



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS - RIO CLARO



Ciências Biológicas

Keteryne Rodrigues da Silva

**Estudo de elementos repetitivos presentes no
genoma da espécie *Schizodon borelli*
(CHARACIFORMES: ANOSTOMIDAE).**



Rio Claro
2013

KETERYNE RODRIGUES DA SILVA

Estudo de elementos repetitivos presentes no genoma da espécie *Schizodon borelli*
(CHARACIFORMES: ANOSTOMIDAE).

Orientadora: PATRICIA PASQUALI PARISE-MALTEMPI

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

Rio Claro

2013

597
S586e Silva, Keteryne Rodrigues da
Estudo de elementos repetitivos presentes no genoma da
espécie *Schizodon borelli* (Characiforme, Anostomidae) /
Keteryne Rodrigues da Silva. - Rio Claro, 2013
37 f. : il., tabs., fots.

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

1. Peixe. 2. Sequências repetitivas. 3. COT-1. 4. DNA
repetitivo. 5. Fish. I. Título.

Dedico este trabalho aos meus pais pelo total apoio e confiança.

Agradecimentos

Agradeço:

Primeiramente à Deus, que em momento algum me deixou desacreditar de Sua presença em minha vida e jamais deixou que os momentos ruins me tirassem a fé de que o bem sempre vence.

Em segundo lugar à minha mãe, Maria, e ao meu padrasto, Benedito Tadeu, por estarem sempre ao meu lado buscando me orientar e além de tudo, me ouvir, me apoiando sempre em minhas decisões e confiando em meus passos. Também aos meus demais familiares que assim como meus pais, sempre me deram apoio e acreditaram em mim, contribuindo para minha formação pessoal e também profissional. Amo vocês.

À Prof^a Dr^a Patrícia Pasquali Parise-Maltempi não só pela excelente orientação durante esses 2 anos de trabalho contribuindo para meu crescimento profissional, mas também pela amizade e confiança em mim depositada.

Ao Prof. Dr. Edson Lourenço da Silva, que durante toda elaboração do trabalho sempre se disponibilizou para me ajudar e pela amizade, bem como Rafael Splendore de Borba que me ajudou até o último momento para a finalização deste trabalho, fico muito grata.

Aos amigos de departamento Rafael (Mão) e Allison um agradecimento especial pela amizade e pelas inúmeras risadas que tornaram cada dia de trabalho único e especial. Amizade esta que se estendeu para minha vida pessoal e pela qual tenho muito carinho.

Ao Prof. Dr. Diogo de Cabral Melo, bem como seus alunos Allison Anjos e Octavio Manuel Palacios-Gimenez e colega de laboratório Simone Lilian Gruber por todo apoio técnico, e as colegas de laboratório Carol e Júlia.

A todos os amigos do CBN 2009 pelo convívio durante esses 5 anos, cada um com sua particularidade marcou minha passagem pela graduação de uma maneira especial. E com muito carinho agradeço à Amanda Ribeiro, Bruna Christofolletti e Sibeli De Carli pela grande amizade e pelos bons momentos vividos, bem como pelo apoio nos momentos difíceis que ficarão guardados com muito carinho.

Aos amigos que não pertencem ao ambiente da faculdade, mas que são de extrema importância em minha vida. Sempre ao meu lado em momentos difíceis, e em eternos momentos de muita felicidade.

À Fundação de Amparo À Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento do projeto.

Enfim, agradeço a todos que estiveram presentes em minha vida nesses últimos anos, todos que de alguma forma ajudaram na minha formação pessoal e profissional, ajudando a construir a pessoa que sou hoje.

Obrigada.



“Ainda que eu falasse a língua dos homens e falasse a língua dos anjos, sem amor eu nada
seria.”

(Renato Russo)

RESUMO

Em organismos eucariotos podemos observar a existência de sequências repetitivas de DNA que correspondem a elementos individuais que se repetem varias vezes, e representam grande parte do genoma eucarioto. Muitos estudos mostram que essas sequências podem estar envolvidas em diversos mecanismos além de auxiliarem na manutenção e propagação do material genético celular, em nível cromossômico, tais como, rearranjos por deleções, duplicações, inversões e translocações recíprocas, sendo responsáveis por proporções significativas das variações cariotípicas observadas em muitos grupos. Embora DNAs repetitivos já tenham sido utilizados em análises de citogenética molecular para identificação de cromossomos homólogos e anormalidades cromossômicas e sejam muito estudados em invertebrados e mamíferos, em peixes há poucas informações sobre as sequências e organização genômica e citológica. Através da técnica de COT-1 DNA foram obtidas sequências repetitivas do genoma de *Schizodon borelli*, das quais uma foi selecionada, nomeada de Sc-Cot e realizada hibridação cruzada nas espécies de *Leporinus* e *Schizodon isognathus*, na tentativa de caracterizar esta sequência no genoma das espécies. Sendo assim, este estudo tem como objetivo contribuir para o esclarecimento de eventos importantes ocorridos na família Anostomidae como, por exemplo, aqueles relacionados com a origem dos cromossomos sexuais do grupo, a partir do isolamento de sequências repetitivas do genoma de *S. borelli*.

Palavras-chave: COT-1, DNA repetitivo, FISH.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
2. OBJETIVOS	13
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1. MATERIAL	14
3.2. MÉTODOS.....	14
3.2.1 Extração de DNA de Tecidos Sólidos	14
3.2.2 COT-1 DNA.....	15
3.2.3 Clonagem.....	16
3.2.4 Amplificação do DNA via PCR	17
3.2.5 Sequenciamento	18
3.2.6 Análise das sequências.....	18
3.2.7 Hibridação <i>in situ</i> fluorescente (FISH)	18
4. RESULTADOS	22
4.1 Extração de DNA de Tecidos Sólidos	22
4.2 COT-1 DNA.....	22
4.3 Clonagem	23
4.4 Amplificação do DNA via PCR.....	23
4.5 Sequenciamento	24
4.6 Hibridação <i>in situ</i> fluorescente (FISH).....	26
5. DISCUSSÃO.....	29
6. CONCLUSÃO	32
7. REFERÊNCIAS	33

1. INTRODUÇÃO

1.1 Sequências repetitivas

O genoma de eucariotos apresenta uma variedade de sequências simples e repetitivas. Os DNAs repetitivos possuem sequências individuais que se repetem várias vezes e constituem grandes frações do genoma eucarioto, representando cerca de 95% do genoma de cebolas (FLAVELL et al., 1974) e 50% ou mais do genoma humano (THE GENOME INTERNATIONAL SEQUENCING CONSORTIUM, 2001). São basicamente representados por repetições em tandem, tais como DNAs satélite (satDNA), minissatélites e microssatélites e ou dispersas, como transposons e retrotransposons (CHARLESWORTH et al., 1994). Os DNAs satélites são constituídos de 100 a 300 pb de comprimento e de 1.000 a mais de 100.000 cópias no genoma. Comumente, localizam-se nas regiões terminais e centroméricas de um ou mais locos cromossômicos (MARTINS, 2007). Os minissatélites são constituídos de sequências de 1 a 5 Kb que consistem em números variáveis de uma unidade repetida de 15 a 100 nucleotídeos de comprimento. Os microssatélites são geralmente constituídos de 1 a 6 nucleotídeos com repetições em tandem (LITT et al., 1989; TAUTZ, 1989; WEBER et al., 1989). Os transposons compõem grande parte das sequências moderadamente repetidas do genoma eucariótico, evoluíram através da capacidade de se replicar fazendo cópias de si mesmos e movendo-se para outras regiões do genoma e são caracterizados pela presença de terminações repetidas invertidas e genes codificando para a enzima transposase (CHARLESWORTH, 1994). Já os retrotransposons são uma classe de DNA repetitivo que se propaga através da ação da enzima transcriptase reversa que tem a capacidade de formar um filamento de DNA através de uma molécula RNA (TORRES; MATOSO; ARTONI, 2004).

