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Amplificação de DNA via PCR

A partir da amplificação com os *primers Rex1As* desenhados, obteve-se bandas específicas e com aproximadamente 600 pb, para todos os indivíduos analisados (Figura 1).

Figura 1 - Gel de agarose com os produtos amplificados de *Rex1* em diferentes espécies de *Astyanax*. L) *Ladder* 1Kb; (1) *A. altiparanae*; (2) *A. fasciatus*; (3) *A. paranae*; (4) *A. asuncionensis*; (5) *A. mexicanus*; (6) *A. eigenmanniorum*. Detalhe a esquerda do gel, *ladder* da Ludwig Biotec 1 Kb, 0,1 µg/µl.



4.2. Sequenciamento

Foram sequenciadas com sucesso as amostras de todos os indivíduos. Obtiveram-se sequências parciais de aproximadamente 353 pb cada uma, com 3 posições variáveis e 350 posições conservadas. A composição média de nucleotídeos e a variação nas sequências dos diferentes indivíduos analisados podem ser encontradas nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

Tabela 1 - Tabela com a composição nucleotídica das sequências de *Rex1* nas espécies de *Astyanax*. O destaque vermelho mostra as variações em comparação com a maioria das sequências.

| | T(U) | C | A | G | Total |
|------------------------------|-------------|----------|----------|----------|--------------|
| <i>A.mexicanus</i> 1108 | 21,8 | 24,9 | 26,6 | 26,6 | 353,0 |
| <i>A.mexicanus</i> 1105 | 21,8 | 24,9 | 26,6 | 26,6 | 353,0 |
| <i>A.mexicanus</i> 1106 | 21,8 | 24,9 | 26,6 | 26,6 | 353,0 |
| <i>A.altiparanae</i> 923 | 21,5 | 25,2 | 26,3 | 26,9 | 353,0 |
| <i>A.altiparanae</i> 1157 | 21,5 | 25,2 | 26,3 | 26,9 | 353,0 |
| <i>A.altiparanae</i> 1639 | 21,5 | 25,2 | 26,3 | 26,9 | 353,0 |
| <i>A.altiparanae</i> 833 | 21,5 | 25,2 | 26,3 | 26,9 | 353,0 |
| <i>A.altiparanae</i> 834 | 21,5 | 25,2 | 26,3 | 26,9 | 353,0 |
| <i>A.altiparanae</i> 836 | 21,5 | 25,2 | 26,3 | 26,9 | 353,0 |
| <i>A.fasciatus</i> 932 | 21,5 | 25,2 | 26,3 | 26,9 | 353,0 |
| <i>A.fasciatus</i> 1159 | 21,5 | 25,2 | 26,3 | 26,9 | 353,0 |
| <i>A.fasciatus</i> 912 | 21,5 | 25,2 | 26,3 | 26,9 | 353,0 |
| <i>A.fasciatus</i> 913 | 21,5 | 25,2 | 26,3 | 26,9 | 353,0 |
| <i>A.fasciatus</i> 933 | 21,5 | 25,2 | 26,3 | 26,9 | 353,0 |
| <i>A.fasciatus</i> 1156 | 21,5 | 25,2 | 26,3 | 26,9 | 353,0 |
| <i>A.paranae</i> 1080 | 21,5 | 25,2 | 26,3 | 26,9 | 353,0 |
| <i>A.paranae</i> 1079 | 21,5 | 25,2 | 26,3 | 26,9 | 353,0 |
| <i>A.paranae</i> 995 | 21,5 | 25,2 | 26,3 | 26,9 | 353,0 |
| <i>A.paranae</i> 993 | 21,5 | 25,2 | 26,3 | 26,9 | 353,0 |
| <i>A.paranae</i> 994 | 21,5 | 25,2 | 26,3 | 26,9 | 353,0 |
| <i>A.asuncionensis</i> 36 | 21,5 | 25,2 | 26,3 | 26,9 | 353,0 |
| <i>A.asuncionensis</i> 1013 | 21,5 | 25,2 | 26,3 | 26,9 | 353,0 |
| <i>A.asuncionensis</i> 983 | 21,5 | 25,2 | 26,1 | 27,2 | 353,0 |
| <i>A.asuncionensis</i> 984 | 21,5 | 25,2 | 26,1 | 27,2 | 353,0 |
| <i>A.asuncionensis</i> 985 | 21,5 | 25,2 | 26,1 | 27,2 | 353,0 |
| <i>A.eigenmanniorum</i> 958 | 21,5 | 25,2 | 26,3 | 26,9 | 353,0 |
| <i>A.eigenmanniorum</i> 959 | 21,5 | 25,2 | 26,3 | 26,9 | 353,0 |
| <i>A.eigenmanniorum</i> 960 | 21,5 | 25,2 | 26,3 | 26,9 | 353,0 |
| <i>A.eigenmanniorum</i> 961 | 21,5 | 25,2 | 26,3 | 26,9 | 353,0 |
| <i>A.eigenmanniorum</i> 1107 | 21,5 | 25,2 | 26,3 | 26,9 | 353,0 |
| Média | 21,6 | 25,2 | 26,3 | 26,9 | 353,0 |

Figura 2 - Gel de agarose evidenciando produto de *A. altiparanae* amplificado (1) e sonda de *A. altiparanae* marcada com biotina (2). Notar que a sonda fica um pouco acima do produto de PCR. *Ladder Ludwig Biotec* (L).

