

ANA ISABEL DO PAÇO TEIXEIRA

Organização da fracção repetitiva nos genomas de
Cricetus cricetus, *Peromyscus eremicus* (Família
Cricetidae) e *Praomys tullbergi* (Família Muridae).
Considerações sobre a evolução do cromossoma X

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM GENÉTICA MOLECULAR COMPARATIVA E TECNOLÓGICA

UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO

VILA REAL, 2007

Orientador: Professora Doutora Raquel Chaves

Co-Orientador: Doutora Filomena Adega

“It is those who know little, and not those who know much, who so positively assert that this or that problem will never be solved by science.”

Charles Darwin (1859)

Aos meus pais

À minha irmã

A todos os meus colegas de laboratório

AGRADECIMENTOS

Ao terminar mais uma etapa do meu percurso académico, não posso deixar de prestar o meu mais profundo agradecimento, a todos aqueles que contribuíram e me apoiaram de alguma forma, ao longo da elaboração deste trabalho. Gostava que todos soubessem que tudo o que escrevi nestes agradecimentos não foge em nada à realidade, aqui expresso o que realmente vejo em todos vocês. Quero que saibam que me sinto uma pessoa afortunada, pois tenho duas famílias: a biológica e aquela que ganhei nos últimos dois anos, mais vulgarmente conhecida como a MALTINHA DO LABORATÓRIO.

Ao PROFESSOR ARMANDO MASCARENHAS FERREIRA, reitor da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, pela disponibilização dos meios para a realização desta dissertação.

À COMISSÃO PERMANENTE DO CONSELHO CIENTIFICO DA UTAD, pela aceitação da intenção de mestrado.

Ao PROFESSOR DOUTOR HENRIQUE GUEDES-PINTO, coordenador do departamento de Genética e Biotecnologia desta Universidade, expresso o meu profundo agradecimento, pela disponibilização de meios para a realização desta dissertação e pelos ensinamentos, compreensão e disponibilidade, enquanto meu professor na Pós-graduação em Genética Molecular Comparativa e Tecnológica.

À PROFESSORA DOUTORA RAQUEL CHAVES, minha orientadora e mestre, por me ter aceite como discípula e pela preocupação que sempre demonstrou com o meu bem-estar, tanto no laboratório como na minha vida pessoal. Agradeço-lhe mesmo do fundinho do coração, pois considero-a como uma das melhores pessoas que conheço. Irei sempre recordar a sua generosidade, simpatia, alegria, lucidez, inteligência e bondade. Acredito mesmo que mudei como pessoa ao conviver consigo durante estes últimos dois anos, pois os seus ensinamentos não influenciaram apenas a minha vida académica.

À PROFESSORA DOUTORA FILOMENA ADEGA, minha co-orientadora e mestre, não posso deixar de fazer um agradecimento muito especial. Agradeço-te por tudo, estiveste sempre presente, por mais que diga obrigado nunca será suficiente. Irei estar-te sempre grata pela forma como

me recebes-te no laboratório, por me fazeres sentir que pertencia a este grupo de trabalho, pelos ensinamentos (que foram tantos), pela paciência, pelo exemplo de perfeição e exigência, pela alegria, pela tua preocupação com o meu bem-estar e pela irmandade.

À MALTINHA DO LABORATÓRIO, minha família do coração, agradeço a alegria, a amizade e a irmandade que todos os dias me ofereceram. Acho que não preciso de dizer quem faz parte desta minha família do coração, mas para que não restem dúvidas, vou passar a nomeá-los por ordem alfabética:

ANA BORGES (Ana Lú): apesar de seres a mais nova do grupo, mostras já muita responsabilidade e considero-te uma trabalhadora nata. Trabalhas com alegria e empenho, contagiando quem se encontra à tua volta. Agradeço a alegria que me transmitiste e as gargalhadas que demos juntas.

ANA VIERA DA SILVA (Netinha): penso que és a pessoa, para além da minha família, que melhor me conhece. Acho que consegues ver-me como realmente sou, o que por vezes não é fácil, admito! Agradeço os conselhos, os incentivos, as conversas, os ensinamentos, as gargalhadas e o companheirismo. Tudo me agrada em ti, és uma pessoa cinco estrelas.

CLÁUDIA BAPTISTA (Lau Lau): admiro a tua força, a tua segurança, a tua espontaneidade e a tua energia. Surpreende-me sempre a tua clareza de ideias e a forma simples como resolves qualquer problema. Agradeço os conselhos, os incentivos, os ensinamentos e a tua alegria.

DANIELA SÁ (Dani): és das pessoas que conheço mais rigorosa em tudo aquilo que fazes. Consegues duplicar-te e até triplicar-te, sem que nenhuma das tuas tarefas fique a perder. Agradeço-te a amizade, os conselhos, a paciência, as boleias (que foram tantas), o carinho e o companheirismo.

ESTELA BASTOS (Professora Estela): agradeço-lhe os ensinamentos, a disponibilidade, a compreensão e a calma que sempre me transmitiu, enquanto minha professora na Pós-graduação em Genética Molecular Comparativa e Tecnológica. Agora, também lhe agradeço a amizade, a alegria, as gargalhadas, a calma e os ensinamentos que me transmitiu nestes últimos dois anos.

