Universidade de São Paulo
Instituto de Biociências
Departamento de Genética e Biologia Evolutiva

FREDERICO HENNING

**Evolução de cromossomos sexuais no gênero
Eigenmannia (Teleostei: Gymnotiformes)**

São Paulo

2007

Frederico Henning

Evolução de cromossomos sexuais em *Eigenmannia*
virescens (Teleostei: Gymnotiformes)

Dissertação apresentada ao Instituto
de Biociências da Universidade de
São Paulo, para a obtenção de Título
de Mestre em Ciências, na Área de
Genética e Biologia Evolutiva.

Orientadora: Lurdes Foresti de
Almeida Toledo

São Paulo

2007

Ficha Catalográfica

Henning, Frederico
Evolução de cromossomos sexuais no gênero
Eigenmannia (Teleostei: Gymnotiformes)

61p

Dissertação (Mestrado) - Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo.
Departamento de Genética e Biologia Evolutiva

1. cromossomos sexuais recentes 2. DNA
repetitivo 3. Gymnotiformes 4. pintura e
microdissecção cromossômica
I. Universidade de São Paulo. Instituto de
Biociências. Departamento de Genética e Biologia
Evolutiva

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dra. Lurdes Foresti de Almeida Toledo
Orientadora

THOUGH there be no such thing as Chance in the world; our ignorance of the real cause of any event has the same influence on the understanding, and begets a like species of belief or opinion.

David Hume, 1777

AGRADECIMENTOS

Profa Lurdes pela orientação e condições de trabalho, estando sempre interessada em saber das *novidades* e disposta a discutir

FAPESP pelo incentivo a pesquisa

Profs Sergio Matioli, Paulo Otto, Gabriel Marroig, Diogo Meyer, Peter Pearson, Cris Arias, Célia Koiffmann, Ângela Morgante e Yatiyo Yassuda pelas valiosas contribuições

Prof Gorab por permitir o uso de seu laboratório nas microdissecções, e pelas inúmeras dicas e conversas pelos corredores.

Prof Malcolm Ferguson-Smith, Vladimir Trifonov e toda a equipe do FISH lab, Universidade de Cambridge

Colegas membros do LIUSP, Carlos, Vanilda, Rivi, Soraia, Sabrina, Felipe, Karine, Rubens, Papis, Raquel, Marilena, Keila e Carol

Meus pais pelo suporte e por fomentarem meu interesse pela ciência e pela academia.

Meus irmãos Priscila e Germano, e cunhado(a)s Diogo e Livia pelo dia-a-dia na rua aibi 89

Minha noiva Fernanda pelo carinho e companheirismo

RESUMO

Cromossomos sexuais evoluíram repetidas vezes independentemente nos grandes grupos de vertebrados. Sistemas sexuais altamente diferenciados e antigos são caracterizados por grandes diferenças morfológicas e de conteúdo gênico entre os dois cromossomos homólogos onde a recombinação é restrita a uma pequena região homóloga. Os sistemas recentes característicos de peixes caracterizam-se pela similaridade entre os cromossomos X e Y (ou Z e W), nos quais as diferenças observadas freqüentemente envolvem a presença de heterocromatina, translocações e inversões. A recombinação ocorre entre o par sexual na maior parte de sua extensão, sendo inibida apenas na região diretamente relacionada com a determinação sexual. Notavelmente, sistemas diferentes de determinação podem ser encontrados em espécies, ou mesmo populações. O gênero *Eigenmannia* compreende grupos de espécies crípticas do ponto de vista morfológico que exibem variação no número cromossômico e podem apresentar sistemas sexuais XY ou ZW, incluindo sistemas múltiplos (com translocação Y-autossomo). Estes sistemas estão entre os mais recentes descritos (<16ma) e estão dispostos de forma desordenada em árvores de relações filogenéticas, sugerindo origens múltiplas. No presente estudo, a técnicas de pintura cromossômica usando sondas obtidas por microdissecção de cromossomos sexuais foram empregadas para testar a homologia de dois sistemas XY encontrados nos citótipos (ou espécies) *E. virescens* e *E. sp.2*. Os resultados mostram que, de fato, ambos são não homólogos. A fusão Y-autossomo provavelmente ocorreu após a separação de *E. sp.2* com sua espécie irmã, *E. sp.1* uma vez que um evento de fusão independente, envolvendo um dos cromossomos homólogos ao Y, foi detectado em *E. sp.1*. A hibridação *in situ* do cromossomo X de *E. virescens* em sua população mais próxima (também com 38 cromossomos, mas sem cromossomos sexuais heteromórficos) mostrou que o cromossomo X é homólogo a um par de acrocêntricos,

condizente com o modelo proposto de diferenciação por acúmulo de heterocromatina. Essa heterocromatina foi caracterizada e mostrou um padrão complexo de seqüências CG-ricas. Dois fragmentos de DNA repetitivo GC-ricos presentes no cromossomo X foram isolados e seqüenciados. Não foram detectadas similaridades em comparações com bases de dados e entre os fragmentos obtidos. Estes mostraram-se concentrados nas regiões cromomicina-positivas de *E. virescens*, incluindo regiões periteloméricas de sete pares e os dois maiores blocos heterocromáticos (nos cromossomos X e par n. 8), além de um cromossomo acrocêntrico, possivelmente o Y. Curiosamente, essas seqüências foram detectadas em apenas três pares cromossômicos na população mais próxima, incluindo um par acrocêntrico de morfologia semelhante à condição ancestral do X, sugerindo que processos dinâmicos de expansão e homogenização genômica ocorreram após a separação dessas populações.

ABSTRACT

Sex chromosomes have evolved independently several times in all major groups of vertebrates. Highly differentiated sex chromosomes are characterized by extensive differences in morphology and gene content, whereas recombination is restricted to a small homologous region. Recent sex chromosomes are characteristic of fish, and display a high level of homology between X and Y (or Z and W) chromosomes, recombination is restricted only in a small sex determining region. Notably, different sex chromosome systems can be found in closely related groups, such as species or even populations. The genus *Eigenmannia* comprises a group of morphologically cryptic species that display a variety of diploid numbers and different sex chromosome systems, including XY, ZW and a multiple XY system (with a Y-autosome fusion). These systems are among the most recent known (<16ma) and occur with a lack of phylogenetic pattern, whereas frequently populations bearing heteromorphic sex chromosomes are closest related to populations displaying no sex chromosomes. In the present study, chromosome painting using probes derived from the microdissection of two different sex chromosomes were used to investigate the homology of both systems. Results show that, in fact, they are non-homologous and evolved independently. The Y-autosome hypothesis gained further support from the observation that a chromosome homologous to the Y in a close population is involved in yet a different fusion event. The X chromosome present in the *E. virescens* karyotype was found to be homologous to acrocentric chromosomes in all populations analyzed, thus supporting the notion that its differentiation is mainly due to the accumulation of heterochromatin. The X heterochromatic block was shown to form a complex pattern of GC-rich sequences, different from what was previously described. Two GC-rich fragments were isolated and sequenced; both showed no similarities to known sequences and to one another. These sequences were shown to be concentrated

on the two largest heterochromatic blocks, those of the X and n.8 chromosomes besides peri-telomeric regions of seven additional pairs and the putative Y. Curiously, these sequences were detected in only three pairs in the closest population, including an acrocentric pair morphologically similar to undifferentiated sex pair. This suggests that dynamic evolutionary processes of expansion and genomic homogenization have occurred after the separation of these populations.

ÍNDICE

Cap. 1. Introdução: Evolução de mecanismos cromossômicos de determinação sexual	10
1.1 Origem e diferenciação de cromossomos sexuais	11
1.2 Grupo <i>Eigenmannia</i> como modelo	15
1.3 Objetivos e hipóteses	17
 Cap. 2. Análise comparativa de dois sistemas XY no gênero <i>Eigenmannia</i>	 19
<i>Abstract/Resumo</i>	19
2.1. Introdução	20
2.2. Materiais e Métodos	22
2.3. Resultados	27
2.4. Discussão	30
 Cap. 3. Caracterização da heterocromatina constitutiva do cromossomo X em <i>Eigenmannia virescens</i>	 33
<i>Abstract/Resumo</i>	33
3.1. Introdução	35
3.2. Materiais e Métodos	37
3.3. Resultados	41
3.4. Discussão	49
 Cap. 4. Considerações Finais	 51
 Referências Bibliográficas	 54

Introdução

Evolução de mecanismos cromossômicos de determinação sexual

A reprodução sexuada é ubíqua e mesmo grupos reconhecidamente assexuados como bactérias apresentam mecanismos (e.g. conjugação) que garantem eventos esporádicos de recombinação (Barton & Charlesworth 1998). Os mecanismos de determinação sexual são variados e têm se mostrado bastante dinâmicos evolutivamente, provavelmente tendo se originados múltiplas vezes independentemente nos principais grupos (Charlesworth 1991; Vallender & Lahn 2006). Sobretudo nos grupos de vertebrados mais primitivos fica evidente a labilidade evolutiva da determinação sexual, dada a ocorrência de múltiplos diferentes e formas de determinação transitórias (Bull 1980; Eggert 2004; Volff 2005).

Peixes é o grupo mais diverso de vertebrados e é também o que possui maior variedade de mecanismos de determinação sexual (Schartl 2004). A variedade e ausência de padrões filogenéticos torna impossível a definição da forma ancestral de determinação sexual (Mank et al. 2006). A forma mais comum de reprodução sexuada em vertebrados envolve a produção de apenas um tipo de gameta por indivíduo, com a presença de dois sexos separados (gonocorismo), mas mesmo o hermafroditismo, raro nos demais vertebrados, é relativamente freqüente em peixes, tendo sido observado em vinte e cinco famílias (Devlin & Nagahama 2002). O sexo é definido por uma ampla gama de mecanismos de determinação sexual ambientais e/ou genéticos (Devlin & Nagahama 2002). A determinação ambiental pode depender de fatores físicos que definem o sexo já nas primeiras fases do desenvolvimento (como a temperatura ou pH) (Janzen & Phillips 2006) ou mesmo de circunstâncias sociais,

como o estabelecimento de relações de dominância advindas do tamanho, na época de maturação sexual (Francis & Barlow 1993).

A arquitetura genética da determinação sexual pode ser poligênica, ou determinada por genes principais e, tipicamente, envolve uma cascata gênica. Genes cujos produtos atuam no início da cascata, desencadeando o processo de determinação são ditos *upstream*. Existem ainda relatos de determinação mista, a qual é desencadeada pela interação de genes principais com múltiplos genes autossômicos (Devlin & Nagahama 2002). O caso mais bem estudado de determinação sexual genética é o dos mamíferos, onde o gene de determinação principal, *SRY*, atua *upstream* de uma cascata gênica que inclui ainda genes como o *SOX9* e o fator de transcrição *DMRT1*, também relacionados a mecanismos de determinação sexual genéticas e ambientais de répteis, peixes, aves, *Drosophila* e *Caenorhabditis* (Schartl 2004).

Embora conservados em mamíferos, parece haver uma diversidade de genes de determinação em outros grupos que, possivelmente, originaram-se de genes com efeitos *downstream* já implicados na cascata gênica (Mank et al. 2006). As regiões de determinação sexual mapeadas em peixes não apresentam genes comuns, implicando em que esses genes tenham surgido independentemente (Peichel et al. 2004; Matsuda 2005). Exemplos, tanto em répteis como em peixes, de coexistência de mecanismos ambientais e genéticos demonstram que ambos os sistemas são intercambiáveis, e que, de fato, compartilham uma cascata de genes homólogos (Sarre & Quinn 2004). Apesar de haver grande variação nos genes de determinação principais, que desencadeiam a diferenciação sexual, observa-se a conservação de uma cascata gênica *downstream* (Peichel et al. 2004; Ferguson-Smith 2007).