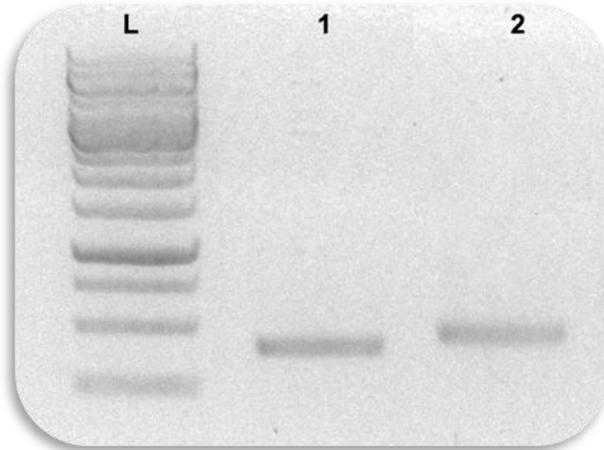


Figura 3 - Localização de *Rex1* em cromossomos de *A. altiparanae* (A-C), sonda marcada com biotina, filtro para DAPI (A), filtro para biotina (B), imagens sobrepostas (C); e *A. asuncionensis* (D-F), sonda marcada com digoxigenina, filtro para DAPI (D), filtro para digoxigenina (E), imagens sobrepostas (F). Escala corresponde a 10,0 μm .

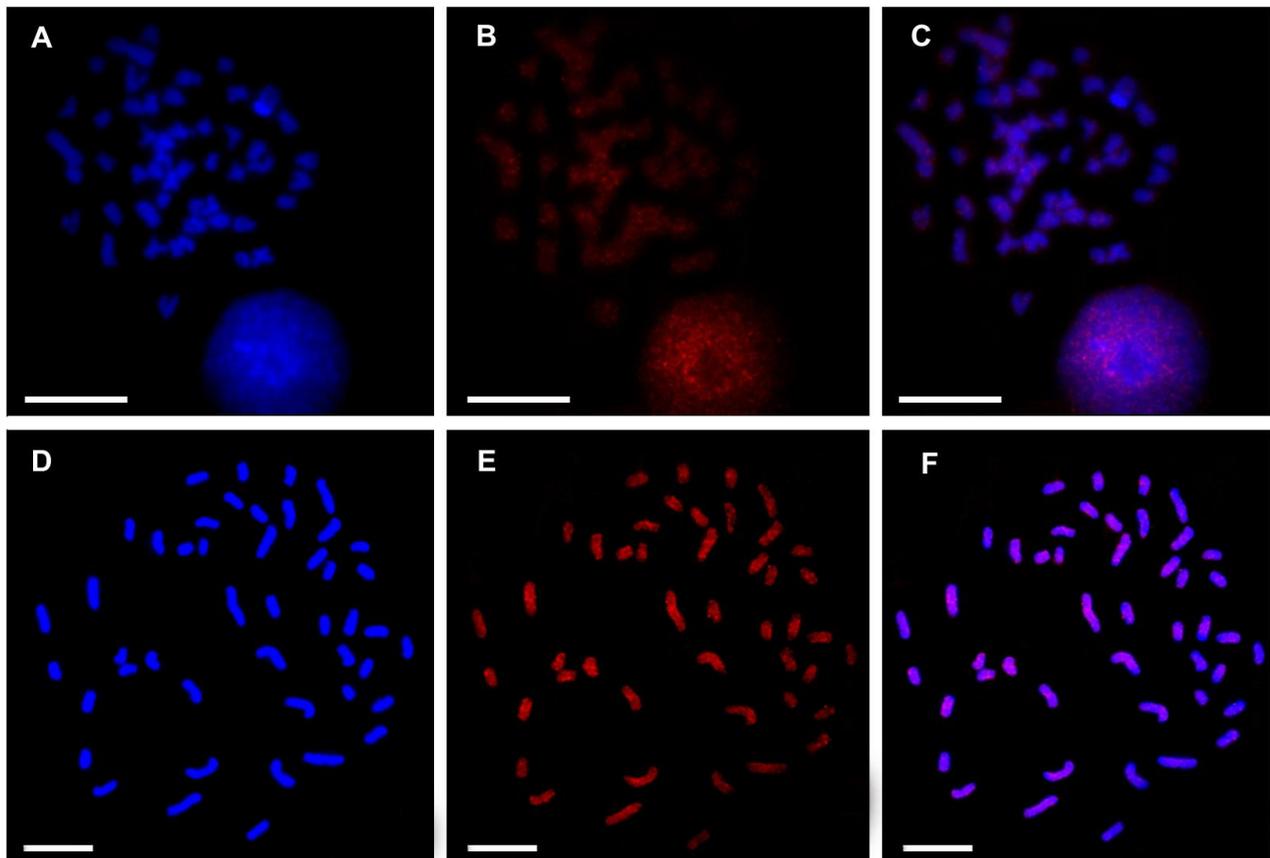
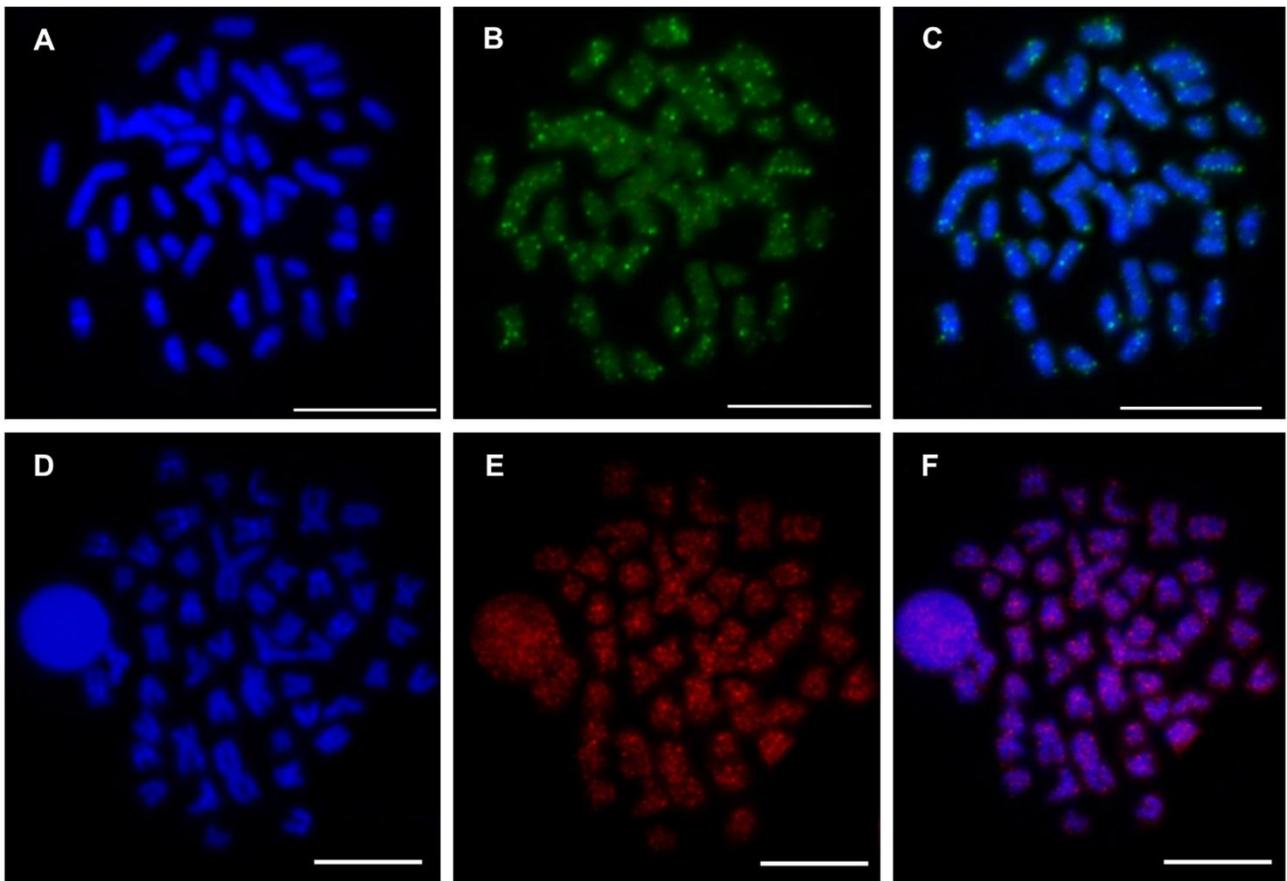


