

ISOLAMENTO DE SEQUÊNCIA DE DNA SEXO-ESPECÍFICA EM *L. elongatus* (Teleostei, Characiformes, Anostomidae). Patricia Alexandra de Carvalho Gomes Teixeira, Fausto Foresti, Adriane Pinto Wasko, Daniela Cristina Ferreira, Cláudio de Oliveira. - Genética - Ciências Biológicas - Departamento de Morfologia - Instituto de Biociências - Campus de Botucatu.

Uma importante característica dos organismos eucariotos (com exceção dos fungos) é que seus cromossomos apresentam uma significativa quantidade de tipos de segmentos de DNA repetitivo, não encontrados em procariotos. Nesse grupo, a presença de íntrons, extensas regiões inter-genes, sequências satélites, pseudogenes e muitas famílias de elementos transponíveis sugerem a existência de um excesso de segmentos de DNA, que aparentemente não são frequentemente sujeitos a uma forte pressão seletiva.

DNAs repetitivos são constituídos por sequências de bases de diferentes comprimentos e composições que aparecem muitas vezes no genoma. Estão incluídos neste grupo os DNAs repetitivos arranjados em cadeia compostos pelo DNA satélite (DNA altamente repetitivo), as sequências de minissatélites e microssatélites (DNA moderadamente repetitivo) e as sequências repetitivas dispersas no genoma, compostas por transposons e retrotransposons (DNA moderadamente repetitivo).

A classe de sequências repetidas mais intensivamente estudada é a das sequências repetidas arranjadas em cadeia, coletivamente chamadas de sequências satélites. A complexidade das sequências arranjadas em cadeia pode variar de 2pb a até 2kb e o tamanho total das cadeias formadas pelas múltiplas cópias pode variar de menos de 100pb a até mais de 100Mb. O significado funcional das sequências satélites ainda não é totalmente conhecido, mas algumas classes de sequências repetidas devem desempenhar papéis importantes no funcionamento celular.

Embora DNAs repetitivos tenham sido muito estudados em invertebrados e mamíferos, em peixes ainda é pouco expressivo o número de informações que se tem a respeito da sequência, organização genômica e citológica desses DNAs, quando comparados ao grande número de espécies existentes. Estudar as sequências de DNA repetitivo significa conhecer a organização genômica dos peixes assim como a dinâmica com que estas sequências têm evoluído nestes organismos. Sua localização de auxilia na construção de mapas genômicos das espécies analisadas. A primeira caracterização de uma família de DNA repetitivo neste grupo de vertebrados foi feita no final da década de 80. Desde então, várias investigações foram realizadas, mas, ainda assim, este número é bastante restrito frente ao grande potencial de estudo oferecido pelo grupo.

A análise de sequências altamente repetitivas de DNA também mostra ser uma importante ferramenta para o estudo não só da estrutura e funcionamento do material genético, como também para o estabelecimento de relações filogenéticas, pela detecção de marcadores cromossômicos de espécies crípticas e evolutivamente próximas. Em muitos casos, famílias de DNA satélite foram descritas como sendo espécie-específicas, não sendo detectáveis mesmo entre espécies muito próximas filogeneticamente.

Entre os peixes da família Anostomidae, o gênero *Leporinus* é o mais estudado, com cerca de 53 espécies citogeneticamente caracterizadas. Dentre as principais variações descritas para os representantes deste gênero, destaca-se a presença de cromossomos supranumerários nas espécies *Leporinus* sp e *L. friderici* e um peculiar mecanismo de cromossomos sexuais ZZ/ZW presente em sete espécies, onde o cromossomo Z é bem menor que o W, sendo este totalmente heterocromático.

Como o objetivo foi o de isolar e caracterizar sequências de DNA sexo-específicas em *L. elongatus*, exemplares de ambos os sexos foram obtidos dos estoques mantidos na estação de piscicultura do CEPTA/IBAMA – Pirassununga/SP. Para se isolar esta sequência sexo-específica foi realizada extração de DNA total de indivíduos machos e de fêmeas e quantificadas em gel de agarose 1%. Posteriormente, foram realizadas digestões enzimáticas com 10 endonucleases de restrição *DraI*, *EcoRI*, *EcoRV*, *HindIII*, *SspI*, *SacI*, *AluI*, *BamHI*, *KpnI*, *ApaI* (Figura 01).

Na análise em gel de agarose 1% dessas digestões, foram visualizadas bandas no DNA genômico somente dos machos, onde foram obtidas bandas das enzimas *BcII*, *DraI* (de aproximadamente 400pb), as quais foram purificadas para clonagens. Os fragmentos obtidos pela digestão enzimática, foram ligados aos plasmídeos pBluescript II KS+ que foram inseridos em linhagens de *E. coli*. Clones positivos foram obtidos somente para o fragmento da digestão *DraI*.