FERNANDO SANTOS (Nandinho): agradeço-te a tua amizade, os teus conselhos, alegria e simpatia. Tens um grande coração e tenho pena de não conviver mais contigo, já que quase nunca estás connosco.

JORGE PEREIRA (Jójó): és das pessoas com mais graça que conheço. Tens sempre uma piada para dizer ou um comentário engraçado para fazer. Fazes-me sentir que os problemas nunca são assim tão grandes, que por vezes complico um bocadinho. Agradeço-te a amizade, as gargalhadas, os conselhos e a alegria.

KARINE BOUILLY: quero falar-te em português, acho que já consegues percebê-lo muito bem. Agradeço a tua amizade e disponibilidade.

RUI ABREU: admiro a tua calma! Gostava muito de ser assim! Obrigada pelos ensinamentos de informática, pela simpatia e amizade!

SANDRA LOUZADA (Sandrex): gosto muito da forma simples como encaras a vida, sem interesses e sem preocupações em demasia. Acho que por isso, todos nós gostamos muito de ti. Agradeço-te a tua amizade e carinho, os teus conselhos, a tua confiança em mim, a tua alegria e irmandade.

SARA SANTOS: fico sempre surpreendida com a tua destreza na resolução de imprevistos e com tua sensibilidade para todos os assuntos. És a engenhocas cá do laboratório. Assim, quero agradecer-te os teus ensinamentos, a tua palavra amiga, os teus conselhos, a tua alegria, as aulas de canto e as tuas piadas.

SUSANA MELES (Meles Meles): embora te tenha nomeado por último, não quero que penses que és para mim a pessoa menos importante. Acompanhaste-me desde o primeiro dia e tenho partilhado contigo todas as minhas alegrias e preocupações. Acho que vês a vida de uma forma muito particular, crias um mundo cor-de-rosa e tentas que permaneça assim. Agradeço-te o companheirismo, que tem sido muito, a irmandade, os disparates que fizemos juntas e a alegria que te caracteriza.

À MALTINHA DO LABORATÓRIO quero ainda dizer que se a vida acabar por nos separar, espero que nunca se esqueçam de mim! Tenho orgulho em ter trabalhado com todos vocês e sinto que fui privilegiada!

À MINHA FAMÍLIA, pai, mãe e irmã, as pessoas que melhor me conhecem e que sempre me apoiaram durante toda a minha vida, não só nesta etapa, mas em todas as outras que fui superando. Dizem que a família não se escolhe, mas se me fosse dada a oportunidade de o fazer, escolhia cada um deles, tal como são. Agradeço o esforço que os meus pais, pessoas simples, filhos de lavradores, fizeram para que eu e a minha irmã estudássemos. Agradeço o estímulo, a confiança e o carinho que me deram todos os dias. À minha irmã agradeço, o companheirismo, o carinho, os conselhos, os estímulos, o incentivo, a confiança e a amizade, pois embora tenha a felicidade de ter muitos amigos, a minha irmã é, sem dúvida, a minha melhor amiga.

RESUMO

O aumento do nosso conhecimento sobre a natureza molecular da heterocromatina constitutiva, permite defini-la como um importante componente genómico, com funções ao nível da estrutura e regulação do genoma (Dimitri *et al.* 2004), para além de se considerar ainda o seu envolvimento na evolução de cariótipos. É actualmente aceite que a sua presença pode facilitar a ocorrência de rearranjos cromossómicos, considerando-se mesmo as regiões ricas nestas sequências de DNA como “hotspots” de reorganização cromossómica (Yunis e Yasmineh 1971, Peacock *et al.* 1982, John 1988, Chaves *et al.* 2004).

No presente trabalho caracterizou-se detalhadamente a heterocromatina constitutiva dos cromossomas de três espécies de roedores, *Cricetus cricetus*, *Peromyscus eremicus* (Família Cricetidae), e *Praomys tullbergi* (Família Muridae), recorrendo-se à metodologia de restrição *in situ* (com um painel de sete enzimas de restrição) e bandeamento-C sequencial. Este trabalho permitiu detectar uma elevada heterogeneidade molecular nas sequências de heterocromatina constitutiva dos três genomas, provando ser uma ferramenta útil no estudo destas sequências. A comparação geral da quantidade, distribuição e natureza molecular da heterocromatina constitutiva das três espécies em análise, sugere a ocorrência de diferentes percursos evolutivos envolvidos na origem destes cariótipos. Na espécie *C. cricetus*, que apresenta um cariótipo quase totalmente meta/submetacêntrico, a heterocromatina constitutiva parece estar preferencialmente localizada em regiões (peri)centroméricas, apresentando a maioria dos autossomas dois blocos de heterocromatina constitutiva, o que sugere a ocorrência de, pelo menos, translocações Robertsonianas durante a evolução deste cariótipo. A espécie *P. eremicus*, com um cariótipo constituído apenas por cromossomas submetacêntricos, apresenta também grandes quantidades de heterocromatina constitutiva essencialmente localizada nas regiões (peri)centroméricas, sendo inclusivamente o braço curto da maioria dos cromossomas completamente heterocromático. A espécie *P. tullbergi*, com um complemento autossómico acrocêntrico, é das três espécies estudadas aquela cujos cromossomas exibem menos heterocromatina constitutiva centromérica. Em alguns cromossomas, a heterocromatina intersticial é quase tão abundante como a centromérica, contrariamente ao observado para a maioria dos cromossomas das outras duas espécies analisadas. Esta diferente distribuição e o elevado número de subclasses de heterocromatina constitutiva identificado nos cromossomas de *P. tullbergi* (52 subclasses), sugere que este cariótipo é o mais derivativo dos analisados neste trabalho, tendo sido originado pela ocorrência de um elevado número de complexos