1.1 Origem e diferenciação de cromossomos sexuais

Um tipo particular de determinação sexual genética envolve a presença de cromossomos sexuais nos quais estão localizados os genes de efeitos *upstream* na cascata

gênica de determinação sexual. O grau de especialização dos cromossomos é definido com base no nível de diferenciação morfológica, decorrente da especialização funcional. Tipicamente, um sistema sexual é considerado altamente diferenciado quando é observada uma grande diferença de tamanho, conteúdo gênico e quantidade de seqüências heterocromáticas no par (Charlesworth et al. 2005). Define-se como ZW um sistema no qual a fêmea é heterogamética (possui um cromossomo exclusivo, denominado W) e XY quando o macho é heterogamético. Aves e mamíferos são exemplos de sistemas sexuais ZW e XY altamente diferenciados, respectivamente, e estima-se que o cromossomo Y humano tenha se originado há mais de 200ma (Peichel et al. 2004; Matsuda 2005; Bachtrog 2006). É certo que os sistemas de determinação cromossômicos evoluíram múltiplas vezes nos principais grupos (Charlesworth 1991; Matsubara et al. 2006; Vallender & Lahn 2006) e, inclusive, em grupos de espécies próximas (Phillips et al. 2001; Volff & Schartl 2001; Takehana et al. 2007b)

Cromossomos sexuais recentes são característicos de peixes e anfíbios, e apresentam um grande nível de homologia entre o X e Y (ou W e Z) e diferenciação restrita a pequenas regiões, presumivelmente às regiões ligadas à determinação do sexo (Charlesworth 2004). Nestes grupos há variedade de sistemas ZW, XY e múltiplos com variados graus heteromorfismo, incluindo raros casos de sistemas sexuais altamente diferenciados (Bertollo & Cavallaro 1992), com prevalência de cromossomos sexuais homomórficos (Schartl 2004).

Regiões cromossômicas de determinação sexual de origens recentes (<10ma) descritas nos peixes *Gasterosteus aculeatus* e *Oryzias latipes* apresentam inibição à recombinação, restrita a uma pequena região de determinação sexual. É observado ainda o acúmulo de elementos transponíveis e DNA satélite ao redor do locus de determinação e a divergência de seqüências homólogas entre X e Y (Peichel et al. 2004; Matsuda 2005). Os genes de determinação sexual descritos nestas duas espécies estão ausentes até mesmo em populações e espécies próximas, que podem apresentar sistemas de determinação não-homólogos (Kondo et

al. 2004; Peichel et al. 2004). Cromossomos sexuais podem originar-se devido à invasão de um gene de determinação por transposição, ou pela evolução *in situ* de função determinante. O cromossomo Y de *O. latipes* contém o gene de determinação *DMY/DMRT1Y* (Matsuda et al. 2002; Nanda et al. 2002), uma cópia duplicada de um gene autossômico da família gênica com domínio DM. A função *upstream* de regulação aparentemente evoluiu após a transposição ao Y (Matsuda 2005). O gene envolvido com a determinação sexual em *G. aculeatus*, assim como sua função *upstream*, também é recente (Peichel et al. 2004). Já em Salmonidae, uma região ligada à determinação sexual homóloga está localizada em cromossomos sexuais não homólogos nas diversas espécies estudadas, sugerindo que os cromossomos sexuais se originaram com a transposição de um região determinante conservada (Woram et al. 2003).

A diferenciação morfológica dos cromossomos sexuais a partir de autossomos está relacionada com a diminuição da taxa de recombinação, condição para a fixação de alelos cromossomo-específicos. A recombinação é inibida pela presença de inversões (Dobzhansky & Epling 1948), translocações e possivelmente o acúmulo de heterocromatina (Griffin et al. 2002). Não é claro, no entanto, que a heterocromatinização seja causa ou consequência da inibição de recombinação (Charlesworth et al. 1994). Como consequências da inibição de recombinação, ocorre a ampliação da região não-recombinante e perda de conteúdo gênico no cromossomo sexo-específico (Y ou W) (Charlesworth & Charlesworth 2000). A expansão da região não-recombinante pode ocorrer pelo acúmulo de genes que determinam características *sexualmente antagônicas* (e.g. coloração nupcial) próximo à região de determinação sexual (Endler 1980). O desenvolvimento de um desequilíbrio de ligação entre estes genes e os genes de determinação sexual é esperado, uma vez que características relacionadas à seleção sexual têm efeito positivo no valor adaptativo de apenas um sexo. A ocorrência e o papel desta associação na ampliação da região não-recombinante tem evidência experimental (Rice 1992)

e é apontada como um fator central para explicar a proliferação de neo-cromossomos sexuais (van Doorn & Kirkpatrick 2007).

Em adição aos processos de acúmulo de genes relacionados com o dimorfismo sexual na região de determinação sexual, é esperada a degeneração do cromossomo exclusivo do sexo heterogamético (Y ou W), já que, na ausência de recombinação, estes passam a se comportar essencialmente como linhagens assexuadas. Com a inibição de recombinação, a fixação de mutações levemente deletérias é particularmente acentuada devido ao efeito Hill-Robertson (ou efeito carona) uma vez que a ausência de recombinação minimiza a eficácia de seleção (Charlesworth 1991; Rice & Chippindale 2001).

A recombinação é o único fator que possibilita a produção de haplótipos *selvagens* (com ausência de mutações) em uma população de haplótipos *mutantes* (cada um contendo um número de mutações). Na ausência de recombinação, é esperada a fixação de um número cada vez maior de mutações devido à perda sem reposição da classe de haplótipos com menor número de mutações, em um processo conhecido como a catraca de Muller (Charlesworth 1991). Nota-se ainda que o tamanho efetivo populacional dos cromossomos W e Y é um quarto do tamanho populacional do restante do complemento autossômico (e um terço do X ou Z), tornando-os particularmente sensíveis à deriva genética (Griffin et al. 2002). Especula-se que cromossomos sexuais sejam mantidos por um mecanismo dinâmico de degeneração seguido de translocação (Graves 2006).

O processo de diferenciação de cromossomos sexuais pode (embora artificialmente) ser dividido em três fases: *i) origem de um neo-cromossomo sexual e estabelecimento de barreiras localizadas à recombinação; ii) mudança de conteúdo gênico com ampliação de região não-recombinante e, iii) degeneração do cromossomo Y (ou W)* (Charlesworth et al. 2005). Estudos em cromossomos recentes permitem análise das etapas, *i* e *ii*, particularmente da primeira.

1.2 Grupo *Eigenmannia* como modelo

O gênero *Eigenmannia* faz parte da ordem Gymnotiformes, grupo de morfologia tipicamente serpentiforme e distribuição exclusivamente neotropical (Albert 2001)(**Fig 1.1**). Estimativas a partir de dados moleculares datam a separação dos Gymnotiformes e Siluriformes, seu grupo irmão, em 79-117m.a. (Alves-Gomes 1999). Uma característica notória de Gymnotiformes, e intimamente relacionada aos hábitos noturnos e ambientes de rios, é a emissão contínua de descarga elétrica de baixas voltagens. Estas, apresentam funções de eletro-localização (navegação, defesa e localização de presas) e eletro-comunicação, podendo esta última função, inclusive constituir uma barreira pré-zigótica dada a ocorrência de padrões espécie-específicos (Alves-Gomes 2001).

São descritas oito espécies de *Eigenmannia* com data de separação estimada em 16ma. A diversidade de espécies não pode ainda ser estabelecida devido à necessidade de revisão taxonômica no gênero. As espécies já descritas provavelmente são, na realidade, grupos de espécies crípticas morfologicamente (Albert 2003; Moysés 2005). As populações já descritas citogeneticamente apresentam variedade cariotípica e diversos sistemas sexuais incluindo sistemas XY e ZW (Almeida-Toledo et al. 2002). Nas bacias dos rios Tietê, Paranapanema e Mogi-Guaçu (SP), ocorrem populações com cariótipos que apresentam números cromossômicos entre 28 e 38 com presença ou não de cromossomos sexuais heteromórficos (Almeida Toledo & Foresti 2001). Uma análise filogenética recente destes citótipos revelou um padrão de labilidade dos sistemas de determinação sexual e uma maior conservação do número cariotípico (Moysés 2005), padrão esse já observado em análises de grande escala (Mank & Avise 2006; Mank et al. 2006). Segundo Moysés (2005), os citótipos que possuem sistemas sexuais estão mais proximamente relacionados com citótipos que não apresentam cromossomos sexuais diferenciados. Isto mostra que a diferenciação é recente e levanta hipóteses de origens múltiplas (**Figura 1.2**).

Fig 1.1 O gênero *Eigenmannia* (imagem superior-direita) está amplamente distribuído na região Neotropical, representada no mapa inferior-esquerdo. A área em vermelho corresponde à bacia do Paraná, que contém as sub-bacias dos rios Paranapanema, Tietê e Mogi-Guaçu (ampliado no mapa principal). Pontos no mapa principal indicam locais de coleta dos diferentes citótipos.

Fig 1.2 Árvore de consenso de relações filogenéticas dos citótipos de *Eigenmannia* baseadas em seqüências mitocondriais (modificado de Moysés, 2005). Os diversos sistemas cromossômicos de determinação sexual presentes (em colorido) se originaram por mecanismos incluindo (a) fusão Y-autossomo (Almeida-Toledo et al. 2000) e (b) heterocromatinização do cromossomo X (Almeida-Toledo et al. 2001).

E. virescens e *E. sp.2*, apresentam cromossomos sexuais XX/XY (com X heterocromatinizado) e $X_1X_2X_1X_2/X_1X_2Y$ (com fusão Y-autossomo) respectivamente. O primeiro está distribuído nas bacias do Paranapanema e do Tietê, enquanto *E. sp.2* parece ser exclusivo da bacia do Tietê, que consiste então em uma área de simpatria (Almeida-Toledo et al. 1984; Almeida-Toledo et al. 2001). Há ainda, relatos de populações com cromossomos ZW nas bacias dos rios São Francisco (MG) e Amazônia (AM) (Almeida-Toledo et al. 2002)

1.3. Objetivos e hipóteses

O presente trabalho procura aprofundar o conhecimento dos processos envolvidos na evolução de cromossomos sexuais heteromórficos em *Eigenmannia* através de uma análise comparativa por meio de cross-FISH de dois sistemas XY (Capítulo 2) e de uma caracterização citogenético-molecular de seqüências acumuladas no sistema sexual XY de *E. virescens* (Capítulo 3). As seguintes hipóteses são testadas neste trabalho:

- a) *os sistemas cromossômicos de determinação em Eigenmannia são recentes (conforme definido na Introdução) e evoluíram a partir de cromossomos não-homólogos através de múltiplas origens independentes (capítulo 2).*
- b) *o cromossomo Y de E. sp.2 é resultado de um evento de fusão Y-autossomo (capítulo 2)*
- c) *o processo de diferenciação do cromossomo X envolveu a expansão de um segmento heterocromático composto primariamente por seqüências GC-ricas (Capítulos 3)*

Espera-se que as evidências apresentadas aqui esclareçam estas questões, e gerem uma nova série de hipóteses mais específicas. Busca-se ainda ampliar o repertório metodológico utilizado até o presente em estudos envolvendo Gymnotiformes por meio do desenvolvimento de novos marcadores de utilidade citogenético-molecular que possam ser empregados em estudos futuros, sejam comparativos ou descritivos.

Capítulo 2

Análise comparativa de dois sistemas XY no gênero *Eigenmannia*

RESUMO - *Eigenmannia* compreende um grupo de espécies não resolvidas taxonomicamente com ampla variação cariotípica e diversos sistemas de cromossomos sexuais incluindo XY/XX, X1X2Y/X1X1X2X2, ZZ/ZW assim como possivelmente cromossomos sexuais homomórficos. Para testar a homologia de dois sistemas XY heteromórficos presentes em populações com sobreposição de distribuição, experimentos de cross-FISH recíproco foram conduzidos utilizando sondas obtidas por microdissecção cromossômica específicas para os cromossomos X e Y de *Eigenmannia virescens* e *Eigenmannia* sp.2, respectivamente. Ambas as sondas desenvolvidas hibridaram em cromossomos autossômicos nas hibridações recíprocas entre espécies, mostrando a não-homologia e sugerindo a origem independente dos sistemas XY analisados. Estas mesmas sondas foram hibridadas *in situ* em populações próximas filogeneticamente que não apresentam cromossomos sexuais heteromórficos (2n=28 e 2n=38) e revelaram diversos rearranjos, inclusive uma fusão independente envolvendo cromossomos homólogos ao Y de *E. sp.2* nas outras populações analisadas.