As amostras provenientes da *DraI* tiveram como resultado do produto de PCR, bandas com diferentes padrões. Aquelas obtidas a partir de *BcII* mostraram bandas não significativas que pudessem ser seqüenciadas. Após a obtenção desse último resultado, foram escolhidas as amostras provenientes de digestão com *DraI* para ser feito o seqüenciamento.

As seqüências foram analisadas no Bioedit e blastadas no GenBank, sendo que nenhuma homologia foi encontrada com outras seqüências. Através do seqüenciamento foi possível verificar que o fragmento obtido pela enzima *DraI* é composto por 423pb, rico em AT (55,55%), uma característica de seqüência satélite (Figura 02). Estudos em curso irão determinar a localização cromossômica e organização desta seqüência repetitiva no genoma dos indivíduos machos.

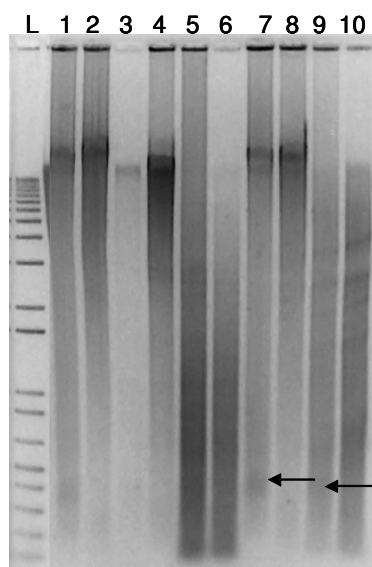


Figura 1: Gel de agarose mostrando o produto das digestões do DNA de macho e fêmea da espécie *Leporinus elongatus*, com diferentes enzimas de restrição. L) Ladder; 1) macho – *XbaI*; 2) fêmea – *XbaI*; 3) macho – *MspI*; 4) fêmea – *MspI*; 5) macho – *AfaI*; 6) fêmea – *AfaI*; 7) macho – *BcII*; 8) fêmea – *BcII*; 9) macho – *DraI*; 10) fêmea – *DraI*. As setas indicam as bandas obtidas com as enzimas *BcII*, *DraI*.

```
CCTTNNNNCTNTANNGNCTGGGNNTGATCCCGCNAACCGNGGATCCGATCTATATCTCTAGAACACTATACTTTAGCAAGGGTTAAATNT
GGAGAATAGCAAACTGACTTTCTCATGTATTTCTTCAGGTTCTAATGTTTTNAAACATTGATAGGGTTGAGGAAATAACAGATCANAATGT
ATCCACTTCAAACAACAAATGGTTATACTCTGAATCTTGGCTGAGGTACTTGTGATATTTTAAATGTATTAGGGCTGGGTGTGGAGGCTC
ACACCTGTAATTCCAGCACTTTGGGAGGCCGAGGCNNGTGGATCACTTGAGGTCAGGAGTTCGANAGCAGCCTGGCCAACATGATGAAACCT
CGCCTCTATTAATAAATACAAAAATGAGCTGGGCATGGATCCATATGACTAGTANA
```

Figura 2: Seqüência do clone 05 obtido a partir da digestão com a enzima *DraI* em *Leporinus elongatus*.

A partir dos resultados obtidos, acredita-se que a seqüência identificada possa ser caracterizada como sendo uma seqüência satélite, estruturas muito particulares desses indivíduos, já que não apresentaram forte homologia com outras seqüências.

Uma vez que regiões heterocromáticas são ricas em seqüências repetitivas, a identificação destas seqüências em *L. elongatus* pode resultar em informações que permitam a compreensão dos mecanismos de determinação do sexo nos peixes e, conseqüentemente, nos vertebrados.

Referências Bibliográficas

- Charlesworth B.; Snlegowski, P. & Stephan, W. (1994). The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature** **371**:215-220.
- Datta, U., Dutta, P. & Mandal, R.K. (1988). Cloning and characterization of a highly repetitive fish nucleotide sequence. **Gene** **62**: 331-336.
- Epplen, J.T. & Epplen-Haupt, A. (2002) Aspects of tandemly organized, repetitive sequences in chromosomal DNA. IN: Some aspects of chromosome structure and functions. RC Sobti, Obe G, Athwal RS eds. Narosa Publishing House, New Delhi, pp. 1-10
- Singer, M.F. (1982) Highly repeated sequences in mammalian genomes. **Int Rev Cytol** **76**: 67-112.
- Stephan, W. & Cho, S. (1994) Possible role of natural selection in the formation of tandem-repetitive noncoding DNA. **Genetics** **136**: 333-341.
- Weiner, A.M.; Deininger, P.L. & Efstratiadis, A. (1986) Nonviral retroposons: genes, pseudogenes, and transposable elements generated by the reverse flow of genetic information. **Annu Rev Biochem** **55**: 631-661

Bolsa: CNPq