rearranjos cromossômicos. A elevada heterogeneidade das sequências de heterocromatina constitutiva identificada nos três genomas analisados, sugere a coexistência de diferentes famílias de DNA satélite, ou variantes destas famílias nestes genomas.

A análise *in silico* das sequências LINE-1 (“Long Interspersed Elements-1”) permitiu estabelecer relações filogenéticas entre espécies, já que são caracteres não homoplásicos (Verneau *et al.* 1998, Waters *et al.* 2007). O alinhamento das sequências LINE-1 de *C. cricetus*, *P. eremicus*, *P. tullbergi* (isoladas pela primeira vez neste trabalho), *M. musculus*, *R. norvegicus* e de 10 espécies pertencentes à família Cricetidae, disponíveis na base de dados “NCBI Nucleotide”, demonstrou que todas as sequências correspondem a uma determinada região da ORFII da sequência LINE-1 das espécies índice *M. musculus* e *R. norvegicus*. Sugere-se assim que esta região da sequência está conservada nas várias espécies de roedores, observando-se valores de similaridade entre sequências acima dos 75%. O alinhamento de todas as sequências permitiu construir um dendograma que relaciona filogeneticamente todas as espécies analisadas, comprovando-se uma maior proximidade filogenética entre os roedores pertencentes à mesma família.

O mapeamento físico das sequências LINE-1 de *C. cricetus*, *P. eremicus* e *P. tullbergi*, nos respectivos cromossomas, demonstrou que estas sequências se encontram “interspersed” ao longo de todos os cromossomas, não se verificando uma localização preferencial destas sequências no cromossoma X. Estes resultados não suportam a hipótese de Lyon (1998), que sugere o envolvimento das sequências LINE-1 na inativação do cromossoma X, ao observar uma localização preferencial destas sequências no cromossoma X do Homem e rato. Duas hipóteses podem ser formuladas para justificar os resultados obtidos. Pode ter ocorrido perda de sequências LINE-1 no cromossoma X das três espécies no decorrer da evolução, sendo que este acontecimento foi anteriormente sugerido para outras espécies de roedores (Casavant *et al.* 2000), embora neste último caso, a perda destas sequências seja relativa a todo o complemento cromossômico. Outro cenário possível é a existência de diferentes mecanismos de inativação do cromossoma X (pelo menos nestes roedores) sem que haja participação das sequências LINE-1, e neste caso, o genoma não precisaria de conservar estas sequências maioritariamente localizadas no cromossoma X, observando-se alternativamente uma distribuição indiferenciada por todo o complemento cromossômico.

A realização de “Comparative Chromosome Painting”, com uma sonda representativa do cromossoma X de *R. norvegicus* (RNOX) em preparações cromossômicas das três espécies, revelou três segmentos sinténicos num dos braços do cromossoma X de *C. cricetus*, oito segmentos sinténicos no cromossoma X de *P. eremicus* e seis segmentos sinténicos no braço

longo do cromossoma X de *P. tullbergi*. Esta análise revelou ainda a ocorrência de uma inversão pericêntrica durante a evolução do cromossoma X de *P. eremicus*. A caracterização da heterocromatina constitutiva realizada durante este trabalho, revelou a existência de bandas-C a flanquear alguns segmentos sinténicos discriminados pelo “paint” RNOX no cromossoma X das três espécies analisadas. Estes resultados parecem assim sugerir a participação das sequências de heterocromatina na ocorrência dos rearranjos cromossómicos, que originaram estes cromossomas, evidenciada pela presença de sequências repetitivas nas regiões de “breakpoints” evolutivos. Ainda no âmbito deste trabalho, realizou-se uma análise *in silico* entre a distribuição cromossómica de sequências repetitivas em tandem e a localização de regiões de “breakpoints” evolutivos no cromossoma X da espécie índice *M. musculus*. Nesta análise recorreu-se às sentenças entre cromossomas do *M. musculus*, *R. norvegicus* e *H. sapiens*, para a identificação de regiões de “breakpoints” evolutivos no cromossoma X de *M. musculus*, e a ferramentas bioinformáticas que permitiram a avaliação da densidade de sequências repetitivas em tandem neste cromossoma. Resultados preliminares desta análise demonstram que as regiões que apresentam maior densidade de sequências repetitivas em tandem, correspondem de facto, a regiões de “breakpoints” evolutivos, o que vem comprovar o importante papel destas sequências na reorganização da arquitectura dos genomas ao longo da evolução.

