

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 03/04/2027.

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
Departamento de Biologia Estrutural e Funcional

**Influência de cromossomos B na maquinaria de manutenção telomérica
em diferentes estágios de vida de *Psalidodon paranae* (Characiformes:
Acestrorhamphidae)**

Discente: Pamela Cristina Ferreira de Nadai

Orientador: Prof. Dr. Fausto Foresti

Co-orientador: Profa. Dra. Maria Isabel Nogueira Cano

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

**Influência de cromossomos B na maquinaria de manutenção telomérica
em diferentes estágios de vida de *Psalidodon fasciatus* e *Psalidodon paranae*
(Characiformes: Acestrorhamphidae).**

Discente: Pamela Cristina Ferreira de Nadai

Orientador: Prof. Dr. Fausto Foresti

Co-orientador: Profa. Dra. Maria Isabel Nogueira Cano

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências, Campus de Botucatu,
UNESP, para defesa de Mestrado no
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas (Genética).

Botucatu, SP
- 2025 -

Esta pesquisa está sendo financiada com recursos da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)



N126i	Nadai, Pamela Influência de cromossomos B na maquinaria de manutenção telomérica em diferentes estágios de vida de <i>Psilidodon paranae</i> (Characiformes: Acestrorhamphidae) / Pamela Nadai. -- , 2025 58 p. : il., tabs., fotos Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Botucatu, Orientador: Fausto Foresti Coorientadora: Maria Isabel Nogueira Cano 1. Genética. 2. Citogenética. 3. Cromossomos. 4. Telômeros. 5. Telomere-Binding Proteins. I. Título.
-------	---

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Influência de cromossomos B na maquinaria de manutenção telomérica em diferentes estágios de vida de *Psilododon paranae* (Characiformes, Characidae)

AUTORA: PAMELA CRISTINA FERREIRA DE NADAI

ORIENTADOR: FAUSTO FORESTI

COORIENTADORA: MARIA ISABEL NOGUEIRA CANO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Ciências Biológicas (Genética), pela Comissão Examinadora:

Prof.Dr. FAUSTO FORESTI (Participação Presencial)
Departamento de Biologia Estrutural e Funcional / Instituto de Biociências de Botucatu - Unesp

Prof^a. Dr^a. BEATRIZ CRISTINA DIAS DE OLIVEIRA (Participação Presencial)
Departamento de Genética, Microbiologia e Imunologia / Instituto de Biociências de Botucatu - Unesp

Prof. Dr. DUILIO MAZZONI ZERBINATO DE ANDRADE SILVA (Participação Virtual)
Depto Cell and Developmental Biology Center / National Institute of Health

Botucatu, 03 de abril de 2025

FLÁVIA DANIELI MARTINS GODINHO
Assistente Técnico Administrativo I da Seção Técnica de Pós-Graduação
Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP

“Um trabalho te dá um propósito e um significado.

A vida é vazia sem ambos”

Stephen Hawking

RESUMO

Os cromossomos B são cromossomos adicionais de natureza dispensável e estão amplamente distribuídos entre os genomas dos organismos eucariotos. No gênero de peixe *Psalidodon*, esses cromossomos parecem desempenhar papéis importantes na determinação sexual, embora muitos aspectos permaneçam desconhecidos. Em *Psalidodon paranae* observou-se expressão diferencial de genes envolvidos com a regulação sexual em machos e fêmeas, influenciados pela presença do cromossomo B. Em estudos anteriores realizados no nosso laboratório, foram identificados genes nos cromossomos B de *P. fasciatus*, como *trf1* e *ruvbl1*, relacionados à regulação telomérica, sugerindo uma interação entre cromossomos B e a maquinaria de manutenção telomérica. Os telômeros são complexos nucleoproteicos presentes nas extremidades cromossômicas, formados por sequências de DNA não codificantes repetidas em tandem e por proteínas que formam o complexo *shelterin*. O encurtamento dos telômeros a cada divisão celular é evitado através da enzima telomerase, que promove o alongamento dos terminais cromossômicos. Considerando que os cromossomos B são replicados a cada divisão celular, que são elementos que demandam da célula uma quantidade maior desses componentes da maquinaria telomérica, além de ser um elemento capaz de influenciar a expressão de genes que favorecem sua própria manutenção e transmissão, supomos que sua presença no genoma poderia influenciar a operação da maquinaria de manutenção dos telômeros dos indivíduos portadores. Portanto, o objetivo deste estudo é analisar se existe alteração na maquinaria telomérica, em diferentes estágios de ciclo de vida de *P. paranae*, associadas à presença do cromossomo B. Para avaliar a influência do cromossomo B na maquinaria telomérica, foram conduzidas análises de expressão gênica por RT-qPCR. Além disso, foi realizada a padronização da técnica de *Southern Blot* para analisar os fragmentos teloméricos (TRF - *Telomeric restriction fragments*) da espécie estudada, possibilitando sua aplicação futura na análise do comprimento telomérico. Os resultados indicam que os indivíduos 1B apresentam subexpressão de genes relacionados à manutenção telomérica, como genes codificadores de proteínas de *shelterin* (*pot1*, *tppl*, *trf2* e *rap1*) e da subunidade catalítica da enzima telomerase (*tert*) sugerindo que a presença do cromossomo B influencia o desempenho da maquinaria telomérica.

ABSTRACT

B chromosomes are dispensable, additional chromosomes widely distributed among the genomes of eukaryotic organisms. In the fish genus *Psalidodon*, these chromosomes appear to play important roles in sex determination, although many aspects remain unknown. In *Psalidodon paranae*, differential expression of genes involved in sexual regulation has been observed between males and females, influenced by the presence of the B chromosome. Previous studies conducted in our laboratory identified genes on the B chromosomes of *P. fasciatus*, such as *trf1* and *ruvbl1*, which are related to telomeric regulation, suggesting an interaction between B chromosomes and the telomere maintenance machinery. Telomeres are nucleoprotein complexes located at chromosome ends, composed of tandemly repeated non-coding DNA sequences and proteins forming the shelterin complex. Telomere shortening with each cell division is prevented by the enzyme telomerase, which elongates chromosome termini. Considering that B chromosomes are replicated during each cell division, thus requiring the cell to allocate a greater amount of telomeric maintenance machinery components and given that B chromosomes can influence the expression of genes favoring their maintenance and transmission, we hypothesize that their presence in the genome may affect the operation of the telomere maintenance machinery in carrier individuals. Therefore, this study aims to analyze whether alterations occur in telomeric machinery at different life cycle stages of *P. paranae* associated with the presence of the B chromosome. Gene expression analyses were performed using RT-qPCR to evaluate the influence of the B chromosome on the telomeric machinery. Additionally, the Southern blot technique was standardized to analyze telomeric restriction fragments (TRF) of the studied species, enabling its future application in telomere length analysis. The results indicate that 1B individuals show underexpression of genes related to telomere maintenance, including shelterin complex protein-coding genes (*pot1*, *tpp1*, *trf2*, and *rap1*) and the catalytic subunit of the telomerase enzyme (*tert*), suggesting that the presence of the B chromosome influences the performance of the telomeric machinery.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	7
1 INTRODUÇÃO.....	9
1.1 Cromossomos B	9
1.2 Cromossomos B em <i>Psalidodon</i>	10
1.3 Telômeros e Telomerase.....	11
1.4 Resultados preliminares sobre genes da maquinaria telomérica em <i>Psalidodon</i>	17
2 OBJETIVO.....	18
3 MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1 Material	19
3.2 Identificação cariotípica dos exemplares e seleção do grupo amostral	20
3.2.1 <i>Extração rápida de DNA (HOT SHOT)</i>	20
3.2.2 <i>PCR do Pseudogene simc1 retroinserido no cromossomo B</i>	20
3.2.3 <i>Estimulação de mitoses e citogenética convencional</i>	22
3.3 Hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH) com sondas teloméricas.....	23
3.4 Medição do comprimento telomérico por Southern Blott	24
3.4.1 <i>Extração de DNA de alto peso molecular</i>	24
3.4.2 <i>Implementação da técnica de Southern Blott telomérico</i>	25
3.5 Análise de expressão gênica por RT-qPCR	26
4. RESULTADOS	27
4.1 Coleta de exemplares de <i>Psalidodon paranae</i>	27
4.2 Mapeamento telomérico por Hibridização <i>in situ</i> em metáfases de <i>P. paranae</i>	28
4.3 Obtenção de DNA de alto peso molecular e Southern Blotting para análise de fragmentos teloméricos (<i>TRF - Telomeric Restriction Fragments</i>)	29
4.4 Teste de eficiência dos primers desenhados para os genes alvos da RT-qPCR.....	31
4.5 Expressão de genes associados à maquinaria telomérica em <i>P. paranae</i>	31