Até pouco tempo as sequências repetitivas eram consideradas DNA lixo pelo fato de terem sua função desconhecida no genoma e por não transcreverem produtos codificantes, como proteínas e RNAs (NOWAK, 1994). Porém estudos mais recentes vêm demonstrando que essas sequências participam de diversas funções celulares importantes, tais como, o envolvimento no processo de replicação do DNA (LI et al., 2002), de recombinação (BIET et al., 1999), expressão gênica (LIU et al., 2001) e origem e evolução de cromossomos sexuais (STEINEMANN; ESTAINEMANN, 2005; PARISE-MALTEMPI et al., 2007; CIOFFI et al., 2010). Além disso, essas sequências também se encontram presente em centrômeros e telômeros de cromossomos de células eucariotas, com papel importante na manutenção e

propagação do material genético nuclear (MARTINS, 2007). Essas sequências repetitivas são também marcadores citogenéticos importantes que vêm sendo usados para estudar a evolução, organização do genoma, comportamento de cromossomos sexuais e supranumerários, e a identificação de rearranjos cromossômicos em diversos grupos de organismos.

Essas funções e relações com regiões e processos celulares das sequências repetitivas, tornam as mesmas importantes para organização estrutural e funcional, principalmente por estarem envolvidas na evolução do genoma e por terem papel no controle da atividade gênica (BIÉMONT; VIEIRA, 2006; MARTINS, 2007).

As sequências repetitivas de DNA têm sido estudadas em diversos grupos de vertebrados, sendo que grande parte deste estudo destina-se ao grupo dos mamíferos. Sabe-se, no entanto, que os peixes contêm todos os tipos de DNAs repetitivos (VALENTE et al., 2010) e, embora muitos estudos já tenham sido realizados, no qual sequências repetitivas foram localizadas em diferentes regiões de cromossomos de peixes, tais como regiões centroméricas, teloméricas, regiões consideradas marcadores 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 o que estudar sobre essas sequências no genoma deste grupo, tendo em vista que esta classe constitui um grupo extremamente diversificado, os quais representam mais da metade das espécies de vertebrados existentes, com grande importância econômica para o homem na forma de alimento ou obtenção de renda. Estes animais podem evoluir de forma extremamente rápida, o que sugere a presença de ferramentas evolutivas poderosas em seus genomas (OSOUF-COSTAZ et al., 2004).

1.2 Família Anostomidae

A região Neotropical compreende a área mais diversificada de ictiofauna de água doce do mundo (LOWE McCONNELL, 1999). Um estudo com a participação de 64 pesquisadores de vários países estimou que a ictiofauna neotropical compreendia na época do estudo 6.025 espécies distribuídas em 71 famílias de 25 ordens diferentes, sendo que 1.550 espécies ainda não tinham sido descritas (REIS et al., 2003). Não há estudos mais recentes sobre esses números, mas é sabido que as duas ordens mais representativas em número de espécies conhecidas nesta região são Characiformes e os Siluriformes (TORRES; MATOSO; ARTONI, 2004).

Characiformes é uma ordem de peixes actinoptérgios restritos a água doce, que compreende 16 famílias, aproximadamente 270 gêneros e mais de 1700 espécies, (GÉRY, 1977; GREENWOOD et al., 1966). As espécies da ordem Characiformes apresentam uma grande variação na forma corporal, estrutura da mandíbula, dentição e anatomia interna (VARI, 1998). Compreendem espécies de grande importância ecológica e econômica para o Brasil utilizadas na pesca comercial, esportiva e na aquicultura como os curimatás (Prochilodontidae), piaparas e pias (Anostomidae), traíras (Erythrinidae), pacus, tambaquis, dourados e matrinhãs (Characidae) (CHAO et al., 2001).

Dentro de Characiformes a família Anostomidae compreende 138 espécies que estão divididas em 12 gêneros. Possuem representantes em grandes bacias e afluentes da América Central e do Sul, como: Rios Magdalena e Atrato na Colômbia, Orinoco na Venezuela, Rios amazônicos até o sul de Buenos Aires na Argentina (RINGUELET et al. 1967; GARAVELLO; BRITSKI, 2003). A família diferencia-se dos demais Characiformes por seus corpos alongados, nadadeiras anais curtas e pela ausência de dentes na boca (GÉRY, 1977). O gênero *Schizodon*, objeto deste estudo, compreende 14 espécies distribuídas nas bacias hidrográficas da América do Sul, das quais apenas quatro delas, *S. fasciatus*, *S. nasutus*, *S. borelli* e *S. isognathus*, foram estudadas citogeneticamente (MARTINS; GALETTI, 1997). A espécie *S. borelli*, é conhecida popularmente como piava ou chimboré e é caracterizada pela presença de quatro manchas laterais.

As espécies da família Anostomidae possuem $2n=54$ cromossomos meta ou submetacêntrico que parecem ser bastante estáveis durante o curso da evolução (GARAVELLO; BRITSKI, 2003). Uma característica importante da família é a presença de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW nas espécies: *Leporinus elongatus*, *L. conirostris*, *L. aff. elongatus*, *L. macrocephalus*, *L. obtusidens*, *L. reinhardti*, *L. trifasciatus* e *Leporinus sp.*, e a ausência desses cromossomos sexuais nas espécies *L. striatus*, *L. friderici*, *L. lacustres*, bem como nas espécies *S. borelli* e *S. isognathus*, abordadas neste trabalho.

Considerando que somente 5,9% das espécies de peixes Neotropicais estudadas apresentam sistemas de cromossomos sexuais heteromórficos (ALMEIDA-TOLEDO; FORESTI 2001; DEVLIN; NAGAHAMA, 2002; OLIVEIRA et al., 2009), a presença deste sistema em Anostomideos torna este grupo de peixes bastante interessante do ponto de vista citogenético e evolutivo. A maioria dos casos de cromossomos sexuais heteromórficos nas espécies da família Anostomidae é do tipo ZZ/ZW e a diferença entre os homólogos sexuais envolve blocos heterocromáticos (SILVA, 2012).

Diferentes estudos envolvendo cromossomos sexuais e sequências neles presentes vêm demonstrando o quanto os dados obtidos têm sido importantes para a compreensão da diversidade cromossômica e relação cariotípica entre as espécies da família Anostomidae (SILVA; BORBA; PARISE-MALTEMPI, 2012).

Assim a família Anostomidae apresenta quatro particularidades que a coloca em um ponto de vista interessante para modelo de estudo: (I) apresenta espécies com ampla distribuição geográfica, que permite comparações com trabalhos já realizados com espécies de outras regiões; (II) apresenta sistema de cromossomos sexuais heteromórficos presente apenas em algumas espécies desta família, permitindo inferências sobre a evolução destes sistemas através de comparações com as espécies que não os apresentam; (III) a existência de sondas de segmentos de DNAs repetitivos já isolados, que possibilitam estudos comparativos; (IV) a importância dos peixes da família Anostomidae na pesca de subsistência, esportiva e comercial (SILVA, 2012).

Ainda sobre os cromossomos sexuais de peixes, deve ser ressaltado que a ictiofauna Neotropical é muito rica e diversificada quanto sua organização genômica, e a origem da diferenciação dos cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW pode envolver diversos processos relacionados a heterocromatina e portanto sequências repetitivas como por exemplo acúmulo de segmentos heterocromáticos nos cromossomos seguido pelo aumento do cromossomo W em relação ao Z (CENTOFANTE et al., 2001) e/ou acúmulo de heterocromatina seguido de perda sequencial de material genético (BERTOLLO; CAVALLARO, 1992; CARVALHO et al., 2002). Pode haver ainda substituições de segmentos heterocromáticos e rearranjos seguidos ou não pela perda de material heterocromático (CENTOFANTE et al., 2003; ARTONI et al., 1998; ALMEIDA TOLEDO et al., 2000; ROSA et al., 2006 para maior revisão). Uma forma de entender a dinâmica e a composição desta heterocromatina presente nos cromossomos sexuais e, conseqüentemente, analisar a evolução desses cromossomos, é estudar as sequências repetitivas que os compõe, o que justifica os objetivos propostos no presente trabalho.