Figura 4 - Localização de *Rex1* em cromossomos de *A. eigenmanniorum* (A-C), sonda marcada com digoxigenina; filtro para DAPI (A), filtro para digoxigenina (B), imagens sobrepostas (C); e *A. fasciatus* (D-F), sonda marcada com digoxigenina, filtro para DAPI (D), filtro para biotina (E), imagens sobrepostas (F). Escala corresponde a 10,0 μ m.



DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

5.1. Amplificação do elemento *Rex1*

O tamanho dos fragmentos obtidos no presente trabalho foi de 600 pb e ficou próximo aos tamanhos de *Rex1* obtidos em outros trabalhos, como 530 pb em Ozouf-Costaz e colaboradores (2004); 650 pb em Mazzuchelli (2008); 560 pb em Valente e colaboradores (2011); 550 pb em Ferreira, Oliveira e Foresti (2011a); e semelhante ao encontrado por Teixeira e colaboradores (2009), com 600 pb.

5.2. Análise das sequências de *Rex1*

A comparação das sequências parciais obtidas, com sequências depositadas no *GenBank* apresentaram homologia de 65 a 73% com o fragmento de *Rex1* de diferentes espécies de peixes.

As diferenças interespecíficas dentro da mesma linhagem podem ocorrer, com variações nas cópias e números de elementos de transposição, as quais podem ocorrer tanto devido à atividade do elemento transponível, como devido à sua frequência de eliminação (BÖHNE et al., 2008). Essas diferenças podem ser decorrentes de sucesso diferencial nas transposições ou taxas de eliminação de um elemento ancestral em diferentes linhagens; transferência horizontal de um elemento transponível em linhagens específicas; ou criação de novos tipos de elementos transponíveis linhagem-específicos (BÖHNE et al., 2008).