ABSTRACT - The Neotropical genus *Eigenmannia* is a taxonomically unresolved fish group with unknown species diversity where representatives possess a broad range of sex chromosome systems including XY/XX, X1X2Y/X1X1X2X2, ZZ/ZW and, possibly, homomorphic sex chromosomes. To test the homology of two heteromorphic XY sex chromosome systems present in two populations with overlapping distributions, reciprocal cross-species FISH experiments were performed using probes derived by microdissection of X and Y chromosomes present in analyzed specimens of *Eigenmannia virescens* and *Eigenmannia* sp.2, respectively. While FISH with X and Y paint probes hybridized to species-specific sex chromosomes, in reciprocal cross-FISH both probes hybridized exclusively to autosomes. This result shows that both systems are non-homologous and suggests multiple independent origins of the XY systems in these populations. These same probes were hybridized to metaphases of closely related populations which do not present heteromorphic sex chromosomes (2n=28 and 2n=38) and demonstrated the occurrence of yet another independent fusion event involving chromosomes homologous to the Y chromosome of *E. sp.2*.

2.1 Introdução

De uma forma geral, é fato estabelecido que os sistemas cromossômicos de determinação sexual dos grandes grupos tenham tido várias origens evolutivas independentes (Charlesworth 1991; Matsubara et al. 2006; Vallender & Lahn 2006; Kawai et al. 2007). O que traz interesse particular aos estudos em peixes (assim como anfíbios) é o fato de muitas vezes serem encontrados diversos sistemas cromossômicos em grupos proximamente relacionados tais como gêneros ou até mesmo espécies, indicando que os cromossomos sexuais têm origem recente (Volff 2005). Foi demonstrado recentemente que espécies próximas de salmão (Phillips et al. 2001) e medaka (Takehana et al. 2007a) possuem cromossomos sexuais não homólogos. A variedade e falta de padrões filogenéticos da determinação sexual em peixes é tamanha que não é possível sequer determinar a forma de determinação ancestral (Devlin & Nagahama 2002; Mank et al. 2006).

Apenas cerca de 10% das espécies de peixes conhecidas foram analisadas citogeneticamente, e dentre estas cerca de 4% apresentam cromossomos sexuais heteromórficos (Almeida Toledo & Foresti 2001). Estes podem envolver tanto sistemas XY quanto sistemas ZY (além de múltiplos), que podem ocorrer dentro de uma mesma espécie (Volff 2005). Há relatos, inclusive, de uma população de *Xiphophorus maculatus*, na qual os dois sistemas coexistem e as fêmeas podem ser XX ou XW (Volff & Scharl 2001).

Em *Eigenmannia* foram descritos quatro sistemas cromossômicos de determinação sexual envolvendo duas populações que possuem cromossomos sexuais heteromórficos, localizadas nas bacias do rio Tietê e Paranapanema, com áreas de simpatria. Estas populações vêm sendo referidas como *E. virescens* ($2n=38$, XY/XX) and *E. sp.2* ($2n=31$, $X_1X_2Y/32,X_1X_1X_2X_2$) (Almeida Toledo & Foresti 2001). Deve-se notar, no entanto, que o status de espécie ainda não foi formalmente reconhecido.

E. virescens ($2n=38$, XY/XX) possui um cromossomo X acrocêntrico altamente heterocromatinizado e aparentemente rico em seqüências GC-ricas (ver capítulo 3) (Almeida-Toledo et al. 2001). A heterocromatinização é uma característica freqüente de cromossomos sexuais, devido aos efeitos de supressão da recombinação (Charlesworth et al. 1986). O sistema XY múltiplo presente no cariótipo de *E. sp.2* provavelmente originou-se de um evento de fusão Y-autossomo, no entanto, a metodologia utilizada até o momento não permite uma distinção entre eventos uma origem por fusão (com perda de heterocromatina) ou fissão (com acúmulo) (Almeida-Toledo et al. 1988).

As técnicas de pintura cromossômica tipicamente envolvem uso de sondas complexas (geralmente cromossomo-específicas) em experimentos de hibridação *in situ* cruzada (em outras espécies) (Ferguson-Smith et al. 1998). Estas técnicas foram aplicadas em apenas algumas espécies de peixes. Em todos esses estudos, sondas foram obtidas por microdissecção cromossômica e mostraram-se ferramentas úteis para análises moleculares e testes de homologia de cromossomos sexuais ou supranumerários (Reed et al. 1995; Campos-Ramos et al. 2001; Phillips et al. 2001; Harvey et al. 2002; Liu et al. 2002; Yi et al. 2003).

O presente estudo visa testar a hipótese de que os dois sistemas sexuais (XY/XX e $X_1X_2Y/X_1X_1X_2X_2$) encontrados em *E. virescens* e *E. sp.2* tiveram origens independentes e, ainda, testar hipóteses específicas de origem do X (Almeida-Toledo et al. 2001) e Y (Almeida-Toledo et al. 2000) por meio de FISH utilizando sondas teloméricas e comparações com populações filogeneticamente próximas ($2n=38$ e $2n=28$, ver **Fig 1.2**).

2.2 Materiais e Métodos

2.2.1 Origem e preparação de espécimes utilizados.

Preparações de cromossomos mitóticos foram obtidas conforme descrito anteriormente (Almeida-Toledo et al. 2002). Foram utilizadas preparações de espécimes de *E. virescens* (38XY) (dois machos e duas fêmeas) coletados em pequenos córregos do rio Parapanema, no município de São Miguel Arcanjo (23°55'S 47°58'W) (SP). O cromossomo X foi isolado de uma fêmea coletada 1996 em Rio Claro (bacia do Tietê) cuja suspensão foi mantida a -20°C. O cromossomo Y foi obtido de *E. sp.2* (macho) foi coletado em um pequeno córrego do rio Tietê no município de Indaiatuba (23°05'S, 47°13'W) e a mesma preparação foi usada em FISH. Espécimes de *E. virescens* (2n=38) e *E. sp.1* (2n=28) usados em FISH foram coletados em córregos do rio Mogi-Guaçu no município de Araras (22°23'S, 47°25'W).

2.2.2 Obtenção de sondas cromossômicas por microdissecção e DOP-PCR

Quatro cópias do cromossomo Y de *E. sp.2*. e uma cópia do X de *E. virescens* foram isoladas de preparações de cromossomos metafásicos e amplificadas por DOP-PCR usando a metodologia descrita a seguir, baseada em Weimer et al. (1999). Doravante, estas sondas serão referidas como EVX (*E. virescens* X) e E2Y (*E. sp.2* Y). EVX foi obtida a partir de uma suspensão preparada em 1996, e desde então, mantida a -20°C.

Agulhas e pipetas foram preparadas a partir de hastes de borosilicato de 1mm (Harvard Apparatus) e esticadas com um “esticador” de pipetas PB-7 (Narishige). Cromossomos foram isolados de metáfases coradas com Giemsa (preparadas em lâminulas 60x24mm) em um microscópio invertido (Zeiss Axiovert 100 ou 135) utilizando um micromanipulador (Zeiss ou Eppendorf). Pipetas preparadas no *pipettpuller* tiveram as pontas quebradas levemente, de modo a formar uma abertura para a qual foi transferida, por

capilaridade, a seguinte solução: 1.5µg/µl proteinase K, 0.1 % SDS, 0.1% Triton X100, 1mM EDTA, 10mM Tris HCl, pH 8.0, 10mM NaCl. Os cromossomos, isolados por raspagem, foram transferidos sob controle visual para a solução contida na pipeta fixada na platina do microscópio. Pipetas contendo a solução e cromossomos foram incubados a 60°C (em banho úmido) por 1h.

Cromossomos isolados foram transferidos para um microtubo (0,5mL) contendo 5µL de solução de reação da DOP-PCR (Telenius et al. 1992): em 200µM de dNTP's, 5µM de *primer* 6-MW (5' CCGACTCGAGNNNNNNATGTGG 3') e tampão de reação da enzima T7 polimerase (24mM TrisHCl, pH 7.5, 12mM MgCl₂, 30mM NaCl).

Os primeiros oito ciclos (de *baixa especificidade*) foram conduzidos usando a T7 polimerase, (Sequenase v.2, USB) com o seguinte perfil: desnaturação a 92°C por 1min, hibridação a 25°C por 2:20min e extensão a 34°C por 2min. Um ciclo inicial de desnaturação (5min) foi incluído para inativar a proteinase. 0,3U de T7 polimerase foram adicionados a cada ciclo (durante a fase de hibridação).

O volume de reação foi aumentado para 50µL adicionando-se uma solução contendo 0,1U de *Taq* polymerase, 1µM primers, 0,2mM dNTP's, 2,5mM MgCl e 1x tampão de reação (concentração final: 75mM Tris-HCl, 20mM (NH₄)₂SO₄, 0.01% Tween 20) e 33 ciclos (de *alta especificidade*) foram conduzidos com o seguinte perfil: 1min. desnaturação a 92°C, 2min. de hibridação a 56°C e 2min. de extensão a 70°C, seguidos de uma etapa adicional de extensão (5min).

O produto da DOP-PCR foi analisado em gel, para confirmar a presença de um rastro característico (200-500pb) (Telenius et al. 1992) e marcado e hibridado *in situ* no espécime de origem para verificar a qualidade da sonda. Uma descrição detalhada dos protocolos de microdissecção e DOP-PCR utilizados pode ser encontrada nas referencias citadas (Telenius et al. 1992; Guan et al. 1993; Weimer et al. 1999; Henning et al. no prelo).

2.2.3 FISH com sondas obtidas por microdissecção

O produto da reação de DOP-PCR foi marcado, empregando-se 22 ciclos de *alta especificidade* adicionais, idênticos ao descrito na seção anterior, substituindo-se 0,1mM de dTTP por 0,1mM de biotina-16 dUTP (Roche). 2 μ L de sonda marcada (cerca de 50-100ng) foram diluídos em 12 μ L de solução de hibridação (10% sulfan dextrato, 50% formamida e 2xSSC) e desnaturados a 75°C por 10min e pré-hibridadas a 37°C por 20min-1h.

Lâminas preparadas segundo protocolo de Heneagariu et al. (2001) foram *envelhecidas* por 1h a 64°C, tratadas com pepsina (0,005% em 10mM HCl) por 2min à temperatura ambiente e desnaturadas em 70% formamida, 0,66xSSC por 2min a 72°C. As lâminas foram imediatamente desidratadas em série alcoólica (70, 85 e 100%) a -20°C. As lâminas foram cobertas de solução de hibridação, seladas e incubadas *overnight* a 37°C. Após hibridação, as lâminas foram lavadas 2x 5min em uma solução com 50% formamida e 1xSSC, 2x 5min em 2xSSC e 5min vez em 0,2xSSC a 42°C.

A detecção consistiu em uma incubação de 30min a 37°C com avidina-FITC (diluição 1:1000). O excesso de anticorpo foi lavado 3x 5min em 4xSSC, 0,05% tween 20, e as lâminas enxaguadas com água e cobertas com Vectashield® Mounting Medium with DAPI (Vector). As lâminas foram analisadas em um microscópio de fluorescência (Olympus BX60) e as imagens foram capturadas em máquina digital (Olympus BColor 5). Os fluorocromos foram capturados separadamente (utilizando filtros UV específicos) e sobrepostos no software ImagePro Plus® (Media Cybernetics, EU).