Quando se compararam os cromossomas X de *C. cricetus*, *P. eremicus* e *P. tullbergi*, observaram-se diferenças ao nível da sua morfologia, e na quantidade, localização e natureza molecular da sua heterocromatina, sugerindo que se originaram através da ocorrência de rearranjos cromossómicos como inversões, transposições centroméricas, adições/eliminações de heterocromatina e translocações Robertsonianas, como é o caso do cromossoma X de *C. cricetus*, que apresenta dois blocos de heterocromatina constitutiva na região (peri)centromérica. O maior número de subclasses de heterocromatina constitutiva identificado no cromossoma X de *P. tullbergi*, comparativamente às diferentes espécies em análise, sugere que o cromossoma X desta espécie é o mais rearranjado. No entanto, a análise dos segmentos sinténicos no cromossoma X das três espécies de roedores, com a sonda de “painting” RNOX, sugere o cromossoma X de *P. eremicus* como sendo o mais rearranjado. Esta aparente discordância deve-se provavelmente às diferentes análises efectuadas, nomeadamente, identificação de subclasses de heterocromatina e de segmentos sinténicos entre cromossomas de diferentes espécies, sendo indispensável uma investigação mais detalhada, de modo a clarificar efectivamente os mecanismos subjacentes à evolução destes cromossomas.

Futuros trabalhos que visem o estudo e caracterização de sequências de heterocromatina constitutiva, nomeadamente sequências de DNA satélite, isoladas por exemplo, por microdissecção de regiões centroméricas de cromossomas, e a construção de mapas comparativos para diferentes espécies de roedores, irão certamente contribuir para um melhor entendimento dos processos evolutivos que moldaram estes genomas e das relações filogenéticas entre espécies.

ABSTRACT

The increase of our knowledge concerning the molecular nature of constitutive heterochromatin is now allowing to define these sequences as important genomic components, with functions in the structure and regulation of the genome (Dimitri *et al.* 2004), besides its involvement in karyotype's evolution. Nowadays it is accepted that the presence of constitutive heterochromatin can facilitate the occurrence of chromosome rearrangements, being the rich regions in these DNA sequences considered as hotspots for chromosome reshuffling (Yunis and Yasmineh 1971, Peacock *et al.* 1982, John 1988, Keys *et al.* 2004).

In the present work it was described in detail the constitutive heterochromatin of three rodent species chromosomes, *Cricetus cricetus*, *Peromyscus eremicus* (Cricetidae Family), and *Praomys tullbergi* (Muridae Family), using *in situ* endonuclease restriction (with a panel of seven restriction enzymes) and sequential C-banding. This work allowed to detect a high molecular nature of the constitutive heterochromatin in the three genomes, demonstrating to be an useful tool in the study of these sequences. The general comparison of the amount, distribution and molecular nature of the constitutive heterochromatin in the three species analyzed, suggests the occurrence of different evolutionary pathways in the origin of these karyotypes. In the species *C. cricetus*, which presents a nearly meta/submetacentric karyotype, the constitutive heterochromatin seems to be preferentially located in (peri)centromeric regions, presenting the majority of the autosomes two constitutive heterochromatin blocks, what suggests the occurrence, of at least, Robertsonian translocations during the course of these karyotypes evolution. The species *P. eremicus*, with a submetacentric karyotype, also presents great amounts of constitutive heterochromatin, essentially located in (peri)centromeric regions, being inclusively the short arms of the majority of the chromosomes completely heterochromatic. The species *P. tullbergi*, with an acrocentric autosome complement, is the one whose chromosomes exhibit less centromeric constitutive heterochromatin. In some chromosomes, interstitial heterochromatin is almost as abundant as the centromeric heterochromatin, in opposition to the observed for most chromosomes of the other two analyzed species. This different distribution patterns and the large number of constitutive heterochromatin subclasses identified in the *P. tullbergi* chromosomes (52 subclasses), suggest that this species has a more derivative karyotype than the other two genomes analyzed, originated by a great number of complex chromosomal rearrangements. The high heterogeneity

of constitutive heterochromatin sequences identified, suggests the coexistence of different DNA satellite families, or variants of these families in these three analyzed genomes.

The *in silico* analysis of LINE-1 sequences (Long Interspersed Elements-1) allowed to establish phylogenetic relationships among species, since they are homoplasy-free characters (Verneau *et al.* 1998, Waters *et al.* 2007). The comparison among LINE-1 sequences from *C. cricetus*, *P. eremicus*, *P. tullbergi* (isolated for the first time in this work), *M. musculus*, *R. norvegicus*, and of 10 more species from the Cricetidae Family (available in the NCBI Nucleotide database), demonstrated that all the sequences are similar to a certain region of ORFII LINE-1 sequence of the index species *M. musculus* and *R. norvegicus*. In this way, it is suggested that this region of the sequence is conserved in the rodent species analyzed, presenting similarity values above 75% among the sequences. The alignment of all the sequences allowed obtaining a dendrogram that relates phylogenetically the analyzed species, specifically it was observed a larger phylogenetic proximity among rodents belonging to the same family.