A análise das sequências mostrou que são conservadas entre as diferentes espécies de *Astyanax* estudadas. A filogenia dos *Rex1* mostra que as sequências deste elemento são mais relacionadas entre sequências da mesma espécie de peixes do que com espécies diferentes (VOLFF; KÖRTING; SCHARTL, 2000), indicando a presença de ondas independentes de retrotransposição que ocorrem entre cópias diferentes durante a evolução dos genomas (DEININGER et al., 1992). As variações encontradas foram entre as sequências de *A. mexicanus* e o restante de *Astyanax*, o que pode ser explicado pela maior distância geográfica que se encontra esta espécie, demonstrando que a variação na composição nucleotídica pode estar relacionada com a distribuição geográfica dessas espécies.

Outra variação encontrada foi dentro da espécie *A. asuncionensis*. Foram analisadas cinco sequências de *A. asuncionensis*, sendo que duas pertenciam a um lote de amostras mais recentes e três a um lote mais antigo. As amostras mais antigas apresentaram variação em um par de bases em relação às amostras mais novas. Este fato pode ser explicado por mutações que esta população possa ter sofrido, pois esta variação não foi encontrada em mais nenhuma das sequências analisadas para as outras espécies, ou por erros no sequenciamento.

Embora tenham sido encontradas pequenas variações, a alta similaridade entre as sequências pode indicar a ampla distribuição do elemento *Rex1* no genoma de espécies de *Astyanax*.

5.3. Hibridação de *Rex1* em espécies de *Astyanax*

Diversos elementos transponíveis já foram estudados dentro do grupo dos peixes, sendo que 15 deles já foram mapeados fisicamente no genoma de 28 espécies de diferentes ordens. Destas 28 espécies, 11 apresentam os elementos *Rex* associados à heterocromatina, incluindo cromossomos supranumerários, e 17 estão dispersos pelos cromossomos (FERREIRA et al., 2011c).

Através da hibridação *in situ* fluorescente foi possível notar que a distribuição do *Rex1* em *Astyanax* mostrou-se bastante dispersa por todos os cromossomos das espécies analisadas. Esse padrão de distribuição é bastante comum em outras espécies, como as famílias *Alu* e *L1* em humanos (LICHTER et al., 1990 apud FERREIRA; OLIVEIRA; FORESTI, 2011a), os transposons *mariner* de abelhas (EBERT, HILEMAN; NGUYEN, 1995 apud FERREIRA; OLIVEIRA; FORESTI, 2011a) e os *Ty1-copia* em plantas (BRANDES et al., 1997 apud FERREIRA; OLIVEIRA; FORESTI, 2011a). A distribuição de *Rex1* foi semelhante à encontrada por Ferreira, Oliveira e Foresti (2011a) em três espécies da subfamília Hypoptopomatinae, na qual estes retrotransposons foram encontrados tanto em regiões heterocromáticas como euromáticas. Os autores explicam que essa diferença de distribuição, em relação a outros resultados já encontrados, pode ocorrer por padrões diferentes de distribuição entre ordens de peixes distintas, ou por diferentes condições de hibridação utilizadas nos experimentos dos diferentes estudos, como nos casos de alta stringência, por exemplo, onde os sinais podem ser mascarados (FERREIRA; OLIVEIRA; FORESTI, 2011a).

Utsunomia e colaboradores (2011) mapearam os elementos *Rex1* e *Rex3* no genoma do muçum *Synbranchus marmoratus* e obtiveram, de forma geral, uma distribuição semelhante à

do presente trabalho, com homogeneidade de marcações em regiões heterocromáticas e eucromáticas. A exceção foi um dos cariomorfos que apresentou maior acúmulo de *Rex3* na região centromérica de um único par cromossômico (UTSUNOMIA et al., 2011).

Ozouf-Costaz e colaboradores (2004) também analisaram a distribuição de *Rex1* e *Rex3* no genoma de várias espécies de Notothenioides e, para a maioria das espécies, encontraram uma distribuição homogênea do elemento *Rex3*, dispersos nos cromossomos, com alguns acúmulos em determinadas regiões, mas não marcados claramente. Para o *Rex1* a distribuição foi menos regular entre as espécies, sem um padrão claro, porém podendo sobrepor alguns sinais de *Rex3* (OZOUF-COSTAZ et al., 2004). Para espécies testadas da família Channichthyidae o padrão de *Rex1* manteve-se similar, porém os *Rex3* apresentaram regiões mais específicas, como as pericentroméricas. Somente *Notothenia coriiceps* apresentou distribuição associada apenas à heterocromatina (OZOUF-COSTAZ et al., 2004).

Mendonça e colaboradores (2011) analisaram a distribuição de *Rex1* no caraciforme *Prochilodus lineatus* e também obtiveram uma organização dispersa, com algumas regiões de heterocromatina mais marcadas e homologia total com os cromossomos supranumerários.

Em diversos trabalhos, no entanto, os elementos de transposição encontram-se associados mais a regiões heterocromáticas.