2.2.4 FISH com sondas teloméricas

A sonda utilizada para detecção de seqüências teloméricas foi amplificada e marcada por PCR, usando marcação direta (nucleotídeos marcados com fluoresceína) ou indireta (com biotina), na ausência de DNA molde, usando *primers* (TTAGGG)₅ e (CCCTAA)₅ conforme descrito por Ijdo et al. (1991b). Testes indicaram, no entanto, que os produtos desta amplificação eram demasiado grandes (>10Kb) para uso em FISH, e a reação foi levemente modificada para gerar produtos de cerca de 500pb. Esta modificação envolveu a alteração da concentração final de *primers* de 0,1μM para 1μM.

A solução de reação (50μL) consistiu em 50mM KCl, 10mM Tris-HCl (pH 8.3), 1.5mM MgCl₂, 0,2mM dATP, dCTP e dGTP, 0,1dTTP e fluorescein-12-dUTP (*marcação direta*) ou biotina-16-dUTP (*marcação indireta*) (Roche), 1μM de cada *primer* e uma unidade de *Taq* polymerase. O perfil de reação utilizado foi 10 ciclos de 1min a 94°C, 30s a 55°C e 1min a 72°C, seguidos de 30 ciclos de 1min a 94°C, 30s a 60°C, 90s a 72°C, seguido de uma etapa final de 5min a 72°C.

Lâminas foram preparadas conforme mencionado anteriormente (Henegariu et al. 2001), e imediatamente (sem serem envelhecidas), foram cobertas com 100μL de RNase A (100μg/mL em 2xSSC pH 7) e incubadas a 37°C por 1h. Em seguida, foram lavadas com 2xSSC (2x5min) e desidratadas em série alcoólica. Tratamento com pepsina (0,005% em 10mM HCl) foi feito em banho-maria a 37°C por 10min, após o qual, as lâminas foram lavadas (2x5min com PBS), fixadas com formaldeído 1% (em PBS, 50mM MgCl₂) por 15min a temperatura ambiente e lavadas em PBS novamente (2x5min). Lâminas foram desnaturadas por 2min a 65°C (no banho-maria) em uma solução contendo 70% formamida e 0,66xSSC, desidratadas em série alcóolica a -20°C e secas ao ar.

1-2μL (cerca de 50-100ng) de sonda marcada com biotina ou fluoresceína preparada por PCR foi adicionada a uma solução de hibridação de *alta especificidade* contendo 70%

formamida, 10% dextran sulfato e 2xSSC ou a uma solução de *baixa especificidade*, com menor concentração de formamida (50%). Para cada lâmina, 12µL desta solução foram desnaturados por 10min a 75°C e transferidos para a lâmina que foi coberta com lamínula e incubada *overnight* a 37°C. As lâminas foram então lavadas duas vezes (5min cada) em 2xSSC contendo 50% formamida e duas vezes em 2xSSC a 42°C.

Seguindo-se a estas lavagens, as lâminas preparadas utilizando marcação direta foram desidratadas em série alcoólica e secas ao ar. Lâminas marcadas indiretamente foram incubadas a 37°C por 30min em TNB (100mM Tris-HCl (pH 7.5), 150mM NaCl, 0.5% m/v leite desnatado em pó) e em seguida incubadas nas mesmas condições com avidina ou streptavidina conjugada com FITC diluída em uma proporção de 1:1000 (10µg/mL) em TNB. Seguiram-se três lavagens de 5min com 4xSSC contendo 0,005% tween 20 a 42°C, após o que as lâminas foram desidratadas e secas ao ar. Utilizou-se Vectashield® Mounting Medium com DAPI para contra-corar o sinal (FITC). Os fluorocromos foram capturados separadamente (utilizando filtros UV específicos), coloridos e sobrepostos no software ImagePro Plus® (Media Cybernetics, EU).

2.3 Resultados

A hibridação da sonda EVX em preparações de mesmo citótipo, ($2n=38XY$) resultou na marcação de regiões eucromáticas dos cromossomos X e Y (**Fig 2.1a**). Marcações são também observadas nas grandes regiões heterocromáticas do X e de um par autossômico n.8 (segundo Almeida-Toledo et al. 2001). Resultados de FISH, usando E2Y, como sonda (no mesmo espécime de origem), demonstraram a homologia do Y com dois cromossomos acrocêntricos (X_1 e X_2) (**Fig 2.1c**).

Cross-FISH recíproco (hibridação de EVX em *E. sp.2* e E2Y em *E. virescens* resultou em sinais de hibridação localizados em autossomos (**Fig 2.2**). EVX hibridou a dois cromossomos acrocêntricos (**Fig 2.2a**) e E2Y hibridou a um par metacêntrico e um par acrocêntrico (**Fig 2.2b**). Blocos heterocromáticos dos cromossomos 3 e 6 (ou 7) também foram consistentemente reconhecidos pela sonda E2Y (Fig. 2a). Nenhum dos cromossomos sexuais reconhecíveis apresentou sinais de hibridação após cross-FISH. Nos outros dois experimentos de cross-FISH realizados, a sonda EVX hibridou em um de par acrocêntrico pequenos, de machos e fêmeas do citótipo *E. virescens* ($2n=38$) presumivelmente o par n. 14 (Almeida-Toledo et al. 2001) (**Fig 2.3a**). E2Y hibridou em um dos braços de um par metacêntrico e em um par acrocêntrico no citótipo *E. sp.1* ($2n=28$). Marcações são também evidentes em regiões heterocromáticas, particularmente em regiões pericentroméricas.

Não foi possível revelar por FISH possíveis seqüências teloméricas intersticiais em nenhum dos citótipos estudados (**Fig. 2.4**), mesmo utilizando uma solução de hibridação de menor estringência (**Fig 2.4e**). Há suspeita da presença destes sinais no Y em uma metáfase de *E. sp.2* com cromossomos particularmente esticados, mas sua identificação não pode ser confirmada com clareza (**Fig 2.4c**).

Figura 2.1(página seguinte). Resultados de FISH utilizando sondas derivadas de cromossomos sexuais no citótipo de origem. **a)** EVX hibridada em *E. virescens* ($2n=38XX/XY$) e **c)** E2Y hibridada em *E. sp.2* ($2n=31, X_1X_2Y$). Ambos os espécimes utilizados são machos. Os cromossomos sexuais estão indicados nas imagens em preto e branco negativo de DAPI (**b** e **d**). O par n.8 está indicado por um asterisco em **b**.

Figura 2.1. Resultados de FISH no citótipo de origem das sondas (ver legenda na página anterior).

Figura 2.2. Resultados de cross-FISH recíproco (ver legenda na página seguinte).

Figura 2.2 (página anterior). Cross-species de sondas **a)** E2Y em *E. virescens* ($2n=38$, XY) e **c)** EVX em *E. sp.2* ($2n=31$, X_1X_2Y). Ambos os espécimes utilizados são machos. Sinais em regiões eucromáticas estão indicados por setas, e sinais heterocromáticos por asteriscos nas imagens **b** e **d**. Note ausência de sinais de hibridação nos cromossomos sexuais X (**b**) e Y (**d**).

Figura 2.3 Cross-FISH das sondas **a)** EVX em *E. virescens* ($2n=38$) e **c)** E2Y em *E. sp.1* ($2n=28$). Ambos os espécimes utilizados são machos. Cromossomos putativamente homólogos ao X (**a**) e Y (**b**) estão indicados por setas. Regiões heterocromáticas, principalmente pericentroméricas de outros cromossomos apresentaram também marcações.

Fig. 2.4 Resultados de FISH com sondas teloméricas em *E. sp.1* (**a**), *E. virescens* (**b**) e *E. sp.2* (**c-e**). Setas indicam o cromossomo Y. Marcações intersticiais podem ser identificadas em **c**, no entanto a identificação do Y é ambígua. Marcações intersticiais não foram observadas em metáfases exibindo condensação normal (**d**) mesmo em condições de menor especificidade (50% formamida) (**e**). A hibridação em *E. sp.1* foi revelada usando streptavidina-Cy3.

2.4. Discussão

A ausência de sinais de hibridação nos cromossomos sexuais após cross-FISH recíproco indica que os cromossomos sexuais encontrados em *Eigenmannia virescens* e *E. sp.2.* não são homólogos, e sugere uma origem independente dos sistemas de determinação sexual cromossômicos analisados. Esta observação explica a falta de padrão filogenético encontrado por Moysés (2005) para essa característica. A evolução de cromossomos sexuais não-homólogos foi também descrita em espécies de *Oryzias* (Takehana et al. 2007b) e em três generos de salmão (Phillips et al. 2001; Woram et al. 2003) e é, presumivelmente, um padrão geral em peixes (Devlin & Nagahama 2002; Mank et al. 2006; van Doorn & Kirkpatrick 2007).

É importante notar que cromossomos sexuais não-homólogos não implicam necessariamente em regiões de determinação não-homólogas. Isto é explícito na família Salmonidae, onde cromossomos sexuais não-homólogos portam uma mesma região determinante do sexo conservada (Woram et al. 2003). Considerando a labilidade dos genes de determinação, há possibilidade, no entanto, de que a região de determinação sexual tenha origem independente, a exemplo de *Oryzias latipes* (Matsuda 2005) e *Gasterosteus aculeatus* (Peichel et al. 2004).

O cromossomo X de *E. virescens* mostrou-se bastante conservado, ao menos morfológicamente, nos demais citótipos aos quais foi hibridado *in situ*, indicando claramente que seu processo de diferenciação envolveu principalmente a amplificação de seqüências heterocromáticas na região distal (Almeida-Toledo et al. 2001) (capítulo 3). O fato de este cromossomo apresentar uma região heterocromática dificultou seu uso em FISH e cross-FISH. Provavelmente, a sonda obtida por microdissecção está bastante enriquecida de seqüências repetitivas. Um grande número de sinais em regiões heterocromáticas pode ser

visto, particularmente na figura 2.2, onde as sondas foram hibridadas em populações mais próximas, é provável que estas populações próximas compartilhem um grande número de seqüência repetitivas (ver capítulo 3)

Por outro lado, os dados comparativos obtidos hibridando a sonda derivada do cromossomo Y de *E. sp.2* em metáfases de *E. sp.1* ($2n=28$) e *E. virescens* ($2n=38XY$) reforçam a hipótese de origem por translocação Y-autossomo, uma vez que sua unidade como um único cromossomo não foi encontrada em quaisquer dos citótipos testados. Estes padrões revelaram ainda a ocorrência de um segundo evento de fusão envolvendo um cromossomo homólogo ao Y em *E. sp.1* (**Fig 2.3b**) e possivelmente uma inversão já que um dos homólogos em *E. virescens* (**Fig 2.2a**) tem morfologia metacêntrica.

Evidências consistentes de marcações intersticiais não foram encontradas em nenhum experimento com FISH usando sondas teloméricas, o que pode indicar que os eventos de fusão sejam antigos, ou tenham sido submetidos a um processo de evolução bastante dinâmico. Sabe-se que estas seqüências podem degenerar a ponto de serem indetectáveis em FISH em períodos de 4-6ma uma vez que as seqüências teloméricas intersticiais localizadas no cromossomo 2 humano (reliquia de uma fusão específica do gênero *Homo*) só puderam ser mapeadas triando-se uma biblioteca genômica (Ijdo et al. 1991a).

A presença de regiões peri-centroméricas heterocromáticas em todos os cromossomos suspeitos de terem se originado por fusão (em geral, grandes metacêntricos em *E. sp.1* e 2) pode indicar que processos tais como a homogeneização, conversão ou amplificação de seqüências repetitivas (Capítulo 3) tenham tido um papel na rápida eliminação (total ou parcial) de possíveis seqüências teloméricas vestigiais. Ainda, o fato de um dos homólogos do Y em *E. virescens* apresentar morfologia metacêntrica pode, embora seja menos parcimonioso, significar que esta é a forma ancestral. Portanto, a distinção definitiva das

hipóteses de origem por fusão ou fissão dependerá de futuros testes empregando, por exemplo, sondas braço-específicas do Y.