The physical mapping of *C. cricetus*, *P. eremicus* and *P. tullbergi* LINE-1 sequences, in the respective chromosomes, demonstrated that these sequences are interspersed along all the chromosomes, not presenting any preferential location in the X chromosome. These results do not support the Lyon hypothesis (1998), which suggests the involvement of LINE-1 sequences in the X chromosome inactivation, after observing a preferential location of these sequences in man and mouse X chromosomes. Two hypotheses can thus be drawn to justify the obtained results. It might have happened loss of LINE-1 sequences in the X chromosome of the three species during the evolution course, being this event previously suggested for other rodent species by Casavant *et al.* (2000), although in this case, the loss of these sequences was considered for the whole chromosome complement. Another possible scenario is the existence of different mechanisms of X chromosome inactivation (at least in these rodents), without the participation of LINE-1 sequences, and in this case, the genome wouldn't need to conserve these sequences highly located in the X chromosome, being alternatively observed an undifferentiated distribution by the whole chromosome complement.

Comparative Chromosome Painting using a *R. norvegicus* X chromosome (RNOX) specific probe in chromosome preparations of the three species, revealed three syntenic segments in one arm of *C. cricetus* X chromosome, eight syntenic segments in *P. eremicus* X chromosome and six syntenic segments in the long arm of *P. tullbergi* X chromosome. This analysis also revealed the occurrence of a pericentric inversion during the evolution course of *P. eremicus* X chromosome. The characterization of the constitutive heterochromatin

performed during this work revealed the existence of C-bands to flanking some syntenic segments, discriminated by the paint RNOX in the X chromosome of the three species analyzed. These results seem to suggest the participation of heterochromatin sequences in the chromosome rearrangements that originated these chromosomes, evidenced by the presence of repetitive sequences at the evolutionary breakpoints regions of these species. Moreover, in this work was performed an *in silico* analysis among tandem repeats chromosome distribution and the location of evolutionary breakpoints regions in the X chromosome of the index species *M. musculus*. In this analysis, the chromosome syntenic regions of *M. musculus*, *R. norvegicus* and *H. sapiens* were used for identification of the breakpoints chromosome regions of *M. musculus* X chromosome, and bioinformatic tools that allowed the evaluation of tandem repeats density in this chromosome. Preliminary results demonstrate that the regions presenting high accumulation of tandem repeat sequences correspond to evolutionary breakpoints regions, support the important role of these sequences in the reorganization of genome's architecture along evolution.

The X chromosome of *C. cricetus*, *P. eremicus* and *P. tullbergi* show differences in respect to morphology, amount, location and molecular nature of its heterochromatin, suggesting that they arose through the occurrence of different chromosome rearrangements, as inversions, centromeric transpositions, additions/eliminations of heterochromatin and Robertsonian translocations, as is the case of *C. cricetus* X chromosome, that presents two blocks of constitutive heterochromatin at the (peri)centromeric region. The high number of constitutive heterochromatin subclasses identified in the X chromosome of *P. tullbergi*, in comparison with the other two analyzed species, suggests that the X chromosome of this species is highly rearranged. However, the analysis of the syntenic segments in the X chromosomes with the painting probe RNOX, suggests *P. eremicus* X chromosome as the more rearranged. This apparent disagreement is probably the result of different analyses, namely the identification of heterochromatin subclasses and syntenic segments among the chromosomes of different species, requiring a more detailed investigation to clarify the mechanisms underlying the evolution of these chromosomes.

Future detailed characterization of constitutive heterochromatin sequences, namely satellite DNA sequences, isolated for example by microdissection of chromosome centromeric regions, and the construction of comparative maps for different species of rodents, will certainly contribute to a better understanding of the evolutionary pathways that shaped these genomes and the phylogenetic relationships among species.

ÍNDICE GERAL

Agradecimentos.....	V
Resumo.....	IX
Abstract.....	XIII
Índice Geral	XVI
Índice de Figuras.....	XXI
Índice de Tabelas.....	XXIV
Lista de abreviaturas e símbolos	XXV
Lista de abreviaturas dos nomes das espécies	XXIX
Capítulo I - Objectivos.....	1
Capítulo II - Introdução	4
II. 1- Radiação dos mamíferos	5
II. 1.1- Ordem Rodentia: radiação e biogeografia	6
II. 1.1.1-Superfamília Muroidea	7
I. 1.1.1.1- Família Cricetidae: géneros <i>Cricetus</i> e <i>Peromyscus</i>	8
II. 1.1.1.2- Família Muridae.....	10
II. 1.1.1.2.1- Grupo <i>Praomys</i>	11
II. 2 – Evolução de sequências de heterocromatina constitutiva	12
II. 2.1- Heterocromatina constitutiva.....	12
II. 2.1.1- Origem e evolução dos “arrays” de repetição	13
II. 2.1.2- Funções da heterocromatina constitutiva.....	15
II. 2.2- Caracterização da heterocromatina constitutiva por restrição <i>in situ</i> e bandeamento-C sequencial	16
II. 2.2.1- Restrição <i>in situ</i> e bandeamento-C sequencial em cromossomas de roedores	17

