Localização in situ de elementos transponíveis nos cromossomos sexuais de *Parodon hilarii* (Characiformes: Parodontidae)

Luiz Felipe Biuk (PIBIC/UEPG), Viviane Demetrio Nascimento (Pesquisadora), Viviane Nogaroto (Pesquisadora), Marcelo Ricardo Vicari (Orientador), e-mail: luiz.fb18@hotmail.com, e-mail do orientador: vicarimr@yahoo.com.br
Universidade Estadual de Ponta Grossa/ Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética / Setor de Ciências Biológicas e da Saúde.

Ciências Biológicas/ Genética/ Genética Animal

Palavras-chave: citogenética, diferenciação cromossômica, DNAs repetitivos, FISH, heterogametia feminina.

Resumo

As sequências repetitivas de DNA estão presentes na organização dos genomas eucarióticos e possuem funções estruturais e regulatórias. Com os avanços em análises citogenéticas de peixes, espécies de Parodontidae têm sido utilizadas no entendimento do processo de origem e diferenciação dos cromossomos sexuais heteromórficos. A espécie *Parodon hilarii* apresenta um sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW com o cromossomo W sendo o maior do cariótipo. Contudo, não se conhece a organização completa da região heteromórfica repetitiva que compõe sua estrutura. Com a recente anotação de sequências de elementos transponíveis no genoma de *Apareiodon* sp. (Parodontidae), as mais abundantes foram utilizadas neste estudo com objetivo de verificar o processo de diferenciação do cromossomo W de *P. hilarii.* Os dados obtidos demonstraram que os retrotransposons L1, L2, Rex1 e Rex3 não possuem grandes acúmulos cromossomos de *P. hilarii*. Por outro lado, o DNA transposon En/Spm tem grande bloco no cromossomo W. Este estudo elucida parte da composição do cromossomo W de *P. hilarii* e corrobora a proposta de origem única para os cromossomos sexuais ZW de Parodontidae.

Introdução

Nos genomas eucarióticos da maioria das espécies, os chamados DNAs repetitivos, fragmentos de DNA que podem consistir de sequências idênticas ou semelhantes, que se repetem diversas vezes, podendo estar em tandem (lado a lado), ou dispersas no genoma, sendo estes últimos denominados elementos transponíveis (TEs) (SUMNER, 2003). Atualmente, são reconhecidas inúmeras funções desses DNAs repetitivos, sendo uma delas, a participação na origem dos cromossomos sexuais, onde eles se acumulam no cromossomo heteromórfico, promovendo erosão gênica, restrição à recombinação e formação da região cromossômica restrita ao sexo, a qual é creditada possuir o (s) gene (s) da determinação sexual (SCHEMBERGER et al., 2019).

Considerando o aprimoramento na citogenética de peixes Neotropicais para a busca de respostas consistentes para os mecanismos de diversificação do genoma das espécies e para o entendimento da diferenciação sexual, se tem a utilização, dos peixes da família Parodontidae, onde a diversificação cariotípica é, em maior parte, devida à movimentação e acúmulo de DNAs repetitivos (SCHEMBERGER et al., 2011, 2019; ZIEMNICZAK et al., 2014).

Algumas espécies de Parodontidae são descritas por apresentar um sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW, o qual tem origem por uma inversão paracêntrica

de um sítio terminal portador da sequência repetitiva WAp para a região proximal do braço curto de um par cromossômico metacêntrico e, posterior amplificação desta sequência levando a diferenciação do cromossomo sexual W (SCHEMBERGER et al., 2011). Na região específica do cromossomo W (REW) das espécies de Parodontidae foi verificado o acúmulo de sequências satélites e inúmeros TEs, os quais não são exclusivos dos sexuais (ZIEMNICZAK et al., 2014; SCHEMBERGER et al., 2019). Dados recentes da anotação genômica dos DNAs repetitivos em *Apareiodon* sp. evidenciaram todos os tipos de TEs e sua abundância comparativa nos genomas "macho" e "fêmea", porém sem um conhecimento da sua atuação na diferenciação do cromossomo sexual W de *P. hilarii*. Com essas perspectivas, este projeto pretendeu avaliar a presença de TEs nos cromossomos de *P. hilarii* e sua atuação na diferenciação do cromossomo sexual W.

Material e Métodos

Foram estudados exemplares de *Parodon hilarii*, 2n = 54 cromossomos e sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW. O DNA e material cromossômico foi obtido via preparação de espécimes coletados na natureza e a partir do banco de preparações cromossômicas do Laboratório de "Biologia Cromossômica: Estrutura & Função" da Universidade Estadual de Ponta Grossa. Os procedimentos de uso e bem-estar em pesquisa envolvendo animais estão de acordo com o Comitê de Ética no Uso de Animais em Pesquisa da UEPG (CEUA 011/2017).