5 DISCUSSÃO.....	10
6 CONCLUSÃO	15
REFERÊNCIAS	15
MATERIAL COMPLEMENTAR.....	32
Tabela S1 - Primers desenhados para amplificação de PCR (Hot Shot) e RT-qPCR	32
Figura S1 – Gráfico de comparação entre animais 0B das populações do Riacho Cascatinha e Lago Muro de Pedra	33

1 INTRODUÇÃO

1.1 Cromossomos B

Os cromossomos B são elementos adicionais do genoma presentes em diversos organismos eucariotos. São considerados elementos egoístas e, em muitos casos, não seguem as leis de segregação mendeliana. Esses elementos são considerados dispensáveis pelo fato de não serem encontrados em todos os indivíduos de uma mesma população. Os cromossomos B possuem morfologia e tamanhos variados dentre as espécies e são compostos majoritariamente de heterocromatina. Estes cromossomos podem apresentar genes codificadores de proteínas que podem ser ativamente transcritos, mas sua composição principal é dada por sequências de DNA repetitivo, assim como DNA ribossomal, DNA satélite e genes para histonas (GREGORY, 2005; MARTIS et al., 2012).

Nos últimos 10 anos, o entendimento sobre a complexidade dos cromossomos B vêm crescendo substancialmente, graças à evolução metodológica em relação às técnicas de biologia molecular e ferramentas resolutivas de bioinformática (RUBAN et al., 2017). Diferentes estudos vêm sendo realizados sobre a significância desses cromossomos, incluindo aspectos da sua composição, processos pelos quais são transmitidos e perpetuados nas espécies, bem como sua origem, evolução, etc (BLAGOJEVIĆ, 2023). Algumas funções e comportamentos biológicos importantes relacionados a esses elementos foram revelados, tais como algumas relacionadas à determinação sexual (BENETTA et al., 2020; CLARK; KOCHER, 2019; DALÍKOVÁ et al., 2017; IMARAZENE et al., 2021a), patogenicidade (BALESDENT et al., 2013; TORGASHEVA et al., 2019) resistência a patógenos (DHERAWATTANA; SADANAGA, 1973) e resistência à antibióticos (MIAO; COVERT; VANETTEN, 1991) A presença dos cromossomos B também pode alterar a expressão de genes parálogos no genoma A (cromossomos do complemento padrão) e este efeito já foi observado em diversos organismos. Em *Eyprepocnemis plorans*, algumas variantes de cromossomos B reduziram a expressão da proteína HPS70, que é uma proteína atuante no mecanismo de resposta ao estresse metabólico (CASTRO et al., 2013; JONES et al., 2008). Em trigo e centeio, de 5 a 6% dos transcritos dos cromossomos do complemento padrão A são diferentemente expressos em portadores de cromossomo B (BOUDICHEVSKAIA et al., 2022). Contudo, quando estão presentes em grande número, esses cromossomos adicionais também presentes em grande número, esses cromossomos adicionais também podem causar efeitos deletérios como observado em centeio, como alterações de viabilidade e fertilidade (JONES, 1995).

1.2 Cromossomos B em *Psalidodon*

A região Neotropical possui enorme importância em questão de biodiversidade no mundo. Cerca de 27% do total de espécies de peixes é encontrado nesta região, o que a torna a região biogeográfica mais rica do mundo em fauna deste táxon (REIS et al., 2016). Dentre as diversas ordens de peixes, os *Characiformes* se destacam pela sua grande representatividade, com cerca de 2.361 espécies válidas (FRICKE; FONG, 2025). Inserido nesta ordem, o gênero *Psalidodon* da família *Acestrorhamphidae* é caracterizado pela ocorrência de espécies crípticas (GAVAZZONI et al., 2018; PANSONATO-ALVES et al., 2013) e complexos de espécies, tais como *P. scabripinnis* (MOREIRA-FILHO; BERTOLLO, 1991) e *P. fasciatus* (ARTONI et al., 2006). Em algumas destas espécies é observada uma variabilidade cariotípica, assim como números diplóides distintos e, principalmente, diferentes variantes de cromossomos B (MAISTRO et al., 1992; MIZOGUCHI; MARTINS-SANTOS, 1997).

As espécies do gênero *Psalidodon* representam excelentes modelos de estudo de cromossomos B em peixes, uma vez que pelo menos oito espécies possuem cromossomos B (SILVA et al., 2021b), muitos dos quais possuem frequência variada e estabilidade mitótica, permitindo uma ampla variedade de estudos. Dentre elas, o complexo de espécies *Psalidodon scabripinnis* abriga a espécie *P. paranae* e possui os cromossomos B mais estudados do gênero. Recentemente, Silva et al., (2021b) encontraram pelo menos 21 genes codificadores de proteínas nos cromossomos B metacêntricos grandes (BM) de *P. paranae* e *P. scabripinnis*. Dentre eles, foi verificado que os genes *nusap1*, *nobox* e *msh4* encontram-se superexpressos em indivíduos portadores de B (1B), sugerindo possíveis impactos em processos celulares e reprodutivos. O *nusap1* atua na divisão celular e organização do fuso mitótico, podendo afetar a proliferação celular quando pouco expresso. O *nobox* é um fator de transcrição fundamental para a diferenciação e manutenção dos ovários, e sua subexpressão pode indicar comprometimento da função ovariana. Já o *msh4* é essencial para a recombinação meiótica e segregação dos cromossomos, e níveis reduzidos podem estar relacionados a falhas na meiose. Em *P. scabripinnis*, (CASTRO et al., 2019) observaram que o gene *dmrt1* encontra-se superexpresso em machos e o gene *foxl2* encontra-se subexpresso em fêmeas. Em associação a estas alterações, os autores identificaram que os cromossomos B estão relacionados a uma alteração do ciclo reprodutivo da espécie, levando à extensão do ciclo em machos e redução do ciclo em fêmeas, determinando um período reprodutivo curto e tardio de dezembro a

fevereiro. Ainda, Vidal, (2022) identificou uma diminuição de expressão de dois genes (*cyp19a1a* e *esr1*) envolvidos com a via estrogênica em fêmeas portadoras de B em *P. paranae*, que poderiam levar a uma menor produção e ação de hormônios, induzindo um possível atraso na progressão de células germinativas para a oogênese inicial e, portanto, do período reprodutivo. Estes dados indicam que os cromossomos B do complexo scabripinnis são elementos genéticos ativos e possivelmente determinantes de alterações na maquinaria celular, principalmente em mecanismos regulatórios.