Estudos cromossômicos desenvolvidos em peixes vêm contribuindo significativamente para o conhecimento do genoma deste grupo de vertebrados. A maioria das informações disponíveis provém de análises citogenéticas básicas, na qual um número muito pequeno de trabalhos tem descrito sequências de DNA e sua organização no genoma (MARTINS, 2007). Sequências repetidas como DNAs satélites, minissatélites, microssatélites, genes repetidos em tandem, têm sido descritas para várias espécies de peixes, e essas sequências podem ser utilizadas como marcadores cromossômicos, muito utilizados

em estudos de evolução, bem como na organização do genoma como um todo (MARTINS, 2007).

Para realização deste trabalho foram utilizadas técnicas que envolvem a chamada citogenética molecular que é utilizada para identificação e caracterização de sequências específicas do DNA no cromossomo, consistindo basicamente no pareamento deste segmento do DNA com uma sequência de nucleotídeos complementares na célula-alvo (GUERRA, 2004).

Na citogenética de peixes, a técnica de hibridação fluorescente *in situ* (FISH) revela-se uma ferramenta muito importante, pois permite a caracterização de uma grande diversidade cariotípica, em particular sobre a origem dos cromossomos sexuais e de supranumerários, bem como da organização genômica de segmentos cromossômicos (GALETTI JR; MARTINS, 2004).

A técnica de COT-1 DNA é uma das metodologias utilizadas para o isolamento de sequências repetitivas, que embora ainda pouco explorada, vem demonstrando ser uma ferramenta muito útil. Esta técnica que é baseada nos princípios de renaturação cinética do DNA promove o isolamento de grandes frações de sequências repetitivas de diferentes tamanhos. Esse DNA vem sendo utilizado com mais frequência em experimentos de hibridação fluorescente *in situ* cromossômico quando o objetivo é hibridar sondas de cromossomos inteiros, evitando desta forma a hibridação inespecífica de sequências repetitivas (PARISE-MALTEMPI, comunicação pessoal).

2. OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho foi isolar sequências repetitivas presentes no genoma de *Schizodon borelli* e analisar a organização destas sequências e suas distribuições cromossômicas, na tentativa de encontrar alguma sequência repetitiva que pudesse estar envolvida em importantes eventos no genoma da espécie ou de peixes em geral, utilizando a técnica do COT-1 DNA.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

O material utilizado faz parte da coleção de tecidos e preparações citogenéticas já existentes no Laboratório de Citogenética da UNESP de Rio Claro. Foram utilizadas amostras de tecido e preparações cromossômicas da espécie *S. borelli* provenientes do rio Miranda, Mato Grosso.

Foram utilizadas também preparações de diferentes espécies de *Leporinus*, disponíveis no laboratório de citogenética. Esse material foi previamente coletado em diferentes rios do estado de São Paulo e do Mato Grosso.

3.2. MÉTODOS

3.2.1 Extração de DNA de Tecidos Sólidos

A extração de DNA de amostras de fígado e/ou nadadeiras foi realizada utilizando a técnica de Fenol-Clorofórmio-Álcool isoamílico, de acordo com o protocolo que segue (SAMBROOK, 2001).

Foi preparado um mix com as seguintes quantidades de soluções:

Soluções	Volume/Amostra
NaCl 5 M	80 µL
Tris HCl 2M pH 8	40 µL
SDS 10%	200 µL
EDTA 0,5 M pH 8	200 µL
Rnase (10mg/µL)	40 µL
Água autoclavada	3440 µL
Volume Final	4000 µL

Em um homogeneizador mantido no gelo, foram adicionados 4 mL da solução de digestão juntamente com pequenos pedaços de tecidos em uma cubeta, que foram homogeneizados. A solução foi levada ao banho maria a 50°C por 30 minutos e foram acrescentados 20 µL de Proteinase K (20mg/mL) e levada novamente ao banho maria a 50°C, em tubos de centrífuga cobertos com parafilm, durante 2-4 horas, homogeneizando o

material periodicamente. Dentro da capela, foram acrescentados 400 μL de Fenol/Clorofórmio/Álcool isoamílico, e após agitar durante 15 minutos o material foi levado a centrifuga a 7000 rpm por 15 minutos. Após isso o sobrenadante foi retirado cuidadosamente para um novo tubo e foram acrescentados 4 μL de NaCl a 5 M e duas vezes o volume coletado de etanol absoluto. O material foi novamente centrifugado a 7000 rpm por 10 minutos e logo em seguida descartado o sobrenadante. Foram acrescentados 3 mL de etanol 70% e realizada novamente a centrifugação a 10000 rpm por 5 minutos, descartando o sobrenadante. Após secar em estufa por aproximadamente 1 hora o material foi ressuspenso em 100 μL de água autoclavada e armazenado em freezer.

3.2.2 COT-1 DNA

Este procedimento foi baseado na técnica de COT-1 (DNA enriquecido com sequências alta e moderadamente repetitivas) seguindo o protocolo descrito em Trifonov et al. (2009), com algumas modificações.

Foram fragmentados 150 μL de DNA (100ng) em Sonicador 11% 40V por 3 segundos com o objetivo de se obter uma banda de aproximadamente 500 pb e o resultado foi analisado em gel de agarose 1%. O DNA foi precipitado em 15 μL de NaCl 4M e 300 μL de etanol 100% gelado, mantido em freezer -80°C por 20 minutos e centrifugado por 10 minutos à 14000 rpm. O sobrenadante foi retirado, e após seco, o material foi eluído em 20 μL de água autoclavada. A solução foi desnaturada a 95°C por 5 minutos, foram adicionados 1,2 μL de 20xSSC e a mistura foi deixada em banho a 60°C por 2 horas. Foram acrescentados 2 μL de tampão e 0,2 μL de enzima S1 (Sigma), passado no vortex e a mistura foi incubada a 42°C por 1 hora. Foram acrescentados 0,5 μL de NaCl a 4M e 25 μL de isopropanol, colocados no freezer por 15 minutos e centrifugado por 15 minutos à 14000 rpm. Foram adicionados 100 μL de etanol 70% e foi feita centrifugação por 10 minutos à 14000 rpm. O sobrenadante foi descartado e, após secar, foi diluído em 20 μL de água autoclavada e armazenado em freezer para posterior clonagem.

O produto da reação de COT-1 DNA foi aplicado em gel de agarose 1% e o fragmento observado foi extraído e posteriormente purificado.

3.2.3 Clonagem

O produto resultante da digestão com a enzima S1 foi ligado ao vetor pMOS Blue (GE) de acordo com o protocolo sugerido pela empresa.

Inicialmente foi feita uma reação de fosforilação seguindo o protocolo:

Soluções	Volume/Amostra
Pk buffer 10x	1 µL
DTT 100mM	0,5 µL
Pk mix enzima	1 µL
Amostra (produto do COT-1 DNA)	5 µL
Água autoclavada	2,5 µL
Volume Final	10 µL

A solução foi incubada a 22° C por 40 minutos e aquecida a 75° C por 10 minutos. Foi colocada no gelo por 2 minutos e feita uma centrifugação. Após isso foi feita a ligação deste produto com o vetor da seguinte forma:

Soluções	Volume/Amostra
Vetor	1 µL
Produto obtido da reação Pk	10 µL
T4 DNA ligase	1 µL
Volume Final	12 L

A solução foi incubada a 22° C overnight e armazenada na geladeira.

Para a transformação:

Foram pipetadas 20 µL de células competentes em cada tubo e adicionado 4 µL de ligação direto nas células. Após misturar gentilmente, os tubos foram deixados no gelo por 30 minutos e em seguida foi dado um choque térmico por exatos 40 segundos em banho Maria a 42° C. Após mais 2 minutos em gelo foi adicionado 80 µL de meio Soc (RT) em cada tubo, que foram deixados no shaker por 1 hora a 37° C. A mistura foi então aplicada em placas preparadas com ampicilina e X-Gal. As placas foram incubadas em estufa a 37° C por aproximadamente 12 horas e armazenadas em geladeira.