II. 3 – Evolução dos cromossomas sexuais.....	18
II. 3.1- Diferenciação dos cromossomas sexuais.....	18
II. 3.1.1- Degeneração do cromossoma Y: acumulação de mutações e elementos transponíveis	20
II. 3.1.1.1- Degeneração do cromossoma Y por acumulação de mutações	21
II. 3.1.1.2- Degeneração do cromossoma Y por acumulação de elementos transponíveis....	22
II. 3.2- Evolução dos cromossomas sexuais em mamíferos	22
II. 3.2.1- Translocações entre autossomas e cromossomas sexuais em mamíferos	24
II. 3.3- Inactivação do cromossoma X em mamíferos.....	27
 Capítulo III – Material e métodos	 29
III. 1- Cultura de células e preparações cromossómicas	30
III. 2- Restrição <i>in situ</i>	30
III. 2.1- Técnicas de bandeamento.....	30
III. 2.1.1- Bandeamento-G por acção da tripsina com coloração por DAPI (GTD).....	31
Protocolo 1- Bandeamento-G por acção da tripsina com coloração por DAPI (GTD)	31
III. 2.1.2- Bandeamento por restrição <i>in situ</i>	32
Protocolo 2 – Bandeamento por restrição <i>in situ</i> e coloração com DAPI	33
III. 2.1.3- Bandeamento-C por acção de hidróxido de bário com coloração por Iodeto de Propídeo (CBP).....	35
Protocolo 3- Bandeamento-C por acção de hidróxido de bário com coloração por Iodeto de Propídeo (CBP).....	35
III. 3- Isolamento e clonagem de sequências LINE-1 de CCR, PER e PTU	36
III. 3.1- Obtenção de DNA genómico a partir de fibroblastos.....	36
Protocolo 4 – Extracção de DNA genómico a partir de fibroblastos em cultura.....	37
III. 3.2- Electroforese em gel de agarose.....	37
Protocolo 5- Electroforese em gel de agarose a 1,2 %	38
III. 3.3- Determinação da concentração e do grau de pureza do DNA genómico extraído	38

III. 3.4- Reacção de PCR.....	39
Protocolo 6- Isolamento de sequências LINE-1 a partir de DNA genómico de CCR, PER e PTU por reacção PCR.....	39
III. 3.5- Purificação de sequências LINE-1 de CCR, PER e PTU	40
Protocolo 7- Purificação de fragmentos de DNA a partir de géis de agarose.....	40
III. 3.6- Clonagem de sequências LINE-1 de CCR, PER e PTU no plasmídeo pCR 4-TOPO	41
Protocolo 8 – Clonagem, no plasmídeo pCR 4-TOPO, de sequências LINE -1 purificados a partir de gel de agarose	42
III. 3.7- Extracção de DNA plasmídico e isolamento da sequência anteriormente clonada	44
Protocolo 9- Purificação de DNA plasmídico	44
III. 3.8- Sequenciação e análise de sequências LINE-1 de CCR, PER e PTU	44
III. 4- Preparação de sondas para hibridação <i>in situ</i> fluorescente (FISH): LINE-1 de CCR, PER e PTU e “paint” do cromossoma X de <i>Rattus norvegicus</i>	45
III. 4.1- Marcação de sondas.....	45
Protocolo 10- Marcação de sondas de sequências LINE-1 de CCR, PER e PTU por PCR .	46
Protocolo 11- Amplificação da sonda de “painting” RNOX por DOP-PCR.....	47
Protocolo 12- Marcação da sonda de “painting” RNOX por DOP-PCR.....	48
Protocolo 13- Precipitação das sondas de sequências LINE-1 de CCR, PER e PTU.....	49
Protocolo 14- Precipitação da sonda de “painting” RNOX	49
III. 5- Hibridação <i>in situ</i> fluorescente de sequências LINE-1 de CCR, PER e PTU e da sonda de “painting” RNOX, em preparações cromossómicas de CCR, PER e PTU	50
Protocolo 15 – Hibridação <i>in situ</i> com sondas de sequências LINE-1 de CCR, PER e PTU....	50
III. 5.1- “Chromosome Painting”	52
Protocolo 16 – Hibridação <i>in situ</i> com a sonda de “painting” RNOX em preparações cromossómicas de CCR, PER e PTU	52
III. 6- Microscopia e análise de imagem	52

III.7 – Distribuição de sequências repetitivas em tandem no cromossoma X de <i>Mus musculus</i> e sua correlação com a localização de regiões de “breakpoints” evolutivos.....	53
---	-----------