Bouneau e colaboradores (2003) analisaram a distribuição do retrotransposon *Zebulon* em *Tetraodon nigroviridis* e o encontraram colocalizado frequentemente com *Rex3* em regiões heterocromáticas, sugerindo a presença de reservatórios heterocromáticos de elementos transponíveis. A mesma distribuição, para diversos elementos de transposição, foi encontrada em *Tetraodon nigroviridis* por Dasilva e colaboradores (2002).

Teixeira e colaboradores (2009) analisaram a distribuição de vários elementos repetitivos, entre eles os *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* no ciclídeo *Cichla kelberi*, os quais foram encontrados predominantemente nas regiões heterocromáticas dos centrômeros, com sinais mais fracos dispersos pela maioria dos cromossomos. *Rex1* e *Rex3* ocupam regiões consideráveis de eucromatina e possuem distribuição semelhante, o que pode indicar que estão evoluindo em conjunto. Já o *Rex6* possui marcações centroméricas e dispersas pelos cromossomos, porém com um padrão de distribuição diferente, podendo indicar que sua localização é governada por mecanismos evolutivos diferentes e que podem evoluir de forma independente de outras sequências repetitivas (TEIXEIRA et al., 2009).

Valente e colaboradores (2011) analisaram a distribuição dos *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* em várias espécies de ciclídeos da África e América do Sul e obtiveram o mesmo padrão descrito acima, com compartimentalização pericentromérica, coincidente com as regiões

heterocromáticas, e sinais dispersos pelos cromossomos, exceto para *Haplochromis obliquidens*, no qual havia também sinais dispersos. Foi encontrado grande acúmulo de *Rex3* no maior par cromossômico de *Oreochromis niloticus*, sugerindo que possam estar envolvidos em fusões cromossômicas e diferenciação sexual (VALENTE et al., 2011).

Em outro trabalho de Ferreira, Oliveira e Foresti (2011b) foi mapeada a distribuição de fragmentos obtidos com a enzima BamHI, denominados HLBam, no siluriforme *Hisonotus leucofrenatus* e obtida a mesma distribuição que *Rex1* e *Rex3* neste peixe, este dado leva a crer que HLBam é um elemento de transposição do tipo disperso, e reforça a hipótese proposta por Ferreira e colaboradores (2011c) de que todos os elementos transponíveis se comportam da mesma maneira dentro de uma família ou subfamília (FERREIRA; OLIVEIRA; FORESTI, 2011b).

Mazzuchelli (2008) evidenciou marcações preferenciais de *Rex1* e *Rex3* em regiões pericentroméricas e heterocromáticas, além de sinais mais fracos em regiões intersticiais no ciclídeo *Astronotus ocellatus*. Em ambos trabalhos, de Mazzuchelli (2008) e Ozouf-Costaz e colaboradores (2004) o elemento *Rex6* não pode ser identificado durante a hibridação, por estar ausente ou muito disperso (OZOUF-COSTAZ et al., 2004; MAZZUCHELLI, 2008).

O mapeamento físico dos elementos *Rex* em peixes mostrou que a maioria segue um padrão de distribuição similar (VALENTE et al., 2011). Dessa forma, pode-se sugerir que esses elementos podem se acumular em regiões genômicas específicas dentro de cada grupo de peixes, sendo que essa tendência é maior para peixes do mesmo grupo e menor para grupos diferentes (VALENTE et al., 2011). Mesmo dentro de uma subordem a situação pode mudar dependendo das espécies (OZOUF-COSTAZ et al., 2004).

Para as espécies analisadas neste trabalho, o padrão de distribuição de *Rex1* nos cromossomos mostrou-se bastante homogêneo, o que nos leva a crer que esse elemento pode estar presente há muito tempo nos genomas destes peixes e que possui um papel importante na evolução do grupo.

O gênero *Astyanax* é bastante interessante devido à grande variedade cariotípica encontrada, até mesmo entre indivíduos da mesma espécie. A dinâmica dos retrotransposons, envolvidos em rearranjos cromossômicos, pode ser responsável por grande parte dessas variações, e os estudos destes elementos podem contribuir para o melhor entendimento da variabilidade, estrutura populacional e evolução destes caracídeos.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

De acordo com o exposto, podemos concluir que, diferentemente do observado nos dados cariotípicos, as sequências do retrotransposon *Rex1* mostraram-se relativamente conservadas entre as diferentes espécies. Já a distribuição cromossômica coincide com dados obtidos por outros pesquisadores (OZOUF-COSTAZ et al., 2004; UTSUNOMIA et al., 2011; MENDONÇA et al., 2011; FERREIRA; OLIVEIRA; FORESTI, 2011a), no qual o elemento transponível *Rex1* encontra-se disperso pelos cromossomos. As espécies de *Astyanax* analisadas obtiveram o mesmo padrão de distribuição de *Rex1* e contribui o que pode levar a ideia de que esses elementos podem estar distribuídos de forma dispersa dentro do grupo dos peixes. Além disso, a ampla distribuição de *Rex1* observada nas espécies do gênero pode indicar que esse elemento pode ter sido incorporado há muito tempo nos genomas destes peixes e que vem desempenhando um papel importante na evolução do grupo.