Apesar de menos estudados e compreendidos, os cromossomos B de outras espécies pertencentes ao mesmo gênero tem sido objeto de investigação por parte do nosso grupo de pesquisa, envolvendo aspectos sobre sua provável origem evolutiva e a presença de genes potencialmente sujeitos à transcrição ativa, dentre outros temas. No decorrer das análises do conteúdo gênico presente em variantes do cromossomo B na espécie *P. fasciatus* (Vidal in prep.), constatou-se a presença do gene *trf1*, que codifica uma proteína envolvida na regulação e proteção dos telômeros (LANGE; STEENSEL, 1997) e do gene *ruvbl1*, que codifica uma proteína implicada em remodelamento da cromatina, na regulação da expressão gênica, no reparo de DNA e pode estar envolvida na biogênese da telomerase (SCHOŘOVÁ et al., 2019). Estes dois genes desempenham funções relevantes na maquinaria de manutenção telomérica, contribuindo de forma crucial para a preservação da integridade genômica e regulação de atividades celulares fundamentais. Esses resultados motivaram a formulação da hipótese de que a presença do cromossomo B pode exercer influência sobre o funcionamento desta maquinaria, a qual desempenha papel vital na integridade genômica e senescência celular. Desta forma, a investigação da possível influência da presença de cromossomos B na maquinaria telomérica poderá revelar efeitos e implicações destes cromossomos em aspectos biológicos de seus hospedeiros.

1.3 Telômeros e Telomerase

Localizados nas extremidades dos cromossomos lineares de organismos eucarióticos, os telômeros são estruturas nucleoproteicas cuja função é a de manter a integridade e estabilidade do genoma. Quando funcionais, eles protegem as extremidades dos cromossomos lineares de serem reconhecidas e processadas pela maquinaria de reparo a danos no DNA, evitando fusões e degradações nos terminais dos cromossomos. Eles são compostos por repetições em tandem de

sequências curtas de DNA não codificante, associadas a proteínas teloméricas (CANO, 2006; SHAY; WRIGHT, 2019).

Na maioria das espécies de vertebrados, as proteínas teloméricas formam um complexo conhecido como *shelterin*, que é composto por subunidades proteicas: TRF1, TRF2, TIN2, RAP1, TPP1 e POT1 (ver Tabela 1)(Figura1). Ortólogos a estas proteínas são encontrados na maioria dos eucariotos estudados (PALM; DE LANGE, 2008) e a interação destas proteínas com o DNA telomérico forma uma capa protetora que impede que o DNA telomérico seja reconhecido como quebra em dupla fita. Além disso, esse complexo auxilia na formação de estruturas protetoras do tipo T-loop nas extremidades dos cromossomos e regula a atividade enzimática da telomerase, promovendo ou não seu acesso ao DNA telomérico durante os ciclos de replicação celular (DE LANGE, 2005).

Tabela1 – Subunidades conservadas em eucariotos do complexo shelterin e suas respectivas funções.

SUBUNIDADE	FUNÇÃO
TRF1 (Telomeric Repeat-binding Factor 1):	¹ TRF1 está envolvida na regulação do comprimento do telômero e na inibição da replicação excessiva do DNA. Atua suprimindo a atividade da telomerase e contribui para a proteção dos telômeros contra fusões indesejadas.
TRF2 (Telomeric Repeat-binding Factor 2):	² TRF2 desempenha um papel crucial na manutenção da estrutura do telômero, prevenindo a fusão de extremidades cromossômicas e inibindo a ativação da resposta ao dano do DNA. Também está envolvida na regulação da replicação do telômero.
POT1 (Protection of Telomeres 1):	³ POT1 se liga diretamente às extremidades de telômero simples e impede o reconhecimento dessas extremidades como quebras de DNA. Além disso, colabora com TPP1 na regulação do comprimento do telômero.
TIN2 (TRF1-Interacting Nuclear protein 2):	⁴ TIN2 atua como uma ponte física e funcional entre TRF1 e TRF2, ajudando a estabilizar o complexo telomérico <i>shelterin</i> . Essa estabilização é crucial para a integridade estrutural do telômero.
TPP1 (TINT1, PTOP, PIP1):	^{5,6} TPP1 auxilia na estrutura do Shelterin, garantindo que os telômeros fiquem protegidos e não sejam reconhecidos como quebras de DNA. Também possui um domínio específico (TEL patch) que recruta e ativa a telomerase, garantindo a elongação dos telômeros quando necessário.
RAP1 (Repressor-Ativador de Proteína 1):	⁷ RAP1 interage com TRF2 para modular a estrutura do telômero. Além disso, atua inibindo a ativação da resposta ao dano do DNA induzida pelas extremidades dos telômeros.

Fonte: ¹BIANCHI et al., (1997); ²SMOGORZEWSKA; STEENSE; DE LANGE, (1998); ³LOAYZA; DE LANGE, (2003); ⁴KIM; KAMINKER; CAMPISI, (1999); ⁵HWANG et al., (2012); ⁶NANDAKUMAR et al., (2012), ⁷ARAT; GRIFFITH, (2012)

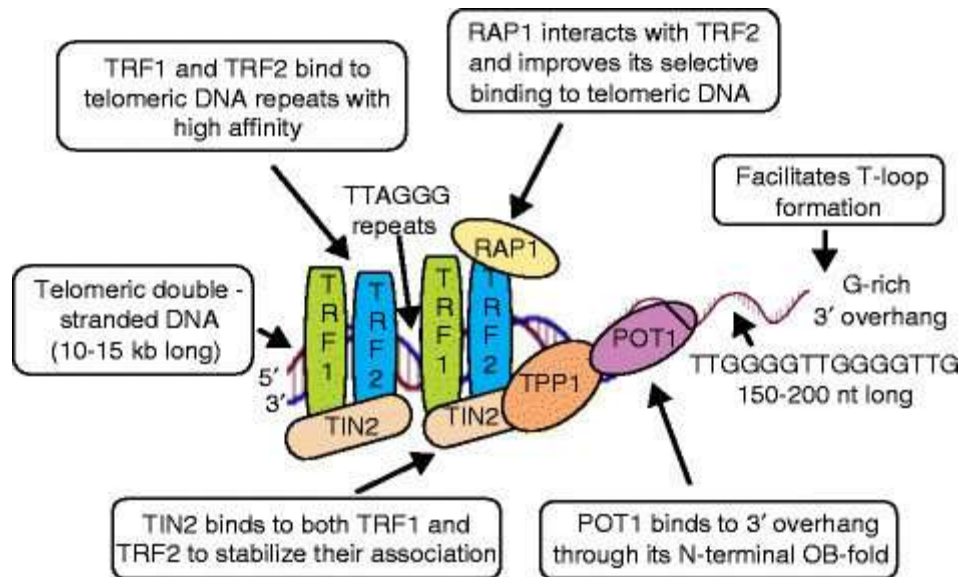


Figura1 – Esquema ilustrativo da formação de complexo *shelterin* e suas subunidades. (JAFRI et al., 2016)