Os dados apresentados aqui mostram que os dois sistemas XY originaram-se independentemente a partir de cromossomos não homólogos e ilustram uma variedade de mecanismos (e.g, heterocromatinização e translocação) envolvidos na diferenciação de neo-cromossomos sexuais em *Eigenmannia*.

Capítulo 3

Caracterização da heterocromatina constitutiva do cromossomo

X em Eigenmannia virescens

RESUMO - A heterocromatina é geralmente composta de repetições de seqüências de DNA satélite. O número de repetições é influenciado pela interação de diversos mecanismos de amplificação, deleção, homogeneização, onde o acúmulo é esperado com a inibição, ou diminuição da freqüência de recombinação. O cromossomo X de *Eigenmannia virescens* provavelmente se diferenciou devido à heterocromatinização recente, a julgar pelas semelhanças cariotípicas em relação a populações próximas nos demais aspectos. Neste estudo, o padrão geral da heterocromatina foi investigado utilizando técnicas citogenéticas convencionais com o intuito de caracterizar a heterocromatina presente em grandes blocos no cromossomo X. Duas seqüências, EVH-A e EVH-B foram isoladas e seqüenciadas, e os elementos repetitivos isolados não mostram similaridade significativa entre si, ou quando comparados em bases de dados e, provavelmente, representam os primeiros elementos repetitivos isolados em Gymnotiformes. As duas seqüências mostraram padrões idênticos quando hibridadas *in situ*, onde marcaram principalmente regiões periteloméricas e os blocos visualizados com bandeamento C. A hibridação *in situ* na população mais próxima revelou que estes estão presentes, embora restritos a três pares de cromossomos. Ainda, um padrão complexo de seqüências repetitivas intercaladas é descrito no cromossomo X que contrasta com as descrições originais, demonstrando variabilidade populacional e a labilidade evolutiva de cromossomos sexuais em *Eigenmannia*.

ABSTRACT - Heterochromatin is generally composed of arrays of satellite DNA sequences and is constantly associated with sex chromosomes. The process of accumulation is probably the result of inhibition, or diminished frequency of recombination, and is influenced by a variety of mechanisms which can lead to amplification, reduction and genomic homogenization of repetitive DNA. The X chromosome present in the karyotype of *Eigenmannia virescens* represents a recent event of heterochromatinization judging from the similarities with the karyotype of a closely related population that does not bear differentiated sex chromosomes. In this study, the overall pattern of heterochromatin was investigated using conventional cytogenetic techniques, and two sequences, EVH-A and EVH-B present in the X chromosome heterochromatin were isolated and sequenced. The repetitive elements isolated show no significant similarity with one another or when compared with sequences available in databases, and therefore are probably the first satellite sequences isolated from Gymnotiformes. *In situ* hybridization of EVH-A and -B showed identical patterns that coincide with the major GC-rich heterochromatic regions mainly in pericentromeric and large C-

banded regions, in a total of 18 chromosomes bearing these sequences. FISH with these probes on the closest known population revealed that the sequences are present, albeit, restricted to three pairs. Moreover, a complex distribution of different classes of repetitive elements are observed in the X chromosome, which contrasts to previous descriptions and demonstrates population-level variability and the lability of sex chromosomes in *Eigenmannia*.

3.1 Introdução

DNA repetitivo está presente em grandes quantidades nos genomas de eucariotos, podendo representar mais de 50% do tamanho total (Taft et al. 2007). Apesar de ser frequentemente tido como não-funcional, tem relações com a expressão gênica, através do estabelecimento de domínios (Shapiro & von Sternberg 2005), e com a arquitetura cromossômica e nuclear (e.g. grau de compactação cromossômica ou o estabelecimento de pontos de ancoragem durante a interfase ou meiose) (Siderakis & Tarsounas 2007). Os DNAs repetitivos podem estar organizados em *tandem* ou dispersos no genoma. Quando em *tandem*, são classificados de acordo com o tamanho da unidade de repetição em microssatélites, minissatélites e satélites. De forma simplificada, o número das repetições é determinado pelo balanço entre a taxa de recombinação e a probabilidade de amplificação (por processos tais como o deslizamento da replicação), onde se espera um maior número de repetições em regiões com restrições à recombinação (Charlesworth et al. 1986; Walsh 1987).

O processo de recombinação desigual (entre cromossomos homólogos ou não) é mais freqüente entre seqüências repetitivas, em virtude das múltiplas interações possíveis, o que leva à homogeneização de seqüências satélites de diferentes regiões genômicas, sobretudo por conversão gênica e evolução em concerto (Charlesworth et al. 1994). Sabe-se, por exemplo, que regiões teloméricas interagem na meiose, onde parecem ser importantes na ancoragem dos cromossomos, podendo levar à recombinação entre cromossomos homólogos ou não-homólogos (Siderakis & Tarsounas 2007). Estes processos de elevada taxa de erro e evolução em concerto fazem com que a evolução do DNA satélite seja bastante dinâmica. De fato, estas seqüências apresentam grande heterogeneidade entre diferentes populações e espécies (Wu et al. 1999; Yamada et al. 2006), podendo apresentar também divergência dentro de um dado

genoma, constituindo sub-populações de alta similaridade localizadas em cromossomos específicos (Oliveira & Wright 1998).

DNA satélite consiste em repetições em *tandem* de grande complexidade (com motivos >100pb) que podem ser visíveis citogeneticamente devido à formação de grandes blocos heterocromáticos que muitas vezes apresentam razão AT/CG distorcida. Frequentemente, estes blocos estão localizados nas regiões com sabidas restrições à recombinação como regiões peri-centroméricas (Oliveira & Wright 1998), ou podem ainda ocorrer associadas ao DNAr 5s (Martins et al. 2006), a regiões peri-teloméricas (Saito et al. 2007) e em cromossomos sexuais e supra-numerários (Reed & Phillips 1995; Mandrioli et al. 2003; Parise-Maltempi et al. 2007).

Eigenmannia virescens (2n=38 XX/XY) ocorre na bacia dos rios Tietê e Paranapanema, e apresenta um cromossomo X heterocromatinizado, altamente enriquecido de seqüências GC-ricas (Almeida-Toledo et al. 2001). A diferenciação do X aparenta ser recente, dado o alto grau de homologia com o Y (Capítulo 2) e a ausência de sistema sexual heteromórfico em sua população mais próxima filogeneticamente (que ocorre na bacia do rio Mogi, SP) e cujo cariótipo é, em outros aspectos, similar (Almeida-Toledo et al. 2001). Estas duas populações ou citótipos serão doravante referidas como *E. virescens* 38XY e 38 respectivamente.

Este trabalho busca uma caracterização das seqüências presentes nas regiões heterocromáticas do cromossomo X de *E. virescens* 38XY.

3.2 Materiais e Métodos

3.2.1 Origem e preparação de espécimes (coleta, preparações mitóticas e manipulação de DNA genômico)

E. virescens 2n=38 (um macho e uma fêmea) e *E. virescens* 2n=38XY (três machos e duas fêmeas) foram coletados em pequenos córregos dos rios Mogi-Guaçu e Parapanema, nos municípios de Araras (22°23'S, 47°25'W) e São Miguel Arcanjo (23°55'S 47°58'W) (SP) respectivamente.

DNA genômico foi extraído de tecidos muscular (nadadeira), sanguíneo, hepático e cardíaco utilizando os kits de extração comerciais DNAeasy (Qiagen) ou Wizard (Promega) seguindo as recomendações dos fabricantes. O DNA extraído foi quantificado em gel de agarose (0,8%) utilizando como referência o marcador Low Mass DNA (Invitrogen), precipitado e re-suspendido em uma solução de 0,5µg/µL.

Suspensões de cromossomos mitóticos foram obtidas de tecido renal segundo descrito previamente (Almeida-Toledo et al. 2002). Lâminas para banda-C, CMA3-DAPI e FISH e lamínulas para microdissecção foram preparadas utilizando o protocolo de Henegariu (2001). Brevemente, as lâminas ou lamínulas foram mantidas em um banho-maria (65°C por cerca de 5s), 40µL de fixador metanol-ácido acético (3:1) e 10µL de suspensão foram aplicadas na superfície úmida. Lâminas foram mantidas no interior do banho (com material citológico voltado para baixo) por 10s e secas rapidamente a 64°C.

3.2.2 Dupla coloração DAPI/CMA3, bandeamento C e FISH

O tratamento simultâneo utilizando os fluorocromos DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindole) e CMA3 (cromomicina A₃) foi usado para visualização de padrão de bandeamento reverso (Schweizer 1976). Lâminas foram incubadas com 100µl de uma solução de CMA3 contendo MgCl₂ (10mM) e 0,12 mg/ml de cromomicina A₃ por cerca de 2 h. Em seguida as lâminas foram cobertas com Mounting Medium with DAPI (Vector Lab.) ou coradas por 10min. em uma solução de 0,2ng/mL DAPI em 2xSSC. Imagens de ambos os fluorocromos foram capturadas separadamente, sobrepostas e coloridas usando o software ImagePro[®] Plus (Media Cybernetics). Imagens de DAPI foram também invertidas e mantidas em preto e branco (PB), de forma que regiões DAPI-positivas aparecem como bandas escuras. Bandas C foram obtidas conforme descrito anteriormente (Almeida-Toledo et al. 2001).

DNAr 18 e 5s clonado de o gênero *Leporinus* (cedidos pelos profs. Cláudio Oliveira e César Martins) foi marcado com biotina-14-dATP utilizando o BioNick[®] Translation Kit (Invitrogen) e hibridado *in situ* em preparações de *E. virescens* 2n=38XY. FISH foi conduzida de acordo com o descrito na seção 2.2.4.

3.2.3 Isolamento de seqüências associadas ao X

10µg de DNA genômico de cada amostra foi digerido *overnight* a 37°C utilizando 30U de enzima de restrição no tampão indicado pelo fabricante em um volume final de 20µL. Foram testadas diversas enzimas, entre elas *Dra I*, *Pst I*, *Hae III*, *Hind III*, *EcoR I* e *Msp I*. O produto de digestão total foi fracionado por 1h30min – 2h em gel de agarose 1% utilizando baixa voltagem (≈3,5V/cm).

A enzima que produziu bandas de interesse (que estivessem particularmente evidentes em espécimes $2n=38XY$ e ausentes em espécimes $2n=38$) foi selecionada para uma segunda digestão (com 80µg de DNA genômico e 240U de enzima) visando à obtenção de maiores quantidades de DNA. O produto da digestão foi fracionado em gel de agarose, em oito poços contendo 20µL de produto, nas mesmas condições de corrida descritas acima. As oito réplicas de cada banda foram extraídas do gel e purificadas utilizando o Purelink[®] Quick Gel Extraction kit (Invitrogen) ou Illustra[®] GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit (GE), seguindo instruções do fabricante para máxima recuperação, incluindo uma eluição final em 30-50µL de TE. Os oito fragmentos de agarose de cada banda foram extraídos juntos (em um mesmo microtubo) uma vez que a somatória de seus pesos não ultrapassou 400mg. O DNA extraído foi precipitado conforme orientações de Ausubel et al. (2003) para máxima recuperação de fragmentos pequenos (250pb) e ressuspendido em 15-20µL de TE.