O gênero *Astyanax* apresenta uma extensa variabilidade em suas fórmulas cariotípicas, as quais acompanham sua diversidade biológica, sendo desta forma, um grupo de organismos bastante interessante para estudos de biologia evolutiva (DOMINGUES, 2005). Devido à grande complexidade taxonômica do gênero, ainda há pouca informação sobre sua diversidade genética, relações evolutivas e estrutura populacional. Deste modo estudos moleculares podem ter grande importância, uma vez que as espécies do gênero possuem pouca variação morfológica para sua correta identificação (MARRETA, 2011). Mais informações sobre os elementos transponíveis podem fornecer dados importantes, tanto para a taxonomia do grupo, quanto para o melhor entendimento da dinâmica dos elementos transponíveis no gênero, e em outros grupos de peixes.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403–410, 1990.

BERTACO, V.; GARUTTI, V. New *Astyanax* from the upper rio Tapajós drainage, Central Brazil (Characiformes: Characidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 5, n. 1, p. 25-30, 2007.

BERTOLLO, L.A.C.; TAKAHASHI, C.S.; MOREIRA-FILHO, O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Revista Brasileira de Genética**, v.1, p.103-120, 1978.

BIÉMONT, C.; VIEIRA, C. Genetics: Junk DNA as an evolutionary force. **Nature**, v. 443, p. 521-524, 2006.

BIET, E.; SUN J.; DUTREIX, M. Conserved sequence preference in DNA binding among recombination proteins: an effect of ssDNA secondary structure. **Nucleic Acids Research**, v. 27, p. 596-600, 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**, v. 16, p. 203-215, 2008.

BOUNEAU, L.; FISCHER, 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**, v. 13, p. 1686–1695, 2003.

BRANDES, A.; HESLOP-HARRISON, J.S.; KAMM, A.; KUBIS, S.; DOUDRICK, R.L.; SCHMIDT, T. Comparative analysis of the chromosomal and genomic organization of Ty1-

copia-like retrotransposons in pteridophytes, gymnosperms and angiosperms. **Plant Molecular Biology**, v. 33, p. 11–21, 1997.

CABRAL-DE-MELLO, D. C. **Organização cromossômica de elementos repetitivos de DNA em representantes da subfamília Scarabaeinae (Coleoptera: Scarabaeidae)**. Tese (Doutorado em Genética). Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 202 p, 2011.

CESTARI, N.A. **Métodos de estudo dos cromossomos de vertebrados**. In: Exercícios práticos de genética. Companhia Editora Nacional – Editora da Universidade de São Paulo, p. 29-31, 1973.

CHARLESWORTH B.; SNLEGOWSKI, P.; STEPHAN, W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature**, v. 371, p. 215-220, 1994.

LANFREDI, M.; CONGIU, L.; GARRIDO-RAMOS, M. A.; HERRRÁN, R.; LEIS, M.; CHICCA, M.; ROSSI, R.; TAGLIAVINI, J.; RUIZ REJÓN, M.; FONTANA, F. Chromosomal location and evolution of a satellite DNA family in seven sturgeon species. **Chromosome Research**, v. 9, p. 47-52, 2001.

CIOFFI, M.B.; BERTOLLO, L.A.C.; CAMACHO, J.P.M. Repetitive DNAs and differentiation of sex chromosomes in Neotropical fishes. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 132, p. 188-194, 2010.

DASILVA, C.; HADJI, H.; OSOUF-COSTAZ, C.; NICAUD, S.; JAILLON, O.; WEISSBENBACH, J.; CROLLIUS, H.R. Remarkable compartmentalization of transposable elements and pseudogenes in the heterochromatin of the *Tetraodon nigroviridis* genome. **Proceedings of the Natural Academy of Sciences of the United States of America**. v. 99, p. 13.636-13.641, 2002.

DEININGER, P. L.; BATZER, M.A.; HUTCHINSON, C.A.; EDGELL, M.H. Master genes in mammalian repetitive DNA amplification. **Trends in Genetics**, v. 8, p. 307–311, 1992.

DOMINGUES, M, S. **Citogenética comparativa de *Astyanax altiparanae* Garutti e Britski, 2000 do alto rio Tibagi e alto rio Iguaçu.** Dissertação (Mestrado em Genética), Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 66p, 2005.

EBERT, P.R.; HILEMAN, J.P.; NGUYEN, H.T. Primary sequence, copy number, and distribution of *mariner* transposons in the honey bee. **Insect Molecular Biology**, v. 4, p. 69–78, 1995.

EGOZCUE, Y. **Técnicas em citogenética.** Editora Espaxs, Barcelona, 144pp, 1971.

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

FERREIRA, D.C.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. A new dispersal element in the genome of the catfish *Hisonotus leucofrenatus* (Teleostei: Siluriformes: Hypoptonomatinae). **Mobile Genetic Elements**, v. 1, n. 2, p. 103-106, 2011b.

FERREIRA, D.C.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Chromosome mapping of retrotransposable elements *Rex1* and *Rex3* in three fish species in the subfamily Hypoptopomatinae (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 132, p. 64-70, 2011a.

FERREIRA, D.C.; PORTO-FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Transposable elements as a potential source for understanding the fish genome. **Mobile Genetic Elements**, v. 1, n.2, p. 112-117, 2011c.