TRF1 e TRF2 se ligam à região de dupla fita do DNA telomérico (BIANCHI et al., 1997; BROCCOLI et al., 1997). Embora apresentem semelhanças estruturais (COURT ET AL., 2005), essas proteínas desempenham funções distintas nos telômeros e interagem com diferentes conjuntos de parceiros [revisado em PALM; DE LANGE, (2008)]. TRF1 regula negativamente o comprimento telomérico (ANCELIN et al., 2002) e auxilia na replicação do DNA telomérico (SFEIR et al., 2009), enquanto TRF2 é fundamental para o encapsulamento dos telômeros (DE LANGE, 2005) e para protegê-los contra a ativação das vias de reparo de danos ao DNA (CELLI; DE LANGE, 2005). Ambas as proteínas interagem com TIN2, que estabiliza sua associação com o DNA telomérico (COURT et al., 2005). Além disso, TRF2 se liga diretamente ao RAP1, enquanto TRF1 não estabelece essa conexão (LI; OESTREICH; DE LANGE, 2000). No complexo, POT1 e TPP1 formam uma parceria funcional (LIU et al., 2004; XIN et al., 2007) e estão presentes em quantidades equivalentes nas células (TAKAI et al., 2010). POT1 se associa à extremidade 3' da fita rica em guanina, onde se liga às repetições TTAGGG de fita simples (BAUMANN; CECHE, 2001). A estabilidade dessa interação depende de TPP1 (HOCKEMEYER et al., 2007), que desempenha um papel essencial na proteção da POT1 e na inibição de respostas de reparo de danos no DNA na região telomérica (CHURIKOV; PRICE, 2008; GUO et al., 2007). TPP1 também facilita a ligação de POT1 a TIN2 (HOUGHTALING et al., 2004; LIU et al., 2004; WANG et al., 2007). Como TIN2 também interage com TRF1 e TRF2, essa proteína estabelece conexões entre os

diferentes componentes do complexo *shelterin*, garantindo sua organização estrutural e funcionalidade (CHEN; LIU; SONGYANG, 2007; YE et al., 2004).

A telomerase é um complexo ribonucleoproteico altamente conservado entre os eucariotos, responsável pela manutenção da integridade telomérica. Sua composição básica inclui dois elementos centrais: a subunidade catalítica TERT (*telomerase reverse transcriptase*), que possui atividade de transcriptase reversa, e o componente de RNA TERC (*telomerase RNA component*), que atua como molde para a adição das sequências repetitivas aos telômeros (ARMANIOS; BLACKBURN, 2012; BLACKBURN; EPEL; LIN, 2015); (Figura 2). Além dessas unidades principais, a telomerase compreende diversas proteínas acessórias, fundamentais para a montagem, estabilidade e transporte do complexo, como Dyskerin (DKC1), NOP10, NHP2, GAR1 e TCAB1 (BLACKBURN; EPEL; LIN, 2015), que atuam na maturação e proteção do RNA TERC.

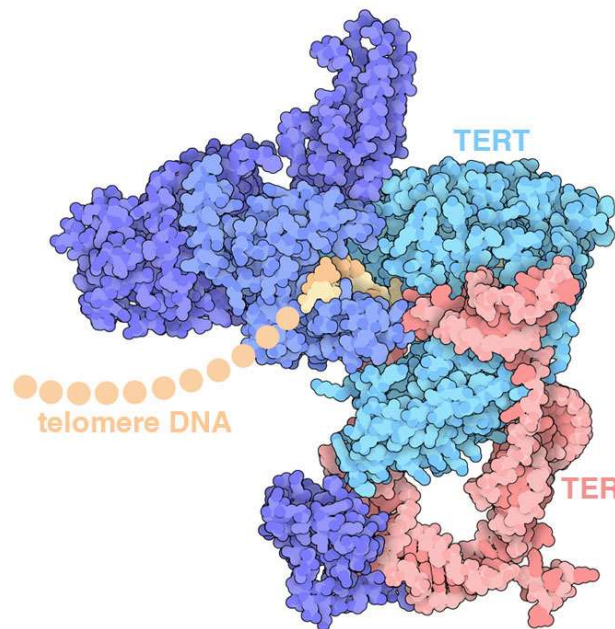


Figura 2 – Complexo ribonucleoproteico telomerase e suas subunidades centrais TERT e TERC (TER). (GOODSELL, 2018)

Embora essa composição geral seja bem estabelecida em modelos como humanos, *Tetrahymena* e leveduras, em vertebrados não-modelo, como peixes, os dados ainda são limitados. Em *Danio rerio*, um dos modelos mais utilizados em estudos de envelhecimento e biologia molecular, os genes *tert* e *terc* foram identificados e caracterizados (ANCHELIN et al., 2011). Apesar da caracterização funcional dos componentes centrais, a composição completa do complexo telomerase no zebrafish ainda não foi totalmente elucidada. As proteínas acessórias, por

cromossomos a cada divisão celular em humanos e em outros vertebrados, num processo contínuo que consequentemente leva a célula à senescência ou apoptose (SMOGORZEWSKA; DE LANGE, 2004). Além disso, em *Danio rerio*, já foi documentado que a ausência da ação da telomerase pode levar a fenótipos degenerativos prematuros, diminuindo a expectativa de vida do indivíduo (HENRIQUES et al., 2013).

Em organismos eucariotos multicelulares, a atividade da telomerase pode variar nos diferentes tecidos e ao longo do ciclo de vida dos organismos. Em algumas espécies, como no caso de humanos, células somáticas diferenciadas apresentam baixa ou nenhuma atividade da telomerase e por isso, neste caso, os telômeros encurtam progressivamente até que atinjam um tamanho crítico a ponto de limitar o crescimento celular e induzir as células a senescência replicativa, fenômeno este também conhecido como limite de Hayflick e a um posterior estado de crise, com perda dos *checkpoints* do ciclo celular (HAYFLICK, 1998). De forma geral, células com grande capacidade proliferativa como as células germinativas e as células tronco embrionárias, apresentam atividade contínua da telomerase e por isso não perdem telômeros ao longo das múltiplas divisões celulares (GREIDER, 2003). No caso do peixe zebrafish, a enzima telomerase apresenta atividade mesmo em tecidos compostos por células somáticas; no entanto, esta atividade é reduzida ao longo do ciclo de vida (ANCHELIN et al., 2011). Contudo, células somáticas que ultrapassam o estado de crise e continuam proliferando podem reativar a atividade da telomerase (mecanismo responsável pela manutenção dos telômeros em cerca de 85 a 90% das células cancerígenas) ou, alternativamente, recorrer a mecanismos independentes, como o *Alternative Lengthening of Telomeres* (ALT), observados em uma menor parcela dos casos. (SHAY; WRIGHT, 2019). Esse mecanismo ALT é baseado principalmente em eventos de recombinação homóloga, nos quais um telômero encurtado pode ser alongado utilizando outro telômero como molde, promovendo variações no tamanho telomérico dentro da população celular (SOBINOFF; PICKETT, 2017). Além dos mecanismos enzimáticos, fatores epigenéticos também influenciam a estabilidade e a manutenção dos telômeros. Alterações nos padrões de metilação do DNA e na estrutura da cromatina telomérica têm sido associadas à ativação de vias alternativas de alongação (BLASCO, 2007). Ainda, RNAs não codificantes teloméricos, como TERRA (*Telomeric Repeat-containing RNA*), exercem papel regulador importante, interagindo com proteínas do complexo *shelterin* e modulando a atividade da telomerase (AZZALIN et al., 2007).