Após análise e quantificação em gel, o DNA extraído foi diluído para uma solução de 10ng/µL. 200ng de cada banda eluída foi marcada com biotina utilizando o BioNick[®] Translation Kit (em um quinto do volume final recomendado pelo fabricante) e hibridada *in situ* para verificar localização na região heterocromática do X. Com a confirmação da associação com o X por FISH, o DNA isolado foi clonado utilizando o *kit* Blunt-ended PCR Cloning[®] (GE) seguindo as instruções do fabricante (e.g. razão inserto/vetor de 2,5:1). O tamanho do inserto de colônias positivas (de cor branca) foi verificado por gel de agarose do produto de *toothpicking* PCR obtido utilizando o par de *primers* m-13. A reação utilizada consistiu em 29 ciclos de desnaturação a 94°C por 30s, hibridação a 51°C por 45s e extensão a 72°C por 1min com um ciclo inicial de desnaturação (4min a 94°C) e um final de extensão (10min a 72°C). A solução utilizada consistiu em 0,1U de *Taq* polymerase, 0,4µM *primers*, 0,2mM dNTP's, 1,5mM MgCl e 1x tampão de reação, concentração final: 75mM Tris-HCl, 20mM (NH₄)₂SO₄, em volume final de 25µL. O DNA foi amplificado diretamente, através da

transferência de uma pequena quantidade das colônias selecionadas (obtido encostando-se uma ponteira de 10µL ou palito-de-dentes) à solução de PCR. Produtos obtidos foram analisados em gel e, caso apresentassem tamanho esperado (tamanho do fragmento clonado mais cerca de 150pb correspondentes a seqüências que flanqueiam o sítio de inserção do vetor), foram re-amplificados na presença de 0,1mM biotin-16-dUTP para serem hibridados *in situ* (de acordo com o descrito na seção 2.2.4).

As colônias cujos insertos produziram resultados de FISH semelhantes aos obtidos usando o DNA eluído do gel como sonda (marcada por *nick translation*) foram crescidas em meio líquido seletivo LB. Plasmídios foram extraídos utilizando o Wizard[®] Miniprep Kit (Promega), amplificados e marcados para seqüenciamento em duas reações (com *primers* m13-*forward* e *reverse* separadamente) com o kit Big Dye[®] Terminator v.3.3. Produtos da *toothpicking* PCR (amplificados e usados em FISH anteriormente) foram também seqüenciados para excluir a possibilidade de seqüenciamento de um possível contaminante ou de que uma colônia diferente houvesse sido equivocadamente crescida em LB líquido.

O DNA foi seqüenciado no Instituto de Química da Universidade de São Paulo, SP. Seqüências obtidas foram editadas (para excluir porção de origem vetorial) e as duas seqüências complementares de cada amostra foram alinhadas criando-se uma seqüência consenso. A homologia das seqüências consenso com demais seqüências na base de dados GenBank foi feita utilizando a ferramenta BLASTn. Análises de conteúdo de bases, sítios de restrição, dot plot e semelhança entre as seqüências obtidas foram conduzidas usando o software BioEdit v.7.0.9.0 (Hall 1999).

A ocorrência e localização das seqüências obtidas no citótipo 2n=38 foi investigada por FISH (de acordo com seção 2.2.4)

3.3 Resultados

O padrão de heterocromatina nos citótipos de $2n=38$ e $2n=38XY$ foi investigado através da técnica de bandeamento C. Os padrões obtidos revelam que blocos heterocromáticos estão presentes em todas as regiões pericentroméricas e/ou periteloméricas em ambos os citótipos e estão particularmente concentradas na região distal do cromossomo X e de um par autossômico (n.8) no citótipo 38XY (**Fig 3.1**). O par 8 do citótipo 38 apresenta também uma concentração de heterocromatina, embora menos acentuada, na região distal.

O uso dos fluorocromos DAPI e cromomicina A3 demonstrou a predominância de seqüências AT-ricas nos blocos heterocromáticos pericentroméricos. Regiões organizadoras de nucléolo (RON's) do par 15, regiões periteloméricas e os blocos presentes no par 8 mostraram-se ricos em seqüências GC. (**Fig 3.2**). A região heterocromática do cromossomo X apresentou um padrão complexo de bandas DAPI e CA3, onde pelo menos três bandas intercaladas de seqüências AT e GC-ricas são evidentes.

Tendo em vista que as RONS e o bloco do X apresentam um padrão GC-rico, FISH com DNAr 18 e 5s foi realizado para testar a concentração de seqüências ribossomais no X. O padrão obtido em FISH mostra que não há evidências da concentração destas seqüências na região heterocromática do X. Foram observados, porém, sinais de DNAr 5s na região pericentromérica.

Fig. 3.1 (página seguinte) Padrão de heterocromatina obtido por bandeamento C em *E. virescens* $2n=38$ (**a**) e *E. virescens* $2n=38XY$ (**b**). Blocos heterocromáticos estão localizados em regiões peri-centroméricas e/ou teloméricas em todos os cromossomos, e particularmente concentrados nos cromossomos X e no 8 em **b**. O cromossomo 8 do citótipo 38 também apresenta uma concentração de heterocromatina (menos evidente) na região peritelomérica (**a**).

Fig. 3.1 Padrão de heterocromatina obtido por bandejamento C em (a) *E. virescens* 2n=38 e (b) *E. virescens* 2n=38XY. Ver legenda na página anterior

Fig. 3.2 Caracterização de regiões ricas em AT e CG através do uso dos fluocromos cromomicina A3 e DAPI (a) Regiões cromomicina-positivas estão concentradas em regiões pericentroméricas de diversos cromossomos, nos cromossomos portadores de NORs e nos cromossomos X e 8. (b) Padrões obtidos com DAPI em geral são reversos aos obtidos com cromomicina A3 e mostram um padrão bastante complexo de seqüências AT-ricas (DAPI positivas) e GC-ricas (negativas) no cromossomo X

Fig. 3.3 FISH utilizando sondas de DNAr 18s (a) e 5s (b). A primeira mostrou-se restrita às NOR's (par 15) enquanto que a segunda foi detectada em regiões pericentroméricas de diversos cromossomos, incluindo o X.

A digestão de DNA genômico com as enzimas de restrição *DraI*, *HaeIII*, *HindIII*, *EcoRI* e *MspI* gerou uma série de bandas de DNA repetitivo, visíveis na **figura 3.4a**. Não foram encontradas diferenças conclusivas do padrão de digestão entre machos e fêmeas. A aparente diferença no padrão observada com uso de algumas enzimas (*DraI*, *HaeIII* e *EcoRI*) provavelmente se deve a diferenças de quantidade de DNA genômico utilizadas.

As bandas geradas pela digestão com *HaeIII* foram de particular interesse, uma vez que já foi demonstrada a digestão *in situ* do bloco heterocromático do X com essa enzima (Almeida-Toledo et al. 2001). Foi verificado que a digestão com esta enzima gerou duas bandas de aproximadamente 350 e 250pb em *E. virescens* 38XY, e que ambas estão ausentes do padrão obtido digerindo-se DNA genômico de *E. virescens* 38 conforme observado na **figura 3.4b**.

Ambas as bandas resultantes da digestão com *HaeIII* foram purificadas do gel, sendo recuperado cerca de 1µg (de um total de 80µg de DNA digeridos). O DNA purificado foi hibridado *in situ*, e verificou-se que ambas as sondas mostraram padrão idêntico, com localização no cromossomo X, par n. 8 assim como algumas regiões peri-teloméricas (**fig 3.5**).

Fig. 3.4 A digestão com de DNA genômico total com enzimas de restrição produziu diversas bandas de DNA repetitivo, indicadas por setas em **a**. Digestão com *HaeIII* produziu duas bandas nítidas de ≈ 350 e ≈ 250 pb que se mostraram ausentes no citótipo *E. virescens* 38

Fig. 3.5 As bandas de DNA repetitivo a e b isoladas (mostradas no canto inferior-direito da imagem) hibridadas *in situ*. Notou-se um padrão idêntico de localização no cromossomo X e par n.8, além de sinais mais fracos em algumas regiões periteloméricas.

A clonagem da banda de $\approx 350\text{pb}$ resultou em cerca de 20 colônias positivas (brancas) as quais foram triadas por PCR. Foram gerados diversos fragmentos com tamanhos entre 250pb e 1000pb (**Fig 3.6a**). Oito colônias contendo fragmentos maiores que 500pb (tamanho esperado) foram selecionadas para FISH. A clonagem da banda de $\approx 250\text{pb}$ produziu >50 colônias, na maioria positivas (brancas). 20 colônias foram triadas por PCR, gerando 19 fragmentos de tamanho semelhante ao esperado ($\approx 400\text{pb}$) (**Fig 3.6b**), oito destas foram triadas por FISH. As diferenças na eficiência da clonagem das duas bandas parecem ser devidas à pureza do DNA utilizado na ligação.

Fig. 3.6. Fragmentos gerados por PCR (direta da colônia) das bandas de (a) $\approx 370\text{pb}$ e; (b) $\approx 250\text{pb}$. Colônias contendo insertos de tamanho $\geq$ ao esperado estão indicadas em vermelho.

FISH dos produtos selecionados (em vermelho na **fig 3.6**) revelou quatro colônias positivas (a3, b5, b8 e b11) que mostraram um padrão de hibridação *in situ* semelhante ao esperado (**Fig 3.7**). Podem ser observadas marcações em 18 pares, incluindo o cromossomo X (e presumivelmente, o Y). A região heterocromática do X mostra-se composta de três blocos GC-ricos, provavelmente intercalados com outras seqüências heterocromáticas (tendo em vista os resultados de banda C) conforme visto anteriormente.

Fig. 3.7 Resultados de FISH com colônias positivas **(a,b)** a3 e **(c,d)** b8 mostram-se idênticos. Sinais são evidentes em 18 cromossomos, sobretudo em regiões periteloméricas. Figuras da direita **(b e d)** representam a mesma metáfase visualizada em preto e branco invertido, onde sinais de hibridação aparecem em preto. A intensidade do sinal mostra um grande acúmulo destas seqüências no par 8 e cromossomo X. O bloco heterocromático do X parece conter três blocos desta seqüência intercalados.

A seqüência obtida da colônia a3 (EVH-A) está disposta na **figura 3.8**, e como as seqüências obtidas de b5 e b8 são foram idênticas, apenas uma é exibida (EVH-B). EVH-A apresenta 335pb e uma razão GC de 58,04%. EVH-B tem um tamanho de 278pb e conteúdo GC de 56,83%. Nenhuma das seqüências apresentou similaridade significativa no BLAST ou RepeatMasker. O índice de identidade das duas seqüências é de apenas 25%.

A hibridação *in situ* no citótipo *E. virescens* 38 mostrou que estas sequências estão presentes em pelo menos três pares de cromossomos, o que provavelmente envolve o par homólogo ao par n.8. Polimorfismos do tamanho dos sítios podem ser observados (**Fig 3.9**). Na imagem ampliada, podem ser vistos, pelo menos quatro diferentes sítios no par n.8.

A hibridação *in situ* no citótipo *E. virescens* 38 mostrou que estas seqüências estão presentes em pelo menos três pares de cromossomos, o que provavelmente envolve o par homólogo ao par n.8. Polimorfismos do tamanho dos sítios podem ser observados (**Fig 3.9**). Na imagem ampliada, podem ser vistos, pelo menos quatro diferentes sítios no par n.8.

Fig. 3.8 Hibridação das seqüências clonadas em *E. virescens* ($2n=38$). Sítios são observados em três pares (indicados por setas) em **a**. Estes pares são ampliados em **b**.

3.4 Discussão

A caracterização das regiões heterocromáticas de *E. virescens* 38XY revelou que uma grande quantidade de DNA repetitivo nos cromossomos do par n.8 e no X. Essas seqüências não apresentam homologias significativas com nenhuma das seqüências depositadas no GenBank, possivelmente por serem variáveis e, provavelmente, por serem os primeiros elementos repetitivos descritos em Gymnotiformes. A princípio isto parece indicar que as seqüências isoladas são DNA satélite, uma vez que motivos de repetição não foram encontrados dentro das seqüências e que a presença de transposons provavelmente seria acusada na comparação com a base de dados.