FERREIRA, I.A., MARTINS, C. Physical chromosome mapping of repetitive DNA sequences in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*: evidences for a differential distribution of repetitive elements in the sex chromosomes. **Micron**, v. 39, p. 411–418, 2008.

FESCHOTTE, C.; PRITHAM, E.J. DNA transposons and the evolution of eukaryotic genomes. **Annual Review of Genetics**, v. 41, p. 331-368, 2007.

FINK, S.V.; FINK, W.L. Interrelationships of the Ostariophysan fishes (Teleostei). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 72, n. 4, p. 297-353, 1981.

FLAVELL R.B.; BENNETT M.D.; SMITH J.B.; SMITH D.B. Genome size and proportion of repeated nucleotide sequence DNA in plants. **Biochemical Genetics**, v.12, p. 257–269, 1974.

GARUTTI, V. **Revisão taxonômica dos *Astyanax* (Pisces, Characidae), com mancha umeral ovalada e mancha no pedúnculo caudal, estendendo-se à extremidade dos raios caudais medianos, das bacias do Paraná, São Francisco e Amazônica.** Tese de Livre-Docência, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 286p, 1995.

GROSS, M.C.; SCHNEIDER C.H.; VALENTE, G.T.; PORTO J.I.R.; MARTINS, C.; FELDBERG, E. Comparative cytogenetic analysis of the genus *Symphysodon* (Discus Fishes, Cichlidae): chromosomal characteristics of retrotransposons and minor ribosomal DNA. **Cytogenetic and Genome Research**. v. 127, p. 43-53, 2009.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HALUCH, C.F.; ABILHOA, V. *Astyanax totae*, a new characidae species (Teleostei: Characidae) from the upper rio Iguazu basin, southeastern Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 3, n. 3, p. 383-388, 2005.

KAZAZIAN, H. H.; MORAN, J. V. The impact of L1 retrotransposons on the human genome. **Nature Genetics**, v. 19, p. 19–24, 1998.

KIDWELL, M.G. Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. **Genetica**, v. 115, p. 49-63, 2002.

LICHTER, P.; LEDBETTER, S.A.; LEDBETTER, D.H.; WARD, D.C. Fluorescence in situ hybridization with *Alu* and L1 polymerase chain reaction probes for rapid characterization of human chromosomes in hybrid cell lines. **Genetics**, v. 87, p. 6634–6638, 1990.

LI, Y.C.; KORD, A.B.; FAHIMA, T.; BERLES, A.; NERO, E. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutation mechanisms: a review. **Molecular Ecology**, v. 11, p. 2453-2465, 2002.

LIMA, F. C. T.; MALABARBA, L.R.; BUCKUP, P.A.; PEZZI DA SILVA, J.F.; VARI, R.P.; HAROLD, A.; BENINE, R.; OYAKAWA, O.T.; PAVANELLI, C.S.; MENEZES, N.A.; LUCENA, C.A.S.; MALABARBA, M.C.S.L.; LUCENA, Z.M.S.; REIS, R.E.; LANGEANI, F.; CASATTI, L.; BERTACO, V.A.; MOREIRA, C.; LUCINDA, P.H.F. Genera *Incertae Sedis* in Characidae. In: REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS, C.J. Jr. (Eds.). **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre, Edipucrs, p. 106-169, 2003.

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 Communications**, v. 289, p. 317-324, 2001

LONG, E. O.; DAVID, I. D. Repeated genes in eukaryotes. **Annual Review of Biochemistry**, v. 49, p. 727 – 764, 1980.

MARRETA, M.E. **Evidências moleculares dos padrões evolutivos e filogeográficos de populações de *Astyanax paranae* (Pisces: Characidae) com base em caracteres do DNA mitocondrial**. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular), Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 95p, 2011.

MARTINS, C. Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome. In: PISANO, E.; OZOUF-COSTAZ, C.; FORESTI, F.; KAPOOR, B.G. (eds) **Fish Cytogenetics**, p. 421–453. Science Publisher Inc., Enfield, 2007.

MAZZUCHELLI, J. **Identificação e caracterização de sequências repetidas de DNA no genoma do ciclídeo *Astronotus ocellatus***. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas/AC: Genética). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 67p, 2008.

MAZZUCHELLI, J.; MARTINS, C. Genomic organization of repetitive DNAs in the cichlid fish *Astronotus ocellatus*. **Genetica**, v. 136, p. 461–469, 2009.

MELO, F.A.G.; BUCKUP, P.A. *Astyanax henseli*, a new name for *Tetragonopterus aenus* Hensel, 1870 from southern Brazil (Teleostei: Characiformes). **Neotropical Ichthyology**, v. 4, n.1, p. 45-52, 2006.

MENDONÇA, B.M.; VOLTOLIN, T.A.; FERREIRA, D.C.; SENHORINI, J.A.; FORESTI, F.; PORTO-FORESTI, F. Mapeamento cromossômico da espécie *Prochilodus lineatus* com a utilização de elemento retrotransponível *Rex1*. In: **2ª Reunião Brasileira de Citogenética**. Águas de Lindóia, 2011.

NEI, M.; ROONEY, A.P. Concerted and birth-and-death evolution of multigene families. **Annual Review of Genetics**, v. 39, p. 121-152, 2005.