A manutenção da estabilidade telomérica depende da ação coordenada de diversos fatores.

Além das proteínas comumente associadas a manutenção do telômero (DE LANGE, 2005), outras proteínas também desempenham papéis fundamentais nesse processo. A helicase RTEL1 (*Regulator of Telomere Length 1*) é um desses fatores, conhecida por sua participação na prevenção do encurtamento excessivo dos telômeros e é fundamental na prevenção de estruturas secundárias nos telômeros, como os T-loops e as G-quadruplexes, facilitando a replicação telomérica e prevenindo a instabilidade cromossômica (DENG et al., 2013; VANNIER et al., 2012). Valente et al., (2014), identificaram o gene *rtell* no cromossomo B do ciclídeo *Astatotilapia latifasciata*, o que levanta questões sobre sua possível função nesse elemento genético e sua relação com a regulação telomérica em organismos portadores de cromossomos B.

1.4 Resultados preliminares sobre genes da maquinaria telomérica em *Psalidodon*

Em análises preliminares, (NADAI, 2022) foi investigado se genes envolvidos com a maquinaria telomérica (*tert*, *dkc1*, *ruvbl2*, *trf1*, *tin2*, *rap1*, *tpp1*, *pot1*) estariam presentes nos cromossomos B de *P. paranae*. Para isso, foram utilizadas bibliotecas de DNA obtidas em DA (SILVA et al., 2021b). As análises bioinformáticas não revelaram diferença no número de cópias para nenhum gene analisado entre as bibliotecas 0B e 1B, sugerindo ausência destes genes no cromossomo B da espécie (Figura 4).

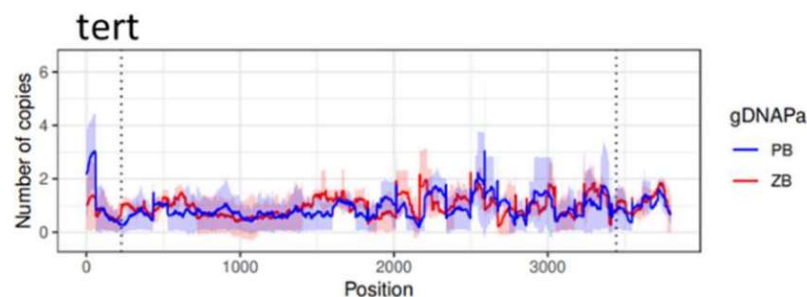


Figura 4 - Gráfico de cobertura em DNaseq do gene codificador da subunidade catalítica da enzima telomerase (*tert*). Notar a alta similaridade nos padrões de cobertura entre bibliotecas ZB e PB, indicando que estes genes não se encontram no cromossomo B. PB = presença de B; ZB = zero B. Retirado de Nadai (2022).

No entanto, resultados obtidos em novas análises bioinformáticas em nosso laboratório (VIDAL, 2022b) indicam a presença dos genes *trf1* e *ruvbl1* na variante de cromossomo BfMa de *P. fasciatus* (Figura 5). Considerando que os cromossomos B frequentemente carregam sequências derivadas do genoma A e podem também reter genes funcionais, é possível que a presença desses genes tenha implicações funcionais ainda desconhecidas, incluindo um possível papel adaptativo

para estes cromossomos. A retenção de genes como *trf1* e *ruvbl1* sugere a necessidade de investigar se os cromossomos B podem atuar na regulação telomérica, seja modulando diretamente a estabilidade dos telômeros ou influenciando processos celulares relacionados.

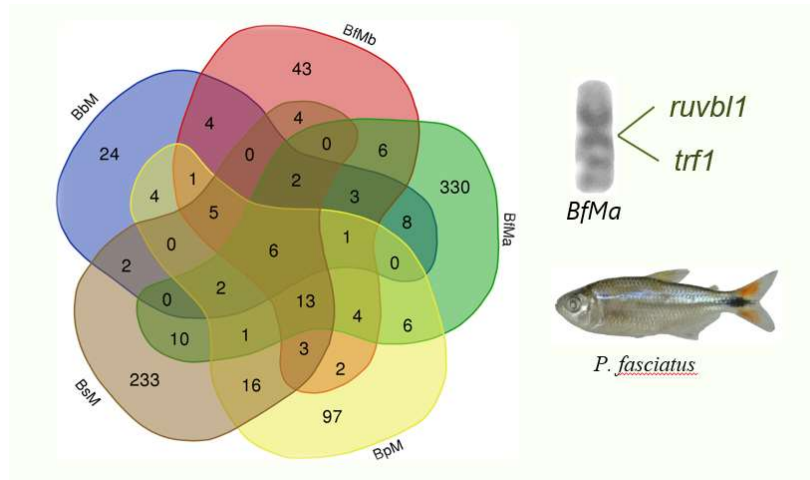


Figura 5 – Análise de conteúdo gênico de variantes de cromossomo B em *Psalidodon fasciatus*. Adaptado de VIDAL, (2022b)

A possível conexão entre os cromossomos B e a atividade telomérica representa uma questão biológica interessante, uma vez que esses elementos genômicos adicionais precisam ser duplicados a cada divisão celular. Essa demanda extra pode impactar a dinâmica da maquinaria de manutenção dos telômeros, exigindo um maior suprimento dos componentes desse sistema. Além disso, por serem estruturas genômicas suplementares ao conjunto cromossômico típico da espécie, os cromossomos B podem influenciar diretamente a manutenção telomérica no genoma total do indivíduo. Esse fenômeno pode resultar em custos biológicos que, por sua vez, poderiam ter efeitos funcionais significativos para os portadores, reforçando a importância de investigar essa relação.

2 OBJETIVO

O presente projeto se insere no programa geral de estudos citogenéticos de peixes neotropicais que vem sendo desenvolvidos no Laboratório de Biologia e Genética de Peixes do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional do Instituto de Biociências da UNESP, Botucatu (SP), visando a um melhor conhecimento do genoma e da estrutura cromossômica dos peixes. Como já apresentado, as espécies do gênero *Psalidodon* constituem um interessante modelo para o estudo dos cromossomos B. Dessa forma, o presente estudo tem como objetivos:

- Verificar se a presença de cromossomos B está associada a alteração no tamanho de

ANCELIN, Katia *et al.* Targeting assay to study the cis functions of human telomeric proteins: evidence for inhibition of telomerase by TRF1 and for activation of telomere degradation by TRF2. **Molecular and cellular biology**, v. 22, n. 10, p. 3474–3487, 1 maio 2002.

ANCHELIN, Monique *et al.* Behaviour of telomere and telomerase during aging and regeneration in zebrafish. **PloS one**, v. 6, n. 2, 2011.

ARAMBURU, Tomas; PLUCINSKY, Sarah; SKORDALAKES, Emmanuel. POT1-TPP1 telomere length regulation and disease. **Computational and structural biotechnology journal**, v. 18, p. 1939–1946, 1 jan. 2020.

ARAT, N. Özlem; GRIFFITH, Jack D. Human Rap1 interacts directly with telomeric DNA and regulates TRF2 localization at the telomere. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 50, 2012.

ARMANIOS, Mary; BLACKBURN, Elizabeth H. The telomere syndromes. **Nature Reviews Genetics** **2012 13:10**, v. 13, n. 10, p. 693–704, 11 set. 2012.