Dados da anotação da fração repetitiva do genoma de *Apareiodon* sp. (Parodontidae) foram utilizados neste estudo para a seleção de sequências com similaridade aos TEs L1, L2, Rex 1, Rex 3 e En/Spm. Contigs do genoma de *Apareiodon* sp. contendo estas sequências foram alinhados no software MUSCLE incorporado na plataforma Geneious 4.8.5 para a detecção de regiões de menor degeneração. Essas regiões foram utilizadas para o desenho de primers com uso do software Primer3plus. Os melhores primers obtidos (Tabela 01), foram utilizados em reações de PCR para a obtenção das sequências a partir do DNA genômico de *P. hilarii*.

Tabela 01. Primers de sequências de Elementos transponíveis em Parodontidae.

TE	amplicon	Sequência Forward	Sequência Reverse
EnSpm	511 pb	5' GCAGGCTTTCACGAATCT 3'	5' CATGAGGGCTCCTGTTCT 3'
L1	384 pb	5' ATGATCCAGACCCAACAGA 3'	5' CAATCGGGTAGCTAATGTCTT 3'
L2	503 pb	5' TTCCTCCTGCTAAACTCAGATAA	5'AAGATACTGAGGGGCGAGAT 3'
Rex1	444 pb	5' TGAAGTGCTTTTAGAGGCTG 3'	5' GCAAACTTGGTGATGTGGT 3'
Rex 3	500pb	5' CGGTGAYAAAGGGCAGCCCTG	5' TGGCAGACNGGGGTGGTGGT 3'

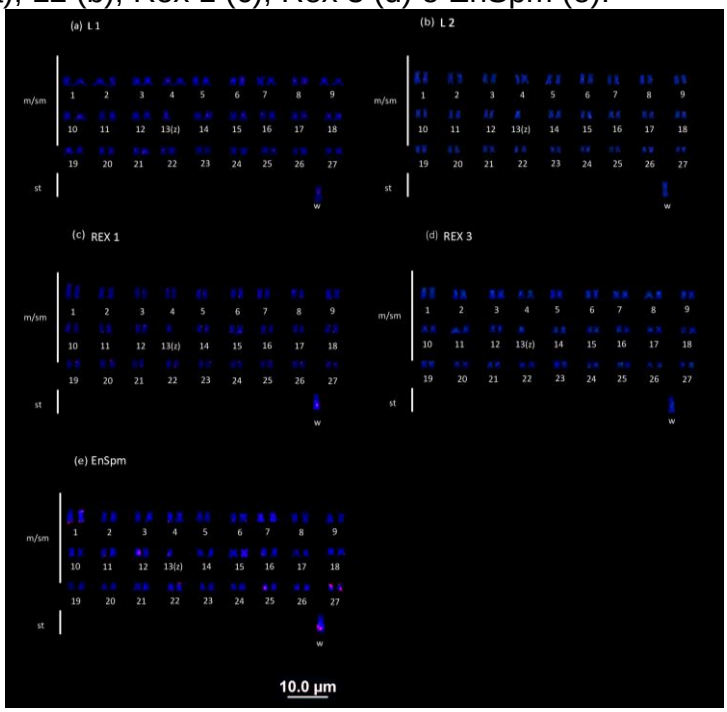
O DNA genômico foi obtido a partir do fígado dos espécimes com uso do protocolo adaptado de ALJANABI e MARTINEZ (1997). A amplificação dos TEs foi realizada por PCR convencional utilizando-se de primers específicos para cada uma das sequências. As sequências obtidas foram marcadas como sondas por reação de "Nick Translation" para uso posterior em localização *in situ*. Os TEs En/Spm, L1, L2 e REX 1 foram marcados com digoxigenina 11 dUTP (Dig-Nick Translation Mix, Roche Applied Science). O TE REX 3 foi marcado por biotina 16 dUTP (Biotin-Nick Translation Mix, Roche Applied Science). As sequências repetitivas foram mapeadas nos cromossomos pelo método de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) segundo Pinkel et al. (1980). As preparações com FISH foram analisadas em microscópio de epifluorescência Zeiss Axio Lab 1 acoplado ao software Zen Lite em Câmera Zeiss

AxioCam ICM1, resolução de 1.4 megapixels (Carl Zeiss®). Os cariótipos foram organizados e classificados em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a) de acordo com a relação entre os braços.