3.2.4 Amplificação do DNA via PCR

Os clones recombinantes foram testados através da técnica de PCR utilizando os primers universais M13 F – GTA AAA CGA CGG CCA G e M13 R – CAG GAA ACA GCT ATG AC. As amostras foram amplificadas de acordo com o protocolo que segue.

Foi preparado um mix com as seguintes quantidades de soluções:

Soluções	Volume/Amostra
Taq Polimerase	0,5 µL
Tampão de reação	2,5 µL
Primer M13 F	1,25 µL
Primer M13 R	1,25 µL
dNTP	1,25 µL
Água autoclavada	18,75 µL
DNA (100-200 mg/ µL)	2 µL
Volume Final	27,5 µL

A reação de PCR foi realizada nas condições gerais de desnaturação a 95°C durante 3 minutos, 34 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 50°C durante 1 minuto, extensão de 72°C durante 2 minutos e alongação a 72°C por 5 minutos e finaliza a reação a 10 °C.

Para a visualização dos resultados, foram aplicados 3 µL de produtos de PCR em gel de agarose 1,0%, corados com SYBR[®] Safe (10.000x) (Invitrogen[®]), em 2 µL de tampão de corrida blue juice (10x). O gel foi visualizado em transluminador de luz ultravioleta, a fim de verificar a qualidade dos fragmentos amplificados. Para a visualização do tamanho do produto gênico obtido foi utilizado o marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen[®]).

Os clones que se mostraram de tamanho suficiente para serem utilizados como sondas na hibridação fluorescente *in situ* foram armazenadas em glicerol em freezer -80C.

3.2.5 Sequenciamento

Para o sequenciamento dos produtos de PCR, as amostras foram purificadas através do tratamento com a enzima ExoSAP-IT (GE Healthcare) utilizando-se 10 µL de produto de PCR, 2 µL ExoSAP e 2 µL H₂O milli-Q autoclavada. A reação foi levada ao termociclador em um ciclo de 1 hora a 37 °C seguido por um ciclo de 15 minutos a 80 °C.

Após a purificação, as amostras foram enviadas à empresa Macrogen Inc. (Seoul, Coréia) para o sequenciamento.

3.2.6 Análise das sequências

A edição das sequências foi feita utilizando o programa BioEdit, através do qual 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*. As sequências foram alinhadas através da ferramenta ClustalW (HIGGINS; SHARP, 1988).

As sequências que correspondem a fragmentos do vetor foram retiradas das sequências consenso utilizando a ferramenta online de edição VecScreen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/>). A ferramenta BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool* (ALTSCHUL et al., 1990), no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) foi utilizada para comparação das sequências obtidas com sequências já depositadas no banco de dados.

3.2.7 Hibridação *in situ* fluorescente (FISH)

Para a técnica de FISH, a marcação da sonda foi realizada utilizando as técnicas de *Nick Translation* ou PCR, descritas abaixo, seguindo o protocolo Pinkel et al. (1986) com modificações de Silva et al. (2012).

Marcação de sonda por *Nick Translation*:

Foi preparado um mix com as seguintes quantidades de soluções:

Soluções	Volume/Amostra
10x NT Buffer	2 µL
dCTP 0,4mM	2 µL
dATP 0,4mM	2 µL
dGTP 0,4mM	2 µL
dTTP 0,4mM	0,7 µL
Água autoclavada	2,78 µL
Digoxigenina	0,52 µL
Produto do PCR	5 µL
DNA polimerase I/DNAse I	3 µL
Volume Final	20 µL

O programa para a marcação da sonda por *Nick Translation* seguiu as condições gerais de 16°C durante 90 minutos, seguidos de 10 minutos a 65°C e temperatura de manutenção a 10°C.

Marcação de sonda por PCR:

Foi preparado um mix com as seguintes quantidades de soluções:

Soluções	Volume/Amostra
Tampão	5 µL
dCTP 2mM	1 µL
dATP 2mM	1 µL
dGTP 2mM	1 µL
dTTP 0,4mM	1 µL
Água autoclavada	30 µL
Digoxigenina	0,5 µL
Produto do PCR	1 µL
Primer M13 F	1 µL
Primer M13 R	1 µL
MgCl ₂	7 µL
Taq Polymerase	0,5 µL
Volume Final	50 µL

O programa para a marcação da sonda por PCR seguiu as condições gerais de desnaturação inicial a 95°C durante 3 minutos, seguida de 34 ciclos de desnaturação a 94°C

por 30 segundos, anelamento a 50°C por 1 minuto, alongação a 72°C por 2 minutos, seguida pela extensão final a 72°C durante 5 minutos, com temperatura de manutenção a 10°C.

Precipitação de sonda:

Após a marcação, as sondas foram transferidas para um eppendorf de 1,5 mL, foram adicionados 1 mL de Álcool etílico 100% gelado e 2 µL de NaCl e levado para centrifugar a 14000 rpm por 30 minutos a 4 °C. Após isso, foi adicionado 1 mL de etanol 70% e levado à centrifuga por mais 30 minutos e 14000 rpm. Por último, foi retirado o sobrenadante, e após secar totalmente o eppendorf a sonda foi eluída em 12 µL de água autoclavada.

Tratamento das lâminas

As preparações citológicas foram pingadas nas lâminas em banho maria a 60°C e as lâminas foram deixadas com a suspensão de células em estufa a 37°C por pelo menos 4 horas para fixar bem o material sobre a mesma. Cada lâmina foi desidratada em série alcoólica 70, 90 e 100% por 5 minutos e incubadas em 100 µl de RNase (0,4 % RNase/2xSSC) a 37° C por 1 hora em câmara úmida. As lâminas foram lavadas três vezes por 5 minutos em 2xSSC e uma vez durante 5 minutos em PBS. As lâminas foram também incubadas em solução de pepsina 0,005% a 37°C por aproximadamente 10 minutos (este tempo é variável de acordo com o material). Foram lavadas duas vezes por 2 minutos em 2xSSC e desidratadas em série alcoólica 70, 90 e 100% por 5 minutos.

Desnaturação dos cromossomos

O DNA cromossômico foi desnaturado com formamida 70 % em 2xSSC, a 70 °C por 1':10" para as espécies de *Schizodon* e 5' para as espécies de *Leporinus* (este tempo é variável de acordo com o material). As lâminas foram desidratadas em série alcoólica (gelada a -20° C) 70, 90 e 100% por 5 minutos.

Desnaturação da sonda

A solução de hibridação é preparada considerando o tipo de sonda e o material contido na lâmina a ser hibridada. Para este material foram adicionados 6 μL da sonda marcada e 24 μL do tampão de hibridação (*Hybuffer*) por lâmina em um tubo. A solução de hibridação foi desnaturada em termociclador a 95°C por 10 minutos e cada lâmina foi montada com 30 μL de solução de hibridação contendo a sonda, cobertas com lamínula, e o conjunto mantido voltado para baixo *overnight* a 37° C em câmara úmida.

Lavagens

As lamínulas foram retiradas cuidadosamente e lavadas duas vezes em 2xSSC a 42 °C por 5 minutos e uma vez com 4xT (100 mL 20xSSC + 250 μL de Triton + 400 mL de H₂O) em temperatura ambiente por 5 minutos.

Deteção e amplificação do sinal de sondas marcadas com digoxigenina

Cada lâmina foi incubada com 4 μL de Anti digoxigenina rodamina + 26 μL de 4xT por 30 minutos a 37 °C. Foram feitas duas lavagens por 5 minutos com 4xT a 42 °C.

Montagem das lâminas

Para montagem das lâminas foram colocados aproximadamente 10 μL de solução de DAPI + *antifading* sobre cada lâmina. As lâminas foram cobertas com lamínula, e armazenadas em geladeira no escuro.

4. RESULTADOS

4.1 Extração de DNA de Tecidos Sólidos

A partir da análise do gel de agarose observa-se que o DNA de alguns indivíduos de *S. borelli* foi extraído com sucesso. As amostras que apresentaram melhores resultados foram selecionadas para serem submetidas a técnica de COT-1 DNA (Figura 1).