A organização genômica destas seqüências ainda não foi investigada, no entanto o fato de que ambas as seqüências co-localizam em FISH e não apresentarem identidade significa que ambas não são membros de uma família de repetições e sugere que são partes de uma unidade maior de repetição. A identificação de sítios de restrição exclusivos de cada seqüência (sublinhados na figura 3.9) poderá ajudar a distinguir estas hipóteses, uma vez que o padrão esperado usando EVH-A e B como sondas em Southern blotting é o mesmo (na ausência de sítios externos). Os elementos repetitivos isolados aqui poderão representar marcadores valiosos para estudos citogenéticos e moleculares em *Eigenmannia*, dado o padrão altamente variável e localização preferencialmente telomérica. As seqüências GC-ricas obtidas mostraram-se bastante amplificadas e espalhadas (pelo menos em 9 pares cromossômicos) e mesmo considerando uma taxa de recuperação de DNA do gel menor que 90%, nota-se que juntas, as bandas purificadas representam $\approx 2\%$ do genoma de *E. virescens* 38XY. Uma vez que peixes provavelmente possuam uma quantidade relativamente pequena de seqüências repetitivas (Taft et al. 2007), é provável que estas seqüências representem grande parte do DNA repetitivo em *E. virescens* 38XY.

O acúmulo de seqüências repetitivas em cromossomos sexuais é bastante freqüente (Almeida-Toledo et al. 2001; Devlin & Nagahama 2002). Isto é esperado, dada a ausência de recombinação. No entanto, a amplificação de DNA repetitivo no cromossomo X (ou Z) é menos freqüente do que no Y já que este sofre recombinação quando em fêmeas (Charlesworth 1991). Seqüências satélite isoladas em outros grupos de peixes mostram que famílias de DNA satélite podem ocorrer, inclusive mostrando padrões cromossomo-específicos (Reed & Phillips 1995; Martins et al. 2006; Parise-Maltempi et al. 2007). A heterocromatinização do X em *E. virescens* pode ser compreendida como uma consequência bastante recente da inibição de *crossing-over*. O fato de estas regiões heterocromáticas estarem menos pronunciadas e presentes em três pares cromossômicos, possivelmente incluindo homólogos dos pares n.8 e XY, na população mais próxima (*E. virescens* 38) sugere uma rápida evolução possivelmente, por mecanismos de amplificação e homogenização genômica (Charlesworth et al. 1994).

Os padrões de conteúdos de bases das regiões heterocromáticas do cromossomo X obtidos aqui revelaram um padrão complexo de seqüências GC-ricas, aparentemente formando blocos intercalados com outras seqüências heterocromáticas. Possivelmente tal padrão pode ser causado pela ocorrência de inversões; no entanto, os processos evolutivos que atuam em seqüências satélite são diversos (Charlesworth et al. 1994). Notavelmente, esse padrão, com múltiplos sítios intercalados, mostra-se diferente do encontrado na descrição original deste citótipo, na qual o bloco heterocromático do cromossomo X mostrou uma composição homogênea de seqüências GC-ricas (Almeida-Toledo et al. 2001). Isto sugere a ocorrência de variação populacional (possivelmente de inversões) e reforça a impressão de que cromossomos sexuais são caracteres de grande labilidade evolutiva (Charlesworth 1991; Mank et al. 2006).

Capítulo 4

Considerações Finais

Os padrões obtidos aqui através de análises comparativas mostram que os cromossomos sexuais de dois sistemas de determinação XY do gênero *Eigenmannia* não são homólogos, e logo tiveram origens independentes. A labilidade da determinação sexual é característica em peixes (Devlin & Nagahama 2002; Mank et al. 2006) e cromossomos sexuais não-homólogos já foram descritos recentemente em diversos gêneros desse grupo (Phillips et al. 2001; Woram et al. 2003; Peichel et al. 2004; Takehana et al. 2007b). Tendo em vista que as espécies descritas de *Eigenmannia* provavelmente se originaram há cerca de 16ma (Alves-Gomes 1999), os sistemas sexuais estudados aqui se colocam entre os mais recentes relatados (Kondo et al. 2004; Peichel et al. 2004).

A verificação da existência de homologia dos sistemas XY analisados aqui com o sistema ZW da população *Eigenmannia* sp. ($2n=38ZW$) é recomendável, uma vez que esta população é mais próxima filogeneticamente ao citótipo *E. virescens* $2n=38$ do que a população *E. sp.2* (indicada em laranja na **fig 1.2**). Já foi demonstrado em *Oryzias* que um par de cromossomos homólogos está relacionado com determinação XY e ZW em espécies próximas (Campos-Ramos et al. 2001). Portanto, o fato de os sistemas sexuais, aqui analisados, mostrarem-se não-homólogos não pode ser extrapolado ao sistema ZW.

As seqüências satélite isoladas apresentam-se bastante amplificadas no citótipo *E. virescens* (38XY), representando cerca de 2% do genoma total e não apresentaram

similaridades significativas no GenBank ou na ferramenta de identificação de repetições *online* RepeatMasker (www.repeatmasker.org), o que pode ser fruto da pequena quantidade de seqüências repetitivas de peixes depositadas nestas bases. Ambas as seqüências produziram padrões de hibridação *in situ* idênticos. Os sítios foram localizados nas regiões pericentroméricas de 18 cromossomos e particularmente acumulados no cromossomo X e no par n.8.

A co-localização em FISH e ausência de similaridade entre as duas seqüências isoladas pode significar que ambas são parte de uma unidade de repetição maior, disposta ou não em *tandem*, e estas hipóteses são testáveis com uso de, por exemplo, Southern blotting. Infelizmente, o pequeno número de seqüências isoladas não permitiu a detecção famílias desta repetição como descrito em outros estudos em peixes (Reed & Phillips 1995, Wu et. al 1999, Parise-Maltempi et. al 2007)

Possivelmente, as seqüências EVH já estavam presentes nos cromossomos sexuais indiferenciados (par n. 14) e acumularam-se no cromossomo X após a separação dos dois citótipos comparados, presumivelmente após o estabelecimento de inibições à recombinação. A hibridação das sondas do DNA repetitivo isolado (EVH) em cromossomos de *E. virescens* ($2n=38$), morfologicamente similares ao par sexual e ao par n.8 de *E. virescens* ($2n=38XY$), parece sustentar essa hipótese, que poderá ser investigada diretamente com a co-localização das sondas EVH e com a sonda específica do X (EVX) em *E. virescens* ($2n=38$).

Sabe-se que bandas resultantes de digestão de DNA genômico de *E. virescens* 38XY com *AluI* hibridam *in situ* nas regiões pericentroméricas, mas estas não foram clonadas e caracterizadas. (Moysés, comunicação pessoal). A ausência de sítios de restrição *HindIII* e *DraI* nas seqüências obtidas (**fig 3.8**) sugere que as bandas geradas por digestão de DNA genômico com estas enzimas (**fig 3.4**) correspondam a seqüências diferentes das analisadas aqui.

As diferenças no tamanho da região heterocromática dos cromossomos X e Y curiosamente contrariam as expectativas teóricas (Charlesworth 1991). Este padrão pode, a princípio, ser explicado por fatores fortuitos, como uma grande variância no número de cópias em decorrência de inibição de recombinação recente. Nesse caso gerações de recombinação levariam à diminuição e a uma estabilização no número de cópias no X (Charlesworth et al. 1994). De fato, a ocorrência de polimorfismos intra e inter-populacionais nos sítios EVH, mostra que expansões podem ocorrer relativamente rápido. Ao mesmo tempo, tais diferenças podem ser mantidas por mecanismos de seleção. Não é difícil imaginar que efeitos como o silenciamento gênico em virtude de uma localização adjacente à heterocromatina, incluindo regiões periteloméricas (Hennig 1999) possa atuar como uma pressão seletiva principalmente tendo em vista que genes relacionados à determinação sexual estão frequentemente localizados adjacentes à regiões heterocromáticas.

Conclusões

De uma forma geral, a metodologia empregada aqui foi adequada para o teste das hipóteses colocadas na seção 1.3. Os dados obtidos revelaram que de fato, os diferentes cromossomos XY não são homólogos e deram suporte aos mecanismos (translocação Y-autossomo e heterocromatinização) previamente propostos para explicar a diferenciação de cada um dos sistemas analisados (Almeida-Toledo et al. 1984; Almeida-Toledo et al. 2001). Tendo em vista os problemas de identificação com base em morfologias cromossômicas e a ausência de padrões claros de bandeamento G em peixes, o emprego de técnicas de pintura é recomendável, uma vez que estas técnicas propiciam a definição não-ambígua de homologias. O fragmento de DNA satélite isolado poderá ainda ser utilizado como marcador citogenético em análises de variação populacional no gênero *Eigenmannia* e caracterizado em mais detalhes em estudos futuros.

Referências Bibliográficas

- Albert JS (2001) *Species diversity and phylogenetic systematics of American knifefishes (Gymnotiformes, Teleostei)*, Division of Ichthyology, Museum of Zoology, Univ. of Michigan
- ____ (2003). Family Sternopygidae. *Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America*. Porto Alegre, Edipucrs: 493-97.
- Almeida-Toledo LF, Daniel-Silva MF, Moyses CB, Fonteles SB, Lopes CE, Akama A and Foresti F (2002) Chromosome evolution in fish: sex chromosome variability in *Eigenmannia virescens* (Gymnotiformes: Sternopygidae) *Cytogenetic and Genome Research* 99(1-4): 164-9.
- Almeida-Toledo LF, Foresti F, Daniel MF and Toledo-Filho SA (2000) Sex chromosome evolution in fish: the formation of the neo-Y chromosome in *Eigenmannia* (Gymnotiformes) *Chromosoma* 109(3): 197-200.
- Almeida-Toledo LF, Foresti F, Pequignot EV and Daniel-Silva MF (2001) XX:XY sex chromosome system with X heterochromatinization: an early stage of sex chromosome differentiation in the Neotropic electric eel *Eigenmannia virescens* *Cytogenetics and Cell Genetics* 95(1-2): 73-8.
- Almeida-Toledo LF, Foresti H and Toledo Filho SA (1984) Complex sex chromosome system in *Eigenamannia* sp. (Pisces, Gymnotiformes) *Genetica* 64: 165-69.
- Almeida-Toledo LF, Viegas-Pequignot E, Foresti F, Toledo Filho SA and Dutrillaux B (1988) BrdU replication patterns demonstrating chromosome homoeologies in two fish species, genus *Eigenmannia* *Cytogenetics and Cell Genetics* 48(2): 117-20.

- Almeida Toledo LF and Foresti F (2001) Morphologically differentiated sex chromosomes in Neotropical freshwater fish *Genetica* 111(1-3): 91-100.
- Alves-Gomes JA (1999) Systematic biology of gymnotiform and mormyriiform electric fishes: phylogenetic relationships, molecular clocks and rates of evolution in the mitochondrial rRNA genes *Journal of Experimental Biology* 202(10): 1167-83.
- ____ (2001) The evolution of electroreception and bioelectrogenesis in teleost fish: a phylogenetic perspective *Journal of Fish Biology* 58(6): 1489-511.
- Ausubel FM, Roger Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JD, Smith JA and Struhl K (2003) *Current protocols in molecular biology*. New York, NY, John Wiley and Sons Inc.
- Bachtrog D (2006) A dynamic view of sex chromosome evolution *Current Opinion in Genetics and Development* 16(6): 578-85.
- Barton NH and Charlesworth B (1998) Why sex and recombination? *Science* 281(5385): 1986-90.
- Bertollo LA and Cavallaro ZI (1992) A highly differentiated ZZ/ZW sex chromosome system in a Characidae fish, *Triportheus guentheri* *Cytogenetics and Cell Genetics* 60(1): 60-3.
- Bull JJ (1980) Sex Determination in Reptiles *The Quarterly Review of Biology* 55(1): 3-21.
- Campos-Ramos R, Harvey SC, Masabanda JS, Carrasco LA, Griffin DK, McAndrew BJ, Bromage NR and Penman DJ (2001) Identification of putative sex chromosomes in the blue tilapia, *Oreochromis aureus*, through synaptonemal complex and FISH analysis *Genetica* 111(1-3): 143-53.
- Charlesworth B (1991) The evolution of sex chromosomes *Science* 251(4997): 1030-3.
- ____ (2004) Sex determination: primitive Y chromosomes in fish *Current Biology* 14(18): R745-7.