NOWAK, R. Mining treasures from “junk DNA”. **Science**, v. 263, p. 608-610, 1994.

OZOUF-COSTAZ, C.; BRANDT, J.; KÖRTING, C.; PISANO, E.; BONILLO, C.; COUTANCEAU, J. P.; VOLFF, J-N. Genome dynamics and chromosomal localization of the non-LTR retrotransposons *Rex1* and *Rex3* in Antarctic fish. **Antarctic Science**, v. 16, p. 51-57, 2004.

PARISE-MALTEMPI, P.P.; MARTINS, C; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Identification of a new repetitive element in the sex chromosomes of *Leporinus elongatus* (Teleostei: Characiformes: Anostomidae): new insights for the sex chromosome in *Leporinus*. **Cytogenetics and Genome Research**. v. 116, n. 3, p. 218-223, 2007.

PAZZA, R. **Contribuição citogenética à análise da biodiversidade em *Astyanax fasciatus* (PISCES: CHARACIDAE)**. Tese (Doutorado em Genética e Evolução), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 98p, 2005.

PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J.W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, p. 2934-2938, 1986.

POLETTI, A.B.; FERREIRA, I.A.; MARTINS, C. The B chromosomes of the African cichlid fish *Haplochromis obliquidens* harbour 18S rDNA gene copies. **BMC Genetics**, v. 11, p. 1-8, 2010.

RAMEL, C. Mini- and microsatellites. **Environmental Health Perspectives**, v. 105, p. 781-789, 1997.

TAMURA, K.; DUDLEY J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**. v. 24, p. 1596-1599, 2007.

TEIXEIRA, W.G.; FERREIRA, I.A.; CABRAL-DE-MELLO, D.C.; MAZZUCHELLI, J.; VALENTE, G.T.; PINHAL, D.; POLETTI, A.B.; VENERE, P.C.; MARTINS, C. Organization of repeated DNA elements in the genome of the cichlid fish *Cichla kelberi* and its contributions to the knowledge of fish genomes. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 125, p. 224-234, 2009.

LANDER, E. S. et al., INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM. Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature**, v. 409, p. 860-921, 2001.

UTSUNOMIA, R.; SCACCHETTI, P.C.; PANSONATO-ALVES, J.C.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Mapeamento cromossômico de retrotransposons *Rex1* e *Rex3* em cariomorfos distintos de *Synbranchus marmoratus* (Teleostei, Synbranchidae). In: 2ª Reunião Brasileira de Citogenética. **Resumos**. Águas de Lindóia, 2011.

VALENTE, G.T.; MAZZUCHELLI, J.; FERREIRA, I.A.; POLETTI, A.B.; FANTINATTI, B.E.A.; MARTINS, C. Cytogenetic mapping of the retroelements *Rex1*, *Rex3*, and *Rex6* among cichlid fish: New insights on the chromosomal distribution of transposable elements. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 133, p.34-43, 2011.

VICARI, M. R.; NOGAROTO, V.; NOLETO, R. B.; CESTARI, M. M.; CIOFFI, M. B.; ALMEIDA, M. C.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C.; ARTONI, R. F. Satellite

DNA and chromosomes in Neotropical fishes: methods, applications and perspectives. **Journal of Fish Biology**, v. 76, p. 1094-1116, 2010.

VOLFF, J-N.; KÖRTING, C.; FROSCHAUER, A.; SWEENEY, K.; SCHARTL, M. Non-LTR retrotransposons encoding a restriction enzyme-like endonuclease in vertebrates. **Journal of Molecular Evolution**, v. 52, p. 351–360, 2001.

VOLFF, J-N.; KÖRTING, C.; SCHARTL, M. Multiple lineages of the non-LTR retrotransposon *Rex1* with varying success in invading fish genomes. **Molecular Biology and Evolution**, v.17, n.11, p. 1673–1684, 2000.

VOLFF, J-N.; KÖRTING, C.; SWEENEY, K.; SCHARTL, M. The non-LTR retrotransposon *Rex3* from the fish *Xiphophorus* is widespread among teleosts. **Molecular Biology and Evolution**, v. 16, n. 11, p. 1427-1438, 1999.

VOLFF, J-N.; BOUNEAU, L.; OZOUF-COSTAZ, C.; FISCHER, C. Diversity of retrotransposable elements in compact pufferfish genomes. **TRENDS in Genetics**, v. 19, n. 12, p. 674-678, 2003.

WEITZMAN, S.H.; FINK, W.L. Relationships of the neon tetras, a group of South American freshwater fishes (Teleostei, Characidae), with comments on the phylogeny of new world characiforms. **Bulletin of the Museum of Comparative Zoology**, v. 150, n. 6, p. 339-395, 1983.

WEITZMAN, S.H.; MALABARBA, L.R. Perspectives about the phylogeny and classification of the Characidae (Teleostei: Characiformes). In: MALABARBA, L.R.; REIS, R.E.; VARI, R.P.; LUCENA, Z.M.S.; LUCENA, C.A.S. (eds). **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. Edipucrs: Porto Alegre, p. 161-170, 1998.

ZANATA, A.M. **Estudo filogenético e revisão taxonômica das espécies Tetragonopterinae com espinho pélvico (Characidae; Characiformes)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas, Zoologia), Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 126p, 1995.