Resultados e Discussão

O resultado da localização *in situ* evidenciou que *P. hilarii* detêm os TEs L1, L2, Rex 1, REx 3 e En/Spm dispersos ao longo dos autossomos, com maior acúmulo em regiões intersticiais e terminais (Figura 1). Além da localização dispersa nos autossomos, os retroelementos L1 e L2 apresentaram pequenos acúmulos nas regiões proximais do braço curto dos cromossomos sexuais Z e W (Figura 1a, b). Já os retroelmentos Rex 1 e Rex 3 demonstraram um pequeno acúmulo na região intersticial do braço longo do cromossomo W (Figura 1 c, d). Em contrapartida, o DNA transposon En/Spm mostrou um grande acúmulo na região subterminal do braço longo do cromossomo W, o qual não é evidenciado no cromossomo Z (Figura 1 e). Além da marcação no cromossomo W, o En/Spm foi localizado em regiões terminais e proximais de alguns autossomos (Figura 1 e).

Figura 01. Cariótipos de *Parodon hilarii* submetidos a FISH com as sequências L1 (a), L2 (b), Rex 1 (c), Rex 3 (d) e EnSpm (e).



Estudos prévios em *P. hilarii* demonstraram inúmeras sequências repetitivas presentes e acumuladas na REW (BELLAFRONTE et al., 2011; SCHEMBERGER et al., 2011; ZIEMNICZAK et al., 2014). Por outro lado, sequências presentes na região pseudoautossômica, correspondente ao braço curto do cromossomo W, ainda não foram detectadas. Os retroelementos L1 e L2 apresentaram pequenos acúmulos na região pseudoautossômica em *P. hilarii*, fato que corrobora a proposta de pequena invasão de sequências repetitivas e maior densidade gênica para esta região (SCHEMBERGER et al., 2011). Além disso, o estudo de Schemberger et al. (2019) demonstrou uma menor porcentagem de retrotransposons comparada aos DNAs transposons presente no genoma de *Apareiodon* sp. Neste estudo, a localização *in situ* de retrotransposons também evidenciou uma pequena quantidade destes TEs nos cromossomos de *P. hilarii*. Assim, diante dos dados aqui obtidos, a localização

in situ de TEs em *P. hilarii* demonstrou uma diferenciação do cromossomo W similar àquela descrita para *Apareiodon* sp.

Conclusão

Estudos com a localização *in situ* de TEs têm contribuído para a elucidação da diversidade cariotípica encontrada em família Parodontidae, principalmente relacionados para a origem dos cromossomos sexuais neste grupo. Este estudo mostrou que os retrotransposons L1, L2, Rex 1 e Rex 3 tem pequeno acúmulo nos cromossomos de *P. hilarii*, fato que corrobora ao encontrado no dado genômico de *Apareiodon* sp. Por outro lado, o DNA transposon En/Spm mostrou estar envolvido na origem dos cromossomos sexuais de Parodontidae e tem localização compartilhada entre os cromossomos W de *Apareiodon* sp. e *P. hilarii*. Os dados aqui obtidos reforçam a hipótese de origem única para os cromossomos sexuais ZW de Parodontidae e, que as espécies deste grupo que detêm cromossomos sexuais diferenciados podem ter tido diversificação e especiação após este evento.

Agradecimentos

Agradecemos à Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG); ao Ministério do Meio Ambiente/Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (MMA/ICMBio/SISBIO No. 15117); ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Secretaria de Ciência e Tecnologia do Estado do Paraná (SETI), à Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico do Estado do Paraná (Fundação Araucária) e, à Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Referências

ALJANABI, S.M.; MARTINEZ, I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 4692–4693, 1997.

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

SCHEMBERGER, M.O.; BELLAFRONTE, E.; NOGAROTO, V.; ALMEIDA, M.C.; SCHÜHLI, G.S.; ARTONI, R.F.; MOREIRA-FILHO, O.; VICARI, M.R. Differentiation of repetitive DNA sites and sex chromosome systems reveal closely related group in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes). **Genetica**, v. 139, p. 1499–1508, 2011.

SCHEMBERGER, M.O.; NASCIMENTO, V.D.; COAN, R.; RAMOS, E.; NOGAROTO, V.; ZIEMNICZAK, K.; VALENTE, G.T.; MARTINS, C.; MOREIRA-FILHO, O.; VICARI, M.R. DNA transposons invasion and microsatellites accumulation guide the W chromosome differentiation in a Neotropical fish genome. **Chromosoma**, 2019. doi.org/10.1007/s00412-019-00721-9.

SUMNER, A.T. Chromosomes - Organization and Function. Oxford**: Blackwell Publishing**, 287p., 2003.

ZIEMNICZAK, K.; TRALDI, J.B.; NOGAROTO, V.; ALMEIDA, M.C.; ARTONI, R.F.; MOREIRA-FILHO, O.; VICARI, M.R. In situ localization of (GATA)n and (TTAGGG)n repeated DNAs and W sex chromosome differentiation in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes). **Cytogenetic and Genome Research**, v.144, p.325 - 332, 2014.