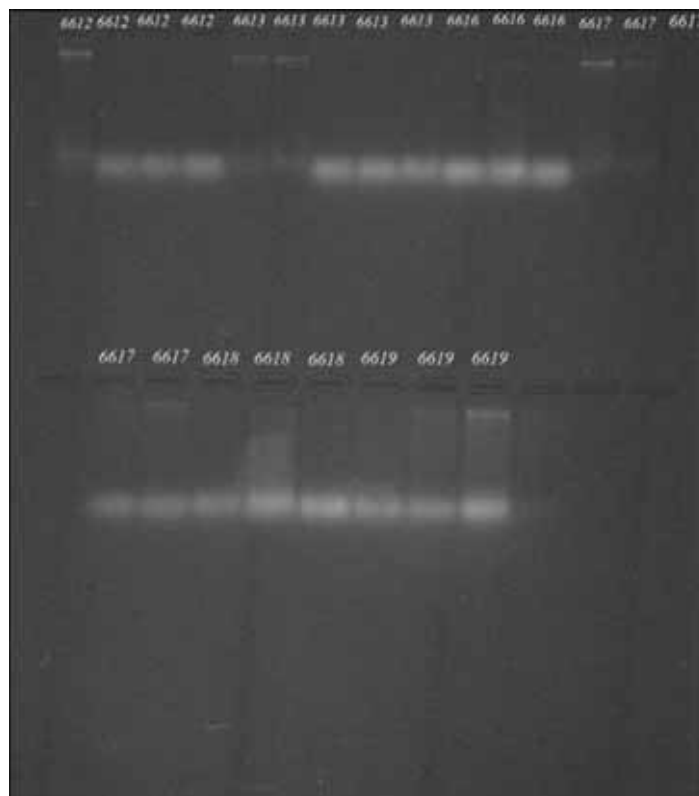


Figura 1: Gel de agarose para observação da extração do DNA de diferentes exemplares da espécie *S. borelli*.

4.2 COT-1 DNA

Através do gel de agarose observa-se que o DNA foi fragmentado em diferentes tamanhos após o protocolo do COT-1 DNA, predominando um arraste entre 300 e 800 pb conforme o esperado (Figura 2).

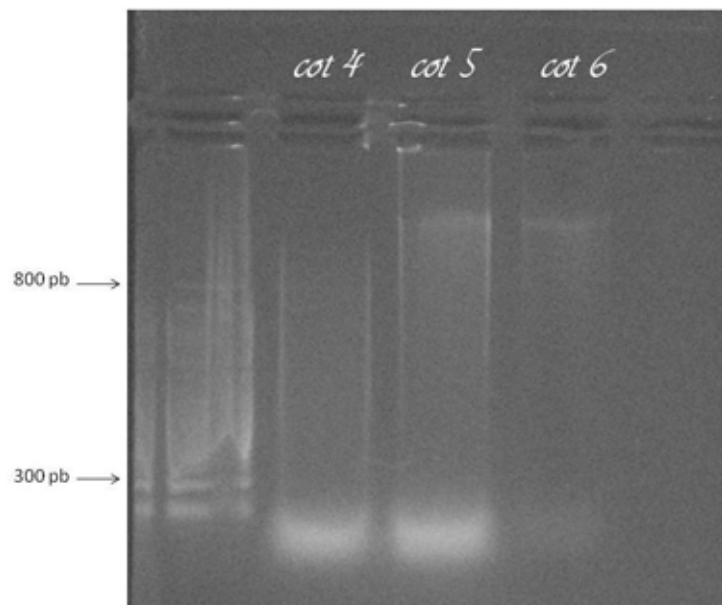


Figura 2: Gel de agarose para observação da fragmentação do DNA a partir da técnica de COT-1DNA. Detalhe a esquerda do gel, ladder 1 Kb Plus (Invitrogen).

4.3 Clonagem

A clonagem foi realizada utilizando-se a amostra COT 4, tendo como resultado diversas colônias recombinantes, que foram armazenadas em glicerol no freezer $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para futuros estudos.

4.4 Amplificação do DNA via PCR

A partir da análise do gel de agarose, observa-se que os fragmentos de DNA da espécie estudada foram amplificados e apresentam sequências de tamanhos diversos, os quais foram enviados para sequenciamento (Figura 3).



Figura 3: Gel de agarose para observação da amplificação do DNA via PCR.

4.5 Sequenciamento

Foram obtidas sequências de diferentes tamanhos, variando de 50 pb até 1021pb. Ao utilizar a ferramenta BLAST, verificou-se que são sequências que apresentam similaridade com diferentes organismos, sendo que algumas delas são de peixes, existindo entre elas regiões de microssatélites e transposons como observado na tabela abaixo (Tabela 1).

Nome	Clone	Tamanho	BLAST
KE1	1 ₁	331	Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-166L1 in linkage group 14, complete sequence CR589950.13
KE2	2 ₁	122	Xenopus (<i>Silurana</i>) <i>tropicalis</i> NHS-like protein 1-like (LOC100498628), transcript variant X2, mRNA XM_004911659.1
KE3	3 ₁	645	<i>Dicentrarchus labrax</i> chromosome sequence corresponding to linkage group 1, top part, complete sequence FQ310506.3
KE4	5 ₁	191	<i>Choerodon rubescens</i> microsatellite CruD9 sequence HM754316.1
KE5	6 ₁	50	<i>Butyrivibrio proteoclasticus</i> B316 chromosome 1, complete sequence CP001810.1
KE6	8 ₁	136	Mouse DNA sequence from clone RP23-260P9 on chromosome X, complete sequence AL670220.8
KE7	9 ₁	304	<i>Cyprinus carpio</i> clone 433869 microsatellite sequence JN741322.1
KE8	10 ₁	92	<i>Arabidopsis thaliana</i> chromosome 1, complete sequence CP002684.1
KE11	2 ₂	413	<i>Tetraodon nigroviridis</i> partial 28S rRNA gene and partial 3' intergenic spacer, clone C1CE008ZF03
KE12	3 ₂	198	<i>Methanoseta harundinacea</i> 6Ac, complete genome CP003117.1
KE13	5 ₂	245	Human DNA sequence from clone RP11-406O16 on chromosome 6, complete sequence AL593844.4
KE15	7 ₂	173	Zebrafish DNA sequence from clone DKEYP-92E4 in linkage group 5, complete sequence CR759825.7
KE18	7 ₁	1021	Zebrafish DNA sequence from clone CH211-195H14 in linkage group 15, complete sequence CR847979.6
KE25	2 ₂	400	<i>Pinctada radiata</i> DNA, rRNA intergenic spacer, 5' partial sequence, sample 2 AB214499.1
KE26	4 ₂	163	<i>Clavispora lusitaniae</i> ATCC 42720 hypothetical protein, mRNA XM_002617443.1
KE28	6 ₂	232	Human DNA sequence from clone RP11-406O16 on chromosome 6, complete sequence AL593844.4
KE32	12 ₁	259	Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-204G14 in linkage group 5, complete sequence CT978957.9
KE36	8 ₂	144	<i>Spermophilus tridecemlineatus jumonji</i> domain containing 4 (Jmjd4), transcript variant X2, mRNA XM_005341283.1

Tabela 1: Tabela do sequenciamento da espécie *S. borelli*, com a representação do tamanho das seqüências e sua similaridade de acordo com a ferramenta BLAST.

O clone 7₁ apresentou 1021 pb e, com o uso da ferramenta BLAST, mostrou similaridade com Zebrafish, [CR847979.6](#). Este clone foi selecionado para dar procedimento as atividades, devido ao tamanho da sequência, que se acredita ser bom para utilização nos experimentos de hibridação *in situ* cromossômica. Esta sequência foi então nomeada de Sc-Cot.

4.6 Hibridação *in situ* fluorescente (FISH)

A técnica de hibridação *in situ* fluorescente foi realizada utilizando marcação das sondas por *Nick Translation* e *PCR*, com digoxigenina, porém os melhores resultados obtidos foram as sondas marcadas por *Nick translation*, devido ao tamanho das sequências. As metáfases obtidas apresentaram marcações no braço longo de um par cromossômico, que devido ao fato do complemento possuir cromossomos de tamanhos muito semelhantes, não pode ser precisamente identificado (Figura 4). Os dois pontos que também aparecem no núcleo interfásico confirmam a quantidade de marcações existentes.