ARTONI, Roberto Ferreira *et al.* *Astyanax* aff. *fasciatus* Cuvier, 1819 (Teleostei; Characidae): evidences of a species complex in the upper rio Tibagi basin (Paraná, Brazil). **Neotropical Ichthyology**, v. 4, n. 2, p. 197–202, 2006.

AZZALIN, Claus M. *et al.* Telomeric repeat containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends. **Science (New York, N.Y.)**, v. 318, n. 5851, p. 798–801, 2 nov. 2007.

BALESDENT, Marie Hélène *et al.* The dispensable chromosome of *Leptosphaeria maculans* shelters an effector gene conferring avirulence towards *Brassica rapa*. **New Phytologist**, v. 198, n. 3, p. 887–898, abr. 2013.

BAUMANN, Peter; CECH, Thomas R. Pot1, the putative telomere end-binding protein in fission yeast and humans. **Science (New York, N.Y.)**, v. 292, n. 5519, p. 1171–1175, 11 maio 2001.

BENETTA, Elena Dalla *et al.* Genome elimination mediated by gene expression from a selfish chromosome. **Science advances**, v. 6, n. 14, 1 abr. 2020.

BESTEIRO, Sébastien *et al.* Autophagy protein Atg3 is essential for maintaining mitochondrial integrity and for normal intracellular development of *Toxoplasma gondii* tachyzoites. **PLoS pathogens**, v. 7, n. 12, dez. 2011.

BIANCHI, Alessandro *et al.* TRF1 is a dimer and bends telomeric DNA. **EMBO Journal**, v. 16, n. 7, p. 1785–1794, 1 abr. 1997.

BLACKBURN, Elizabeth H.; EPEL, Elissa S.; LIN, Jue. Human telomere biology: A contributory and interactive factor in aging, disease risks, and protection. **Science**, v. 350, n. 6265, p. 1193–1198, 4 dez. 2015.

BLAGOJEVIĆ, Jelena. Meeting Abstracts from the 5 th B Chromosome Conference I-1 Welcome to the 5 th B Chromosome Conference. **BMC Proceedings**, v. 2023, n. 20, p. 1, 2023.

BLASCO, María A. The epigenetic regulation of mammalian telomeres. **Nature Reviews Genetics** 2007 8:4, v. 8, n. 4, p. 299–309, abr. 2007.

BONNELL, Erin; PASQUIER, Emeline; WELLINGER, Raymund J. Telomere Replication: Solving Multiple End Replication Problems. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, 1 abr. 2021.

BOUDICHEVSKAIA, Anastassia *et al.* Rye B chromosomes differently influence the expression of A chromosome-encoded genes depending on the host species. **Chromosome research**, 2022.

BROCCOLI, Dominique *et al.* Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2. **Nature genetics**, v. 17, n. 2, p. 235, 1997.

BRYAN, N. C. *et al.* Abundance and survival of microbial aerosols in the troposphere and stratosphere. **ISME Journal**, v. 13, n. 11, p. 2789–2799, 1 nov. 2019.

BUSTIN, Stephen A. *et al.* The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, 1 abr. 2009.

CANO, Maria Izabel Nogueira. A vida nas pontas. **Ciências Hoje**, v. 39, n. 229, p. 16–26, 2006.

CASTRO, Jonathan Pena *et al.* Differential expression of *dmrt1* in *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae) is correlated with B chromosome occurrence. **Zebrafish**, v. 16, n. 2, p. 182–188, 1 abr. 2019.

CASTRO, Simone Vieira *et al.* Proteínas de choque térmico Hsp 70: estrutura e atuação em resposta ao estresse celular. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 4, p. 261–271, 2013.

CELLI, Giulia B.; DE LANGE, Titia. DNA processing is not required for ATM-mediated telomere damage response after TRF2 deletion. **Nature cell biology**, v. 7, n. 7, p. 712–718, jul. 2005.

CESARE, Anthony J.; REDDEL, Roger R. Alternative lengthening of telomeres: models, mechanisms and implications. **Nature Reviews Genetics** 2010 11:5, v. 11, n. 5, p. 319–330, 30 mar. 2010.

CHEN, Lih-Yow; LIU, Dan; SONGYANG, Zhou. Telomere maintenance through spatial control of telomeric proteins. **Molecular and cellular biology**, v. 27, n. 16, p. 5898–5909, 1 ago. 2007.

CHENG, Nai Yuan *et al.* Physiological responses of maize (*Zea mays* L.) seedlings to the B chromosome. **Nucleus (India)**, p. 1–9, 11 fev. 2025.

CHIURILLO, Miguel Angel *et al.* Organization of telomeric and sub-telomeric regions of chromosomes from the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 100, n. 2, p. 173–183, 25 maio 1999.

CHURIKOV, Dmitri; PRICE, Carolyn M. Pot1 and cell cycle progression cooperate in telomere length regulation. **Nature structural & molecular biology**, v. 15, n. 1, p. 79–84, jan. 2008.

CLARK, Frances E.; KOCHER, Thomas D. Changing sex for selfish gain: B chromosomes of Lake Malawi cichlid fish. **Scientific Reports** 2019 9:1, v. 9, n. 1, p. 1–10, 27 dez. 2019.

COLE, C. J.; LEAVENS, C. R. Chromosome preparations of amphibians and reptiles: improved technique. **Herpetological Review**, v. 3, n. 6, p. 102–102, 1971.

COURT, Robert *et al.* How the human telomeric proteins TRF1 and TRF2 recognize telomeric DNA: a view from high-resolution crystal structures. **Mol Cell Biol** ., v. 16, n. 27, p. 5898–5909, 11 jun. 2005.

DALÍKOVÁ, Martina *et al.* New insights into the evolution of the W chromosome in lepidoptera. **The Journal of Heredity**, v. 108, n. 7, p. 709–719, 1 out. 2017.

DE LANGE, Titia. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. **Genes & development**, v. 19, n. 18, p. 2100–2110, 15 set. 2005.

DE LANGE, Titia. Shelterin-mediated telomere protection. **Annual Review of Genetics**, v. 52, p. 223–247, 23 nov. 2018.

DE OLIVEIRA, Beatriz C. D. *et al.* Possible Involvement of Hsp90 in the Regulation of Telomere Length and Telomerase Activity During the *Leishmania amazonensis* Developmental Cycle and Population Proliferation. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, p. 713415, 28 out. 2021.

DENG, Zhong *et al.* Inherited mutations in the helicase RTEL1 cause telomere dysfunction and Hoyeraal-Hreidarsson syndrome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 36, 3 set. 2013.

DHERAWATTANA, A.; SADANAGA, K. Cytogenetics of a crown rust-resistant hexaploid oat with 42 + 2 fragment chromosomes. **Crop Science**, v. 13, n. 6, p. 591–594, 1 nov. 1973.

EDMONSON, Angela M. *et al.* Characterization of a human import component of the mitochondrial outer membrane, TOMM70A. **Cell communication & adhesion**, v. 9, n. 1, p. 15–27, 2002.

FERREIRA, Katiane M. Biology and ecomorphology of stream fishes from the rio Mogi-Guaçu basin, Southeastern Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 5, n. 3, p. 311–326, 2007.

FORESTI, Fausto; ALMEIDA TOLEDO, Lurdes Foresti; TOLEDO, S. A. Toledo F°. Polymorphic nature of nucleolus organizer regions in fishes. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 31, n. 3, p. 137–144, 7 maio 1981.