- Charlesworth B and Charlesworth D (2000) The degeneration of Y chromosomes *Philosophical Transactions of the Royal Society of London: B Biological Sciences* 355(1403): 1563-72.
- Charlesworth B, Langley CH and Stephan W (1986) The evolution of restricted recombination and the accumulation of repeated DNA sequences *Genetics* 112(4): 947-62.
- Charlesworth B, Sniegowski P and Stephan W (1994) The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes *Nature* 371(6494): 215-20.
- Charlesworth D, Charlesworth B and Marais G (2005) Steps in the evolution of heteromorphic sex chromosomes *Heredity* 95(2): 118-28.
- Devlin RH and Nagahama Y (2002) Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences *Aquaculture* 208: 191-364.
- Dobzhansky T and Epling C (1948) The suppression of crossing over in inversion heterozygotes of *Drosophila pseudoobscura* *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 34(4): 137-41.
- Eggert C (2004) Sex determination: the amphibian models *Reprod Nutr Dev* 44(6): 539-49.
- Endler JA (1980) Natural Selection on color patterns in *Poecilia reticulata* *Evolution* 34(1): 76-91.
- Ferguson-Smith M (2007) The Evolution of Sex Chromosomes and Sex Determination in Vertebrates and the Key Role of DMRT1 *Sexual Development* 1(1): 2-11.
- Ferguson-Smith MA, Yang F and O'Brien PC (1998) Comparative mapping using chromosome sorting and painting *Ilar Journal* 39(2-3): 68-76.
- Francis RC and Barlow GW (1993) Social control of primary sex differentiation in the Midas Cichlid *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90(22): 10673-75.

- Graves JAM (2006) Sex Chromosome Specialization and Degeneration in Mammals *Cell* 124(5): 901-14.
- Griffin DK, Harvey SC, Campos-Ramos R, Ayling LJ, Bromage NR, Masabanda JS and Penman DJ (2002) Early origins of the X and Y chromosomes: lessons from tilapia *Cytogenetic and Genome Research* 99(1-4): 157-63.
- Guan XY, Trent JM and Meltzer PS (1993) Generation of band-specific painting probes from a single microdissected chromosome *Human Molecular Genetics* 2(8): 1117-21.
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT *Nucleic Acids Symp Ser* 41: 95-98.
- Harvey SC, Masabanda J, Carrasco LA, Bromage NR, Penman DJ and Griffin DK (2002) Molecular-cytogenetic analysis reveals sequence differences between the sex chromosomes of *Oreochromis niloticus*: evidence for an early stage of sex-chromosome differentiation *Cytogenetic and Genome Research* 97(1-2): 76-80.
- Henegariu O, Heerema NA, Lowe Wright L, Bray-Ward P, Ward DC and Vance GH (2001) Improvements in cytogenetic slide preparation: controlled chromosome spreading, chemical aging and gradual denaturing *Cytometry* 43(2): 101-9.
- Hennig W (1999) Heterochromatin *Chromosoma* 108(1): 1-9.
- Henning F, Trifonov VA and Almeida Toledo LF (no prelo) Use of chromosome microdissection in fish molecular cytogenetics *Genetics and Molecular Biology*.
- Ijdo JW, Baldini A, Ward DC, Reeders ST and Wells RA (1991a) Origin of Human Chromosome 2: An Ancestral Telomere-Telomere Fusion *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88(20): 9051-55.
- Ijdo JW, Wells RA, Baldini A and Reeders ST (1991b) Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)_n generated by PCR *Nucleic Acids Research* 19(17): 4780.
- Janzen FJ and Phillips PC (2006) Exploring the evolution of environmental sex determination, especially in reptiles *Journal of Evolutionary Biology* 19(6): 1775-84.

- Kawai A, Nishida-Umehara C, Ishijima J, Tsuda Y, Ota H and Matsuda Y (2007) Different origins of bird and reptile sex chromosomes inferred from comparative mapping of chicken Z-linked genes *Cytogenetic and Genome Research* 117(1-4): 92-102.
- Kondo M, Nanda I, Hornung U, Schmid M and Scharl M (2004) Evolutionary Origin of the Medaka Y Chromosome *Current Biology* 14(18): 1664-69.
- Liu JD, Yi MS, Zhao G, Zhou F, Wang DQ and Yu QX (2002) Sex chromosomes in the spiny eel (*Mastacembelus aculeatus*) revealed by mitotic and meiotic analysis *Cytogenetic and Genome Research* 98(4): 291-7.
- Mandrioli M, Carlo Manicardi G and Marec F (2003) Cytogenetic and molecular characterization of the MBSAT1 satellite DNA in holokinetic chromosomes of the cabbage moth, *Mamestra brassicae* (Lepidoptera) *Chromosome Research* 11(1): 51-56.
- Mank J and Avise J (2006) Phylogenetic conservation of chromosome numbers in Actinopterygian fishes *Genetica* 127(1): 321-27.
- Mank JE, Promislow DEL and Avise JC (2006) Evolution of alternative sex-determining mechanisms in teleost fishes *Biological Journal of the Linnean Society* 87(1): 83-93.
- Martins C, Ferreira I, Oliveira C, Foresti F and Galetti P (2006) A tandemly repetitive centromeric DNA sequence of the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) is derived from 5S rDNA *Genetica* 127(1): 133-41.
- Matsubara K, Tarui H, Toriba M, Yamada K, Nishida-Umehara C, Agata K and Matsuda Y (2006) Evidence for different origin of sex chromosomes in snakes, birds, and mammals and step-wise differentiation of snake sex chromosomes *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(48): 18190-5.
- Matsuda M (2005) Sex determination in the teleost medaka, *Oryzias latipes* *Annual Reviews of Genetics* 39: 293-307.
- Matsuda M, Nagahama Y, Shinomiya A, Sato T, Matsuda C, Kobayashi T, Morrey CE, Shibata N, Asakawa S, Shimizu N, Hori H, Hamaguchi S and Sakaizumi M (2002)

- DMY* is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish *Nature* 417(6888): 559-63.
- Moysés CB (2005) Diversidade genética, estrutura populacional e análises filogenéticas no gênero *Eigenmannia* (Pisces: Gymnotiformes) *Tese de Doutorado* Universidade de São Paulo
- Nanda I, Kondo M, Hornung U, Asakawa S, Winkler C, Shimizu A, Shan Z, Haaf T, Shimizu N, Shima A, Schmid M and Scharl M (2002) A duplicated copy of *DMRT1* in the sex-determining region of the Y chromosome of the medaka, *Oryzias latipes* *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(18): 11778-83.
- Oliveira C and Wright JM (1998) Molecular cytogenetic analysis of heterochromatin in the chromosomes of tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae) *Chromosome Research* 6(3): 205-11.
- Parise-Maltempi PP, Martins C, Oliveira C and Foresti F (2007) Identification of a new repetitive element in the sex chromosomes of *Leporinus elongatus* (Teleostei: Characiformes: Anostomidae): new insights into the sex chromosomes of *Leporinus* *Cytogenetic and Genome Research* 116(3): 218-23.
- Peichel CL, Ross JA, Matson CK, Dickson M, Grimwood J, Schmutz J, Myers RM, Mori S, Schluter D and Kingsley DM (2004) The master sex-determination locus in threespine sticklebacks is on a nascent Y chromosome *Current Biology* 14(16): 1416-24.
- Phillips RB, Konkol NR, Reed KM and Stein JD (2001) Chromosome painting supports lack of homology among sex chromosomes in *Oncorhynchus*, *Salmo*, and *Salvelinus* (Salmonidae) *Genetica* 111(1-3): 119-23.
- Reed KM, Bohlander SK and Phillips RB (1995) Microdissection of the Y chromosome and fluorescence in situ hybridization analysis of the sex chromosomes of lake trout, *Salvelinus namaycush* *Chromosome Research* 3(4): 221-6.
- Reed KM and Phillips RB (1995) Molecular characterization and cytogenetic analysis of highly repeated DNAs of lake trout, *Salvelinus namaycush* *Chromosoma* 104(4): 242-51.

- Rice WR (1992) Sexually antagonistic genes: experimental evidence *Science* 256(5062): 1436-9.
- Rice WR and Chippindale AK (2001) Sexual Recombination and the Power of Natural Selection *Science* 294(5542): 555-59.
- Saito Y, Edpalina R and Abe S (2007) Isolation and characterization of salmonid telomeric and centromeric satellite DNA sequences *Genetica* 131(2): 157-66.
- Sarre S and Quinn A (2004) The ends of a continuum: genetic and temperature-dependent sex determination in reptiles *BioEssays* 26(6): 639-45.
- Schartl M (2004) Sex chromosome evolution in non-mammalian vertebrates *Current Opinion in Genetics and Development* 14(6): 634-41.
- Schweizer D (1976) Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI *Chromosoma* 58: 307-24.
- Shapiro JA and von Sternberg R (2005) Why repetitive DNA is essential to genome function *Biological Reviews* 80(02): 227-50.
- Siderakis M and Tarsounas M (2007) Telomere regulation and function during meiosis *Chromosome Research* 15(5): 667-79.
- Taft RJ, Pheasant M and Mattick JS (2007) The relationship between non-protein-coding DNA and eukaryotic complexity *BioEssays* 29(3): 288-99.
- Takehana Y, Demiyah D, Naruse K, Hamaguchi S and Sakaizumi M (2007a) Evolution of different Y chromosomes in two medaka species, *Oryzias dancena* and *O. latipes* *Genetics* 175(3): 1335-40.
- Takehana Y, Naruse K, Hamaguchi S and Sakaizumi M (2007b) Evolution of ZZ/ZW and XX/XY sex-determination systems in the closely related medaka species, *Oryzias hubbsi* and *O. dancena* *Chromosoma* Online First.
- Telenius H, Carter NP, Bebb CE, Nordenskjold M, Ponder BA and Tunnacliffe A (1992) Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer *Genomics* 13(3): 718-25.

- Vallender EJ and Lahn BT (2006) Multiple independent origins of sex chromosomes in amniotes *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(48): 18031-2.
- van Doorn GS and Kirkpatrick M (2007) Turnover of sex chromosomes induced by sexual conflict *Nature* 449(7164): 909-12.
- Volff JN (2005) Genome evolution and biodiversity in teleost fish *Heredity* 94(3): 280-94.
- Volff JN and Scharl M (2001) Variability of genetic sex determination in poeciliid fishes *Genetica* 111(1-3): 101-10.
- Walsh JB (1987) Persistence of Tandem Arrays: Implications for Satellite and Simple-Sequence DNAs *Genetics* 115(3): 553-67.
- Weimer J, Kiechle M, Senger G, Wiedemann U, Ovens-Raeder A, Schuierer S, Kautza M, Siebert R and Arnold N (1999) An easy and reliable procedure of microdissection technique for the analysis of chromosomal breakpoints and marker chromosomes *Chromosome Research* 7(5): 355-62.
- Woram RA, Gharbi K, Sakamoto T, Hoyheim B, Holm LE, Naish K, McGowan C, Ferguson MM, Phillips RB, Stein J, Guyomard R, Cairney M, Taggart JB, Powell R, Davidson W and Danzmann RG (2003) Comparative genome analysis of the primary sex-determining locus in salmonid fishes *Genome Research* 13(2): 272-80.
- Wu WL, Wang JP, Tseng MC and Chiang TY (1999) Cloning and genetic variability of a HindIII repetitive DNA in *Acrossocheilus paradoxus* (Cyprinidae) *Genome* 42(4): 780-88.
- Yamada K, Kamimura E, Kondo M, Tsuchiya K, Nishida-Umehara C and Matsuda Y (2006) New families of site-specific repetitive DNA sequences that comprise constitutive heterochromatin of the Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*, Cricetinae, Rodentia) *Chromosoma* 115(1): 36-49.
- Yi MS, Li YQ, Liu JD, Zhou L, Yu QX and Gui JF (2003) Molecular cytogenetic detection of paternal chromosome fragments in allogynogenetic gibel carp, *Carassius auratus gibelio* Bloch *Chromosome Research* 11(7): 665-71.