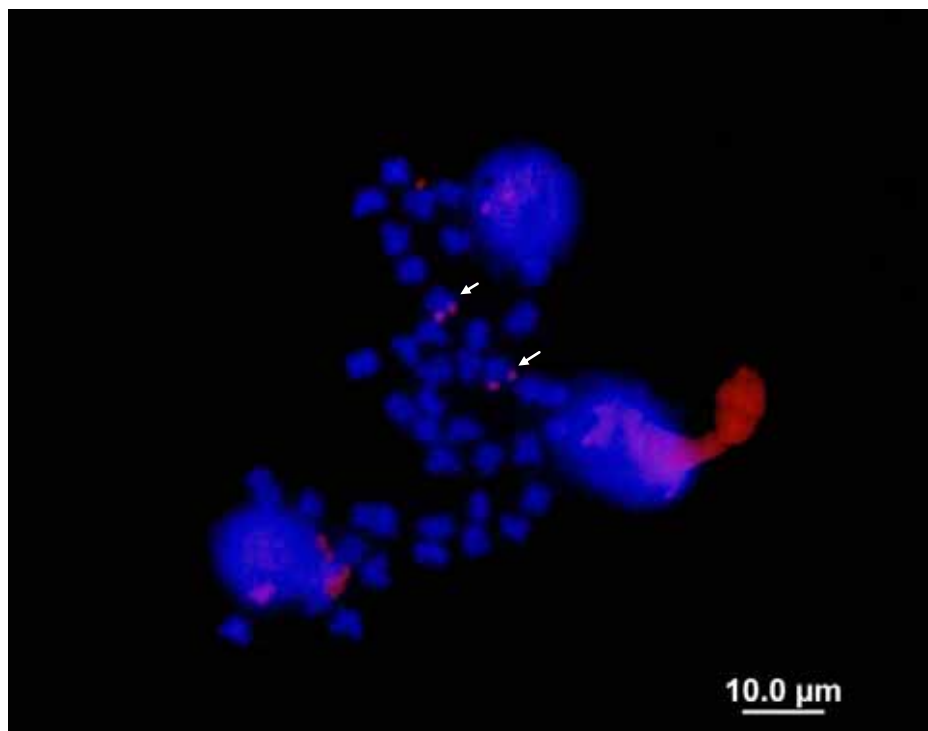


Figura 4: Hibridação *in situ* Fluorescente nos cromossomos de *S. borelli*. A seta indica a marcação da sequência Sc-COT nos cromossomos.

Na técnica de hibridação cruzada (*Cross FISH*), foi utilizado o mesmo clone como sonda para hibridar os cromossomos de outra espécie, *S. isognathus* (Figura 5), bem como em diferentes espécies de *Leporinus* (Figura 6), e assim verificar se encontramos um possível marcador cromossômico para este grupo de peixes.

Ao analisar a figura 5, pode-se observar que a sequência Sc-Cot hibridou nos cromossomos de *S. isognathus* apresentando uma marcação no braço longo de um par cromossômico, semelhante com aquela observada em *S. borelli*.

Para as espécies de *Leporinus*, a sequência Sc-Cot hibridou apenas aquelas espécies que não apresentam cromossomos sexuais: *L. friderici* (Figura 6A), *L. lacustres* (Figura 6B) e *L. striatus* (Figura 6C) apresentando uma marcação no braço longo de um par cromossômico, também semelhante àquela presente em *S. borelli*. Já nas espécies *L. elongatus* e *L. macrocephalus* não houve marcação cromossômica da sequência Sc-Cot.

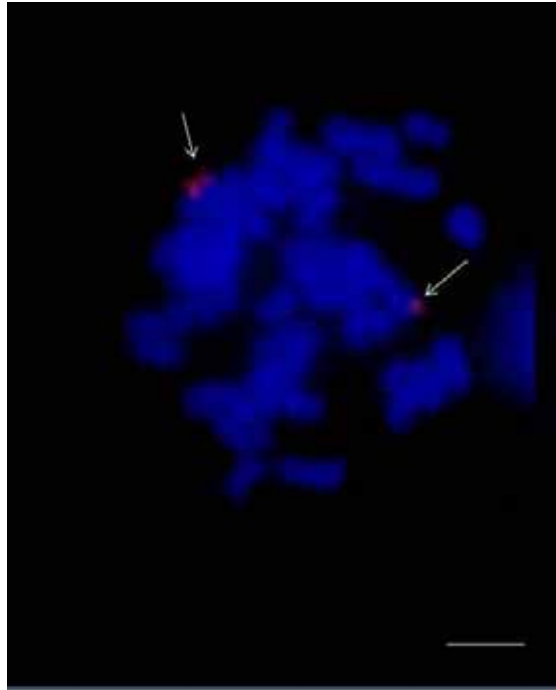


Figura 5: Hibridização *in situ* Fluorescente nos cromossomos de *Schizodon isognathus*. A seta indica a marcação da sequência Sc-COT nos cromossomos. Esta escala corresponde a 10 μ m.

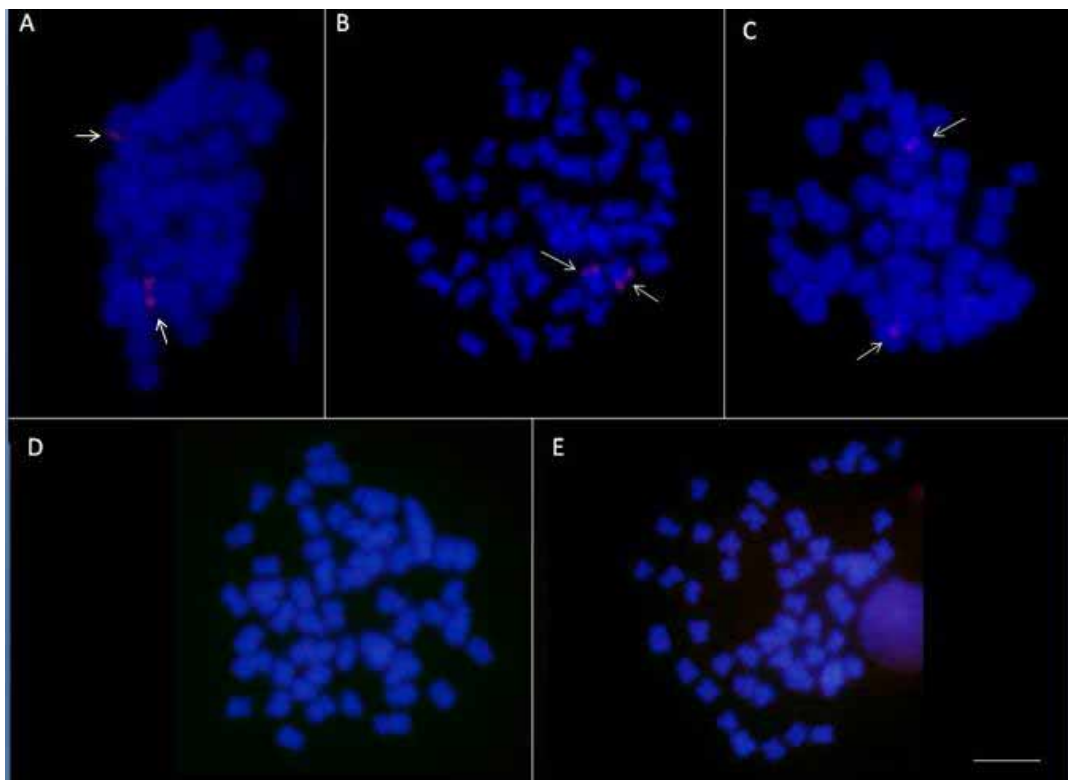


Figura 6: Hibridização *in situ* Fluorescente usando a sequência Sc-Cot nos cromossomos de diferentes espécies de Anostomidae: (A) *Leporinus friderici*, (B) *Leporinus lacustres*, (C) *Leporinus striatus*, (D) *Leporinus elongatus*, (E) *Leporinus macrocephalus*, (F). Esta escala corresponde a 10 μ m.

5. DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objetivo isolar sequências repetitivas utilizando a técnica de COT-1. Muitos trabalhos nos quais foram descritas novas sequências repetitivas de genomas de diferentes vertebrados foram publicados nos últimos anos. Porém, a maioria deles usou a técnica de digestão enzimática que envolve a digestão do DNA genômico de um organismo com enzimas de restrição. O uso desta técnica tem se mostrado bastante eficiente e, muitas sequências interessantes já foram isoladas por meio dela, no entanto, na maioria dos casos, são necessários testes com muitas enzimas até que se consigam bandas de prováveis sequências de DNA repetitivos.

O DNA repetitivo obtido por meio da técnica de COT-1 vem sendo utilizado como bloqueador de sequências repetitivas inespecíficas em experimentos de hibridação *in situ* cromossômica. Quando se faz uso de sondas de cromossomos totais provenientes de citometria de fluxo ou microdissecção, os resultados do FISH quase sempre mostram muitas marcações inespecíficas nos outros cromossomos, que não aquele de interesse, devido a grande quantidade de sequências repetitivas presentes nos genomas. Para diminuir o background, pesquisadores têm feito uso deste COT DNA, que é colocado juntamente com a sonda para desnaturar e assim acredita-se que, como o COT-1 é constituído de sequências repetitivas de diferentes tamanhos, ele acaba anelando com outras sequências repetitivas presentes junto à sonda, bloqueando-as, diminuindo assim as marcações inespecíficas.

Pensando nas características do COT-1 DNA e no fato de que após a digestão com a enzima S1 tem-se um produto com diferentes sequências repetitivas de diferentes tamanhos, teve-se a idéia de usar esta técnica para isolar prováveis sequências repetitivas interessantes de maneira mais rápida e ampla do que utilizando a digestão com enzimas de restrição.

Após a clonagem deste produto verificou-se a presença de fragmentos de diversos tamanhos, variando de 50 à 1021 pb, o que indicou que o experimento deveria ser continuado, uma vez que foram obtidos fragmentos com mais de 600 pb, considerados de bom tamanho para análises cromossômicas.

Após o sequenciamento, os resultados foram analisados comparativamente com outras sequências disponíveis no *GenBank* e algumas delas mostraram similaridade com diversos fragmentos, e algumas apresentaram similaridade entre si. Após esta análise algumas sequências foram selecionadas, principalmente pelo tamanho. A sequência 7₁ de 1021 pb apresentou similaridade com a sequência Zebrafish, [CR847979.6](#).

Foram feitos testes de hibridação *in situ* com várias sequências obtidas, mas dos clones testados, a sequência 7₁ foi a que mostrou melhores resultados e por isso foi escolhida. Pretende-se analisar os outros clones obtidos em trabalhos futuros.

Na primeira parte das análises cromossômicas foi utilizada a sonda 7₁, nomeada de Sc-Cot, em cromossomos da espécie *S. borelli*, da qual foi isolada a sequência. Como resultado, foi possível observar metáfases com marcações no braço longo de um par cromossômico como pode ser visto na figura 4.

Após a observação de clara marcação nos cromossomos de *S. borelli*, partiu-se para a hibridação cruzada, também chamada de Cross FISH, da sequência 7₁ nos cromossomos de outra espécie do gênero, *S. isognathus*. Neste experimento foi possível observar metáfases com marcações no braço longo de um par cromossômico muito semelhantes com aquelas presentes na espécie *S. borelli* como podemos observar nas figura 4 e 5, demonstrando assim que, apesar do número de amostra ainda ser pequeno, devido a falta de material cromossômico das demais espécies do gênero no laboratório, aparentemente a sequência isolada pode ser um marcador para o gênero.

Também foi realizada a técnica de Cross FISH da sequência 7₁ nos cromossomos de outras espécies, mas agora do gênero *Leporinus*. Na espécie *L. friderici* foi possível observar metáfases com marcações no braço longo de um par cromossômico, bem parecidas com aquelas observadas nas espécies de *Schizodon*. O mesmo ocorreu para as espécies *L. lacustres* e *L. striatus*. Porém, na hibridação cruzada realizada nos cromossomos das espécies *L. elongatus* e *L. macrocephalus* não foi observada nenhuma marcação cromossômica, o que demonstra que a sequência Sc-Cot não marca estas espécies. A técnica de FISH foi realizada diversas vezes modificando a forma de marcação de sonda, tempo de desnaturação dos cromossomos e modo de lavagem pós hibridação e em nenhuma das vezes foi possível observar marcações nos cromossomos destas espécies.

Os trabalhos recentes envolvendo marcadores cromossômicos do grupo dos *Leporinus* vêm sendo de grande importância para fornecer cada vez mais dados sobre a organização cromossômica e genômica do grupo (PARISE-MALTEMPI et al, 2007; SILVA et al, 2012). Nesses trabalhos citados foram descritas sequências repetitivas que na maioria dos casos estão envolvidas com o sistema de cromossomos sexuais presente em algumas das espécies de *Leporinus*. O que se tem visto é que quase sempre esses marcadores/sequências acabam claramente dividindo-os em dois grupos: o grupo que apresenta cromossomos sexuais em seu complemento, daquele que não os possuem.

Assim, as espécies do gênero *S. borelli* e *S. isognathus*, que não apresentam cromossomos sexuais heteromórficos, mostraram padrão de marcação bem semelhante entre elas. Assim como estas espécies, as espécies do gênero *Leporinus lacustres*, *L. striatus* e *L. friderici*, que também não possuem cromossomos sexuais heteromórficos, mostraram o mesmo padrão de marcação da sequência Sc-Cot. Diferentemente, as espécies que apresentam cromossomos sexuais, *L. elongatus* e *L. macrocephalus*, não tiveram seus cromossomos marcados após a hibridação com a sonda 7₁ (Sc-Cot). Esses resultados nos levam a concluir que esta sequência, Sc-Cot, é uma sequência característica de espécies que não apresentam cromossomos sexuais, o que nos causou extrema surpresa, uma vez que todas as sequências repetitivas anteriormente estudadas pelo grupo de genética de peixes da UNESP, Rio Claro, eram características do grupo com as espécies que apresentam cromossomos sexuais. Essas sequências já descritas, não eram necessariamente localizadas nesses cromossomos, mas mesmo quando estavam distribuídas em outros cromossomos do complemento, havia uma distinção entre os grupos.

Par entendermos melhor a organização desta interessante sequência e inferir alguma hipótese para o fato dela não estar presente no complemento das espécies com cromossomos sexuais, faz-se necessário estudar esta sequência com detalhes além de aumentar o número de espécies analisadas. Para tal, foram desenhados primers, com base na sequência primeiramente obtida após a clonagem. Estes primers foram desenhados utilizando a ferramenta OligoPerfect™ Designer (<http://tools.invitrogen.com>), porém, devido a problemas com a empresa, os mesmos não foram entregues em tempo hábil para que os resultados fossem incluídos neste trabalho.

6. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos podemos concluir que, apesar da família Anostomidae apresentar uma aparente estabilidade cromossômica, existe uma variedade de sequências específicas entre as espécies, o que torna esta família um grupo muito interessante para estudo genômico. As duas espécies de *Schizodon* analisadas obtiveram o mesmo padrão de distribuição de Sc-COT o que pode levar a idéia de que esta seja uma sequência característica do gênero. Além disso, o estudo foi ampliado para outras espécies da família, todas elas do gênero *Leporinus*, e esta sequência separou as espécies estudadas em dois grupos, estando presentes somente naqueles que não possuem cromossomos sexuais.

Outra informação importante obtida como resultado do presente trabalho foi que a técnica de COT-1 DNA é uma ferramenta muito útil para estudos de DNA repetitivos em peixes, e pode fornecer dados importantes para a caracterização e compreensão da diversidade cariotípica e evolução genômica da família Anostomidae.