Capítulo IV – Resultados e Discussão de Resultados	55
---	-----------

IV. 1 – Resultados	56
---------------------------------	-----------

IV. 1.1 – Descrição dos cariótipos de <i>Cricetus Cricetus</i>, <i>Peromyscus eremicus</i> e <i>Praomys tullbergi</i>.....	56
---	-----------

IV. 1.2 – Caracterização da heterocromatina constitutiva nos cromossomas de <i>Cricetus cricetus</i>, <i>Peromyscus eremicus</i> e <i>Praomys tullbergi</i>.....	58
---	-----------

IV. 1.2.1- Caracterização da heterocromatina constitutiva dos cromossomas de <i>Cricetus cricetus</i>	61
---	----

IV. 1.2.2- Caracterização da heterocromatina constitutiva dos cromossomas de <i>Peromyscus eremicus</i>	64
---	----

IV. 1.2.3- Caracterização da heterocromatina constitutiva dos cromossomas de <i>Praomys tullbergi</i>	70
---	----

IV. 1.3 – Análise molecular e citogenética de sequências LINE-1 de <i>Cricetus cricetus</i>, <i>Peromyscus eremicus</i> e <i>Praomys tullbergi</i>.....	74
--	-----------

IV. 1.3.1- Análise molecular das sequências LINE-1 de <i>Cricetus cricetus</i> , <i>Peromyscus eremicus</i> e <i>Praomys tullbergi</i>	75
--	----

IV. 1.3.2- Análise citogenética das sequências LINE-1 de <i>Cricetus cricetus</i> , <i>Peromyscus eremicus</i> e <i>Praomys tullbergi</i>	85
---	----

IV. 1.4- Análise cromossômica comparativa dos cromossomas X de <i>Cricetus cricetus</i>, <i>Peromyscus eremicus</i> e <i>Praomys tullbergi</i>.....	87
--	-----------

IV. 1.5- Distribuição de sequências repetitivas em tandem no cromossoma X de <i>Mus musculus</i> e sua correlação com a localização de regiões de “breakpoints” evolutivos.....	91
--	-----------

IV. 2 – Discussão de Resultados.....	93
---	-----------

IV. 2.1- Análise da heterocromatina constitutiva dos cromossomas de <i>Cricetus cricetus</i>, <i>Peromyscus eremicus</i> e <i>Praomys tullbergi</i>.....	93
---	-----------

IV. 2.1.1- Comparação da quantidade, localização e natureza molecular de sequências de heterocromatina constitutiva entre as três espécies estudadas	94
--	----

IV. 2.2- Análise das relações filogenéticas de Cricetidae e Muridae inferidas pela análise de sequências LINE-1	96
IV. 2.3- Considerações sobre a evolução do cromossoma X de <i>Cricetus cricetus</i>, <i>Peromyscus eremicus</i> e <i>Praomys tullbergi</i>.....	97
Capítulo V – Conclusões e Perspectivas Futuras	101
Capítulo VI – Referências Bibliográficas	104

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Radiação dos mamíferos na Época Paleocénica da Europa e América do Norte.	6
Figura 2- Árvore filogenética da superfamília Muroidea.	8
Figura 3- <i>C. cricetus</i>	9
Figura 4- <i>P. eremicus</i>	10
Figura 5- <i>P. tullbergi</i>	11
Figura 6- Esquematização de alguns mecanismos envolvidos na origem e/ou dinâmica dos “arrays” de repetição.	14
Figura 7- Sequência hipotética de acontecimentos que iniciaram a diferenciação dos cromossomas sexuais.	19
Figura 8- Processo cíclico de degeneração do cromossoma Y.	20
Figura 9- Mecanismo de “Muller’s Ratchet”	21
Figura 10- Evolução de cromossomas sexuais.	23
Figura 11- Hipótese de “addition – attrition” para a evolução dos cromossomas sexuais de mamíferos	25
Figura 12- Estrutura do cromossoma X de mamíferos placentários, marsupiais e monotrematas.	27
Figura 13- Mapa do vector pCR 4-TOPO	42
Figura 14- Cariótipo de <i>C. cricetus</i>	56
Figura 15- Cariótipo de <i>P. eremicus</i>	57
Figura 16- Cariótipo de <i>P. tullbergi</i>	58
Figura 17- Imagem representativa de preparações cromossómicas de <i>C. cricetus</i> , <i>P. eremicus</i> e <i>P. tullbergi</i> submetidas à acção de endonucleases de restrição.	60
Figura 18 – Painel resumo da restrição <i>in situ</i> dos cromossomas de <i>C. cricetus</i> e bandeamento-C sequencial.	62