FRICKE, Ron; FONG, Jon David. **Eschmeyer's Catalog of Fishes - Genera/Species by Family/Subfamily**. Disponível em:
<<https://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>>. Acesso em: 21 mar. 2025.

GAVAZZONI, Mariane *et al.* Morphologically cryptic species of the *astyanax bimaculatus* “caudal peduncle spot” subgroup diagnosed through cytogenetic characters. **Zebrafish**, v. 15, n. 4, p. 382–388, 1 ago. 2018.

GOODSELL, D. S. Telomerase. **RCSB Protein Data Bank**, 1 nov. 2018.

GREGORY, Ryan T. **The Evolution of the Genome**. [S.l.]: Elsevier Inc., 2005.

GREIDER, Carol W. Telomere length regulation. **Annual Review of Biochemistry**, v. 65, p. 337–365, 28 nov. 2003.

GUO, Xiaolan *et al.* Dysfunctional telomeres activate an ATM-ATR-dependent DNA damage response to suppress tumorigenesis. **The EMBO journal**, v. 26, n. 22, p. 4709–4719, 14 nov. 2007.

HARTMANN, Nils *et al.* Telomeres shorten while Tert expression increases during ageing of the short-lived fish *Nothobranchius furzeri*. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 130, n. 5, p. 290–296, maio 2009.

HAYFLICK, Leonard. How and why we age. **Experimental Gerontology**, v. 33, n. 7, p. 639–653, 1998.

HENRIQUES, Catarina M. *et al.* Telomerase is required for zebrafish lifespan. **PLoS Genetics**, v. 9, n. 1, 2013.

HENRY, Isabelle M. *et al.* Phenotypic Consequences of Aneuploidy in *Arabidopsis thaliana*. **Genetics**, v. 186, n. 4, p. 1231, dez. 2010.

HOCKEMEYER, Dirk *et al.* Telomere protection by mammalian Pot1 requires interaction with Tpp1. **Nature structural & molecular biology**, v. 14, n. 8, p. 754–761, ago. 2007.

HOUGHTALING, Benjamin R. *et al.* A dynamic molecular link between the telomere length regulator TRF1 and the chromosome end protector TRF2. **Current biology : CB**, v. 14, n. 18, p. 1621–1631, 21 set. 2004.

HU, Ling-Rui. ATP5F1D: A central player in mitochondrial energy metabolism and its implications in disease. **New Discovery**, p. 1–10, 20 jan. 2025.

HWANG, Helen *et al.* POT1-TPP1 regulates telomeric overhang structural dynamics. **Cell Press**, v. 20, n. 11, 2012.

IMARAZENE, Boudjema *et al.* A supernumerary “B-sex” chromosome drives male sex determination in the Pachón cavefish, *Astyanax mexicanus*. **Current biology : CB**, v. 31, n. 21, p. 4800–4809.e9, 8 nov. 2021.

J BARNES, Shelby *et al.* Modified Phenol Chloroform Genomic DNA Extraction Protocol from the Christner Lab (University of Florida) v2. 23 fev. 2022.

JAFRI, Mohammad A. *et al.* Roles of telomeres and telomerase in cancer, and advances in telomerase-targeted therapies. **Genome Medicine**, v. 8, n. 1, 20 jun. 2016.

JONES, R. N. *et al.* Chromosomes with a life of their own. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 120, n. 3–4, p. 265–280, maio 2008.

JONES, R. Neil. B chromosomes in plants. **New Phytologist**, v. 131, n. 4, p. 411–434, 1995.

KALUDERCIC, Nina; GIORGIO, Valentina. The Dual Function of Reactive Oxygen/Nitrogen Species in Bioenergetics and Cell Death: The Role of ATP Synthase. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2016, 2016.

KAWANISHI, Shosuke; OIKAWA, Shinji. Mechanism of telomere shortening by oxidative stress. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1019, p. 278–284, 2004.

KIM, Sahn-Ho; KAMINKER, Patrick; CAMPISI, Judith. TIN2, a new regulator of telomere length in human cells. v. 23, p. 405, 1999.

LANGE, Titia de; STEENSEL, Bas van. Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. **Nature**, v. 385, p. 740–743, 20 fev. 1997.

LASMAR, Lucas Fortino. **Papel dos pseudogenes na evolução dos cromossomos supranumerários em Psalidodon (Teleostei, Characiformes)**. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, 31 ago. 2022.

LI, Bibo; OESTREICH, Stephanie; DE LANGE, Titia. Identification of human Rap1: implications for telomere evolution. **Cell**, v. 101, n. 5, p. 471–483, 26 maio 2000.

LI, Zhongxun *et al.* FSCN1 acts as a promising therapeutic target in the blockade of tumor cell motility: a review of its function, mechanism, and clinical significance. **Journal of Cancer**, v. 13, n. 8, p. 2528–2539, 2022.

LIU, Dan *et al.* PTP interacts with POT1 and regulates its localization to telomeres. **Nature cell biology**, v. 6, n. 7, p. 673–680, jul. 2004.

LIVAK, Kenneth J.; SCHMITTGEN, Thomas D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

LOAYZA, Diego; DE LANGE, Titia. POT1 as a terminal transducer of TRF1 telomere length control. **Nature** 2003 **423:6943**, v. 423, n. 6943, p. 1013–1018, 25 maio 2003.

LÓPEZ-POSADAS, Rocío *et al.* Inhibiting PGGT1B Disrupts Function of RHOA, Resulting in T-cell Expression of Integrin $\alpha 4\beta 7$ and Development of Colitis in Mice. **Gastroenterology**, v. 157, n. 5, p. 1293–1309, 1 nov. 2019.

MAISTRO, E. L. *et al.* Occurrence of macro B chromosomes in *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characiformes, Characidae). **Genetica**, v. 87, p. 101–106, 1992.

MARTÍNEZ, Paula *et al.* RAP1 Protects from Obesity through Its Extratelomeric Role Regulating Gene Expression. **Cell Reports**, v. 3, n. 6, p. 2059–2074, 27 mar. 2013.

MARTIS, Mihaela Maria *et al.* Selfish supernumerary chromosome reveals its origin as a mosaic of host genome and organellar sequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 33, p. 13343–13346, 14 ago. 2012.

MEEKER, Nathan D. *et al.* Method for isolation of PCR-ready genomic DNA from zebrafish tissues. **BioTechniques**, v. 43, n. 5, p. 610–614, 16 nov. 2007.

MIAO, Vivian P.; COVERT, Sarah F.; VANETTEN, Hans D. A fungal gene for antibiotic resistance on a dispensable ("B") chromosome. **Science**, v. 254, n. 5039, p. 1773–1776, 20 dez. 1991.

MIZOGUCHI, Sonia Maria Hiromi Nakagawa; MARTINS-SANTOS, Isabel Cristtna. Macro-and microchromosomes B in females of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Hereditas**, v. 127, p. 249–253, 1997.

MOREIRA-FILHO, Orlando; BERTOLLO, Luiz Antonio Carlos. *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): A species complex. [S.l.: S.n.]. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/279618588>>.

NADAI, Pamela. **Análise de presença e expressão diferencial de genes associados a manutenção de telômeros em cromossomo B de *Psalidodon paranae* (Characiformes, Characidae)**. Trabalho de Conclusão de Curso—Sorocaba- SP: Universidade Paulista, 2022.