7. REFERÊNCIAS

- ALMEIDA-TOLEDO, L. F. & FORESTI, F. Morphologically differentiated sex chromosomes in Neotropical freshwater fish. **Genetica**, v. 111, p. 91–100. 2001.
- ALMEIDA-TOLEDO, L. F., F. FORESTI & S. A. TOLEDO-FILHO. Karyotypic evolution in Neotropical freshwater fish. **Chromosome Today**, 13: 169-182. 2000.
- 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.
- ARTONI, R. F.; VENERE, P. C.; BERTOLLO, L. A. C. A heteromorphic ZZ/ZW sex chromosome system in fish genus *Hypostomus* (Loricariidae). **Cytologia**, v. 63, p. 421- 425. 1998.
- BERTOLLO, L. A. C.; CAVALLARO, Z. I. A highly differentiated ZZ/ZW sex chromosome system in a Characidae fish, *Triporthus guentheri*. **Cytogenetic and Cell Genetics**, v. 60, p. 60- 63. 1992.
- 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.
- CARVALHO, M. L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Description of a ZZ/ZW sex chromosome system in *Thoracocharax cf. stellatus* (Teleostei, Characiformes, Gasteropelecidae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 25, p. 299- 303. 2002.
- CENTOFANTE, L.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. Comparative cytogenetics among sympatric species of *Characidium* (Pisces, Characiformes). Diversity analysis with the description of ZW sex chromosome system and natural triploidy. **Caryologia**, v. 54, p. 253- 260. 2001.
- CENTOFANTE, L.; BERTOLLO, L. A. C.; BUCKUP, P. A.; MOREIRA- FILHO, O. Chromosomal divergence and maintenance of sympatric *Characidium* fish species (Crenuchidae, Characidiinae). **Hereditas**, v. 138, p. 213–218. 2003.
- CHARLESWORTH B.; SNLEGOWSKI, P.; STEPHAN, W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature**, v. 371, p. 215-220. 1994.
- CHAO, L.N.; PETRY, P.; PRANG, G.; SONNESCHIEN, L.; TLUSTY, M. **Conservation and management of ornamental fish resources of the rio Negro basin, Amazonia, Brazil**. Manaus, Editora da Universidade do Amazonas, p. 310. 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.

DEVLIN, R. H. & NAGAHAMA, Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. **Aquaculture**, v. 208, p. 191-364. 2002.

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.

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.

GALETTI JR, P.M.; MARTINS, C. **Contribuição da hibridação in situ para o conhecimento dos cromossomos dos peixes.** In Guerra, M. (Ed) **FISH: Conceitos e Aplicações na Citogenética.** Editora da Sociedade Brasileira de Genética, p. 61-88. 2004.

GARAVELLO, J.C.; BRITSKI, H.A. **Anostomidae (Headstanders).** In R.E. Reis, S.O. Kullander and C.J. Ferraris, Jr. (eds.) **Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America.** Porto Alegre: EDIPUCRS, Brasil. 2003.

GÉRY, J. **Characoids of the world.** THF Publications, Neptune City. 1977.

GREENWOOD, F.C.; LANDON, J. ANDON AND. STAMP, T.C.B.. **The plasma sugar, free fatty acid, cortisol, and growth hormone response to insulin.** I. In control subjects. *J. Clin. Invest.* 1966.

GUERRA, M. Hibridização *in situ*: **Princípios básicos.** In: Guerra, M. (Ed) **FISH: Conceitos e Aplicações na Citogenética.** Editora da Sociedade Brasileira de Genética, p. 1-32. 2004.

HIGGINS, D.G.; SHARP, P.M. CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. **Gene**, v. 73, p. 237-244. 1988.

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.

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.

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.

- LITT, M.; LUTY, J.A. **A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene**. v.44, 397-401, 1989.
- LOWE-McCONNELL, R.H. **Estudos Ecológicos de Comunidades de Peixes Tropicais**. (Trads.: Vazzoler, A.E.A. de M.; Agostinho, A.A.; Cunningham, P.T.M.). São Paulo: EDUSP. p.19-38. 1999.
- 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**. Science Publisher Inc., Enfield. p. 421–453. 2007.
- MARTINS, C.; GALETTI, P. M. JR. Narrow chromosome diversity in fish of the genus *Schizodon* (Characiformes, Anostomidae). **Cytobios** 92: 139–147. 1997.
- NOWAK, R. Mining treasures from “junk DNA”. **Science**, v. 263, p. 608-610. 1994.
- OLIVEIRA, C.; FORESTI, F.; HILSDORF, A. W. S. **Genetics of Neotropical fish: from chromosomes to populations**. Fish Physiology and Biochemistry. v. 35, p. 81–100. 2009.
- 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.
- 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.
- POLETO, 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.
- REIS, R. E., S. O.; KULLANDER & C. J. FERRARIS. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre, Edipucrs, p. 729. 2003.
- RINGUELET, R. A.; ARÁMBURU, R. H.; ARÁMBURU, A. A., **Los Peces Argentinos de Agua Dulce**. Comisión de Investigación Científica. Provincia de Buenos Aires. p. 602, 1967.
- ROSA, R.; BELLAFRONTI, E.; MOREIRA-FILHO, O. & MARGARIDO, V. P. Constitutive heterochromatin, 5S and 18S rDNA genes in *Apareiodon* sp. (Characiformes, Parodontidae) with a ZZ/ZW sex chromosome system. **Genetica**, v. 128, p. 159-166. 2006.
- SAMBROOK, J. & RUSSEL, D. W. **Molecular cloning: A laboratory manual**. (Cold New York: Spring Harbor Laboratory Press, Third Edition. 2001.

SILVA, E.L. **Estudo da organização estrutural de elementos repetitivos isolados do genoma de *Leporinus elongatus* em diferentes espécies da família Anostomidae (Teleostei, Characiformes)**. 2012. 124f. Tese (Doutorado em Biologia) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro. 2012.

SILVA, E. L.; BORBA, R. S.; PARISE-MALTEMPI, P. P. Chromosome mapping of repetitive sequences in Anostomidae species: implications for genomic and sex chromosome evolution. **Molecular Cytogenetics**, v. 5, p. 45. 2012.

SILVA, E. L.; BUSSO, A. F.; PARISE-MALTEMPI, P. P. Characterization and genome organization of a repetitive element associated with the nucleolus organizer region in *Leporinus elongatus* (Anostomidae: Characiformes). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 139, p. 22-28. 2012.

STEINEMANN, S.; STEINEMANN, M. Retroelements: tools for sex chromosome evolution. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 110, p. 134-143. 2005.

TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Research**. v.17, p.6463-6471, 1989.

THE GENOME INTERNATIONAL SEQUENCING CONSORTIUM. Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature** (London), v. 409, p. 860-921. 2001.

TRIFONOV, V. A.; VOROBIEVA, N.N.; RENS, W. **Fish With and Without COT DNA In: Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH)**. Springer Verlag Berlin Heidelberg, p. 99-109. 2009.

TORRES, R. A.; MATOSO, D. A.; ARTONI, R.F. **Genética de peixes neotropicais: biologia molecular de peixes neotropicais**. UEPG Ci. Biol. Saúde, Ponta Grossa, v. 10, p. 27-37. 2004.

VALENTE, G. T.; MAZZUCHELLI, J.; FERREIRA, I. A.; POLETTO, 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. 2010.

VARI, R.P. Higher level phylogenetic concepts within characiforms (Ostariophysi), a historical review. Pp. 111-122. In: Malabarba, L.R., Reis, R.E., Vari, R.P., Lucena, Z.M., Lucena, C.A. (Eds.). **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. Porto Alegre, Edipucrs, p. 603. 1998.

WEBER J.L.; MAY P.E. **Abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerase chain reaction**. *Am. J. Hum. Genet.*, v.44, n.3, p.388-396, 1989.

Aluno(a): Keteryne Rodrigues da Silva

Orientador(a): Patricia Pasquali Parise Maltempi