NANDAKUMAR, Jayakrishnan *et al.* The TEL patch of telomere protein TPP1 mediates telomerase recruitment and processivity. **Nature** **2012 492:7428**, v. 492, n. 7428, p. 285–289, 24 out. 2012.

PALM, Wilhelm; DE LANGE, Titia. How shelterin protects mammalian telomeres. **Annual Review of Genetics**, v. 42, p. 301–334, 4 nov. 2008.

PANSONATO-ALVES, J. C. *et al.* Chromosomal mapping of repetitive DNA and cytochrome C oxidase I sequence analysis reveal differentiation among sympatric samples of *Astyanax fasciatus*

(Characiformes, Characidae). **Cytogenetic and genome research**, v. 141, n. 2–3, p. 133–142, nov. 2013.

PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J. W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 83, n. 9, p. 2934–2938, 1 maio 1986.

PORTO-FORESTI, Fábio *et al.* Estimated frequency of B-chromosomes and population density of *Astyanax scabripinnis paranae* in a small stream. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 20, n. 3, p. 377–380, 1997.

RAJPAL, Vijay Rani *et al.* Comprehending the dynamism of B chromosomes in their journey towards becoming unselfish. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 10, 4 jan. 2023.

REIS, R. E. *et al.* Fish biodiversity and conservation in South America. **Journal of fish biology**, v. 89, n. 1, p. 12–47, 1 jul. 2016.

REMANS, Philip H. J. *et al.* Rap1 Signaling Is Required for Suppression of Ras-Generated Reactive Oxygen Species and Protection Against Oxidative Stress in T Lymphocytes. **The Journal of Immunology**, v. 173, n. 2, p. 920–931, 15 jul. 2004.

RUBAN, Alevtina *et al.* How next-generation sequencing has aided our understanding of the sequence composition and origin of B chromosomes. **Genes**, v. 8, n. 11, p. 294, 25 out. 2017.

SAMBROOK, Joseph; RUSSEL, David W. **Sambrook Russel Molecular Cloning, a Laboratory Manual - Vol. 1, 2, 3 (Cold Spring Harbor Cold Spring Press - 3rd Ed, 2001)**. 3rd. ed. [S.l.]: CSHL Press, 2001. v. 1, 2 e 3

SCHOŘOVÁ, Šárka *et al.* The plant Pontin and Reptin homologues, RuvBL1 and RuvBL2a, colocalize with TERT and TRB proteins in vivo, and participate in telomerase biogenesis. **The Plant Journal**, v. 98, n. 2, p. 195–212, 1 abr. 2019.

SFEIR, Agnel *et al.* Mammalian telomeres resemble fragile sites and require TRF1 for efficient replication. **Cell**, v. 138, n. 1, p. 90–103, 10 jul. 2009.

SHAY, Jerry W.; WRIGHT, Woodring E. Telomeres and telomerase: three decades of progress. **Nature Reviews Genetics**, v. 20, n. 5, p. 299–309, 1 maio 2019.

SHELTZER, Jason M. *et al.* Aneuploidy drives genomic instability in yeast. **Science**, v. 333, n. 6045, p. 1026–1030, 19 ago. 2011.

SILVA, Duílio Mazzoni Zerbinato de Andrade. **Análise funcional e evolutiva do cromossomo B em *Astyanax paranae* (Characiformes, Characidae)**. Tese—Botucatu: Instituto de Biociências de Botucatu, 2018.

SILVA, Duílio Mazzoni Zerbinato de Andrade *et al.* Meiotic self-pairing of the Psalidodon (Characiformes, Characidae) iso-B chromosome: A successful perpetuation mechanism. **Genetics and molecular biology**, v. 44, n. 3, 2021a.

SILVA, Duílio Mazzoni Zerbinato de Andrade *et al.* Long-term persistence of supernumerary B chromosomes in multiple species of Astyanax fish. **BMC Biology**, v. 19, n. 1, 1 dez. 2021b.

SILVA, Duílio Mazzoni Zerbinato de Andrade *et al.* **B Chromosomes in Psalidodon scabripinnis (Characiformes, Characidae) Species Complex.** **AnimalsMDPI**, , 1 set. 2022.

SMOGORZEWSKA, Agata; DE LANGE, Titia. **Regulation of telomerase by telomeric proteins.** **Annual Review of Biochemistry**, 2004.

SMOGORZEWSKA, Agata; STEENSE, Bas van; DE LANGE, Titia. TRF2 Protects human telomeres from end-to-end fusions. **Cell**, v. 92, p. 401–413, 1998.

SOBINOFF, Alexander P.; PICKETT, Hilda A. Alternative Lengthening of Telomeres: DNA Repair Pathways Converge. **Trends in genetics : TIG**, v. 33, n. 12, p. 921–932, 1 dez. 2017.

TAKAI, Hiroyuki *et al.* CST–polymerase α -primase solves a second telomere end-replication problem. **Nature** **2024 627:8004**, v. 627, n. 8004, p. 664–670, 28 fev. 2024.

TAKAI, Kaori K. *et al.* In vivo stoichiometry of shelterin components. **The Journal of biological chemistry**, v. 285, n. 2, p. 1457–1467, 2010.

TORGASHEVA, Anna A. *et al.* Germline-restricted chromosome (GRC) is widespread among songbirds. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 116, n. 24, p. 11845–11850, 11 jun. 2019.

TRUETT, Gary E. *et al.* Preparation of PCR-Quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and Tris (HotSHOT). **BioTechniques**, v. 29, n. 1, p. 52–54, 29 ago. 2018.

VALENTE, Guilherme T. *et al.* Origin and evolution of B chromosomes in the cichlid fish *Astatotilapia latifasciata* based on integrated genomic analyses. **Molecular biology and evolution**, v. 31, n. 8, p. 2061–2072, 2014.

VANNIER, Jean Baptiste *et al.* RTEL1 Dismantles T Loops and Counteracts Telomeric G4-DNA to Maintain Telomere Integrity. **Cell**, v. 149, n. 4, p. 795–806, 11 maio 2012.

VIDAL, Mateus Rossetto. **Análise do conteúdo gênico e expressão diferencial de variantes do cromossomo B em Psalidodon (Teleostei, Characiformes)**. Botucatu: [S.n.].

VIDAL, Mateus Rossetto. **Análise do conteúdo gênico e expressão diferencial de variantes do cromossomo B em Psalidodon (Teleostei, Characiformes)**. Dissertação—Botucatu: UNESP, 21 fev. 2022b.

VIDAL, Mateus Rossetto *et al.* Selecting reference genes for RT-qPCR studies involving the presence of B chromosomes in *Psalidodon* (Characiformes, Characidae). **Molecular biology reports**, v. 51, n. 1, 1 dez. 2024.

VON ZGLINICKI, Thomas. Oxidative stress shortens telomeres. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 27, n. 7, p. 339–344, 1 jul. 2002.

WANG, Feng *et al.* The POT1-TPP1 telomere complex is a telomerase processivity factor. **Nature**, v. 445, n. 7127, p. 506–510, 1 fev. 2007.

XIN, Huawei *et al.* TPP1 is a homologue of ciliate TEBP-beta and interacts with POT1 to recruit telomerase. **Nature**, v. 445, n. 7127, p. 559–562, 1 fev. 2007.

YE, Jeffrey Zheng Sheng *et al.* TIN2 binds TRF1 and TRF2 simultaneously and stabilizes the TRF2 complex on telomeres. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 45, p. 47264–47271, 5 nov. 2004.