Figura 19 – Painel resumo da restrição <i>in situ</i> dos cromossomas de <i>P. eremicus</i> e bandeamento-C sequencial.	67
Figura 20- Painel resumo da restrição <i>in situ</i> dos cromossomas de <i>P. tullbergi</i> e bandeamento-C sequencial	72
Figura 21 – Regiões similaridade entre a sequência LINE-1 de <i>C. cricetus</i> (CCR L1) com o genoma de <i>M. musculus</i> (a) e <i>R. norvegicus</i> (b) utilizando uma ferramenta bioinformática “Ensembl Multi Blast View”.	76
Figura 22 – Regiões similaridade entre a sequência LINE-1 de <i>P. eremicus</i> (PER L1) com o genoma de <i>M. musculus</i> (a) e <i>R. norvegicus</i> (b) utilizando uma ferramenta bioinformática “Ensembl Multi Blast View”	77
Figura 23 – Regiões similaridade entre a sequência LINE-1 de <i>P. tullbergi</i> (PTU L1) com o genoma de <i>M. musculus</i> (a) e <i>R. norvegicus</i> (b) utilizando uma ferramenta bioinformática “Ensembl Multi Blast View”.	78
Figura 24 – Alinhamentos entre as sequências LINE-1 de <i>C. cricetus</i> (CCR L1), <i>P. eremicus</i> (PER L1) e <i>P. tullbergi</i> (PTU L1) com as sequências MMU L1 completa e RNO ORFII L1	79
Figura 25 – Representação esquemática de todos os alinhamentos realizados tendo como comparação a sequência completa LINE-1 de <i>M. musculus</i> (MMU L1 completa).....	82
Figura 26 – Representação esquemática de todos os alinhamentos realizados tendo como comparação a sequência completa da ORFII L1 de <i>R. norvegicus</i> (RNO ORFII L1).....	83
Figura 27 – “Dotplot” onde se comparam as sequências de um fragmento da ORFII LINE-1 de <i>C. cricetus</i> (CCR L1), <i>P. eremicus</i> (PER L1) e <i>P. tullbergi</i> (PTU L1) com a sequência completa LINE-1 de <i>M. musculus</i> (MMU L1 completa).....	84
Figura 28- “Dotplot” onde se comparam as sequências de um fragmento da ORFII LINE-1 de <i>C. cricetus</i> (CCR L1), <i>P. eremicus</i> (PER L1) e <i>P. tullbergi</i> (PTU L1) com a sequência completa da ORFII LINE-1 de <i>R. norvegicus</i> (RNO ORFII L1).....	84
Figura 29 – Dendograma que apresenta as relações filogenéticas entre diferentes espécies de roedores (Cricetidae e Muridae)..	85
Figura 30 – Mapeamento físico de sequências LINE-1 de <i>C. cricetus</i> (a), <i>P. eremicus</i> (b) e <i>P. tullbergi</i> (c) nos respectivos cromossomas..	86

Figura 31 – Hibridação <i>in situ</i> fluorescente (FISH) de uma sonda de “painting” do cromossoma X de <i>R. norvegicus</i> em cromossomas de <i>C. cricetus</i> (a), <i>P. eremicus</i> (b) e <i>P. tullbergi</i> (c)..	88
Figura 32 – Hibridação <i>in situ</i> fluorescente (FISH) de uma sonda de “painting” do cromossoma X de <i>R. norvegicus</i> (RNOX) em cromossomas de <i>P. eremicus</i> e bandeamento-C sequencial..	89
Figura 33 – Ideogramas dos cromossomas X de <i>C. cricetus</i> (CCR), <i>P. eremicus</i> (PER) e <i>P. tullbergi</i> (PTU) apresentando diferentes padrões de bandeamento e hibridação realizados neste trabalho..	90
Figura 34 – Distribuição de sequências repetitivas em tandem ao longo do cromossoma X de <i>M. musculus</i> (MMUX) e sua colocação com regiões de “breakpoints” evolutivos relativamente à sintenia com o cromossoma X de <i>H. sapiens</i> (HSA) e <i>R. norvegicus</i> (RNO)..	92

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Sequências de reconhecimento para clivagem das endonucleases de restrição utilizadas na metodologia de restrição <i>in situ</i>	33
Tabela 2 – Preparação da mistura de reacção enzimática	34
Tabela 3 – Reacção de PCR para o isolamento de sequências LINE-1 a partir de DNA genómico de CCR, PER e PTU	39
Tabela 4 – Programa de PCR (30 ciclos) para isolamento de sequências LINE-1 a partir de DNA genómico de CCR, PER E PTU	40
Tabela 5 – Reacção de ligação dos produtos amplificados por PCR ao vector pCR 4-TOPO	43
Tabela 6 – Reacção de PCR para marcação de sondas de sequências LINE-1 de CCR, PER e PTU	46
Tabela 7 – Programa de PCR (30 ciclos) para marcação de sondas de sequências LINE-1 de CCR, PER e PTU	47
Tabela 8 – Reacção de DOP-PCR para obtenção da sonda de “painting” RNO X	47
Tabela 9 – Programa de DOP-PCR (25 ciclos) para obtenção e marcação da sonda de “painting” RNO X	48
Tabela 10 – Reacção de PCR para marcação da sonda de “painting” RNOX	48
Tabela 11 – Preparação e precipitação da sonda de “painting” RNOX	49
Tabela 12 – Características dos filtros de fluorescência e respectivos fluorocromos	53
Tabela 13 – Avaliação da acção do painel de sete REs utilizadas para caracterizar a HC em cromossomas de <i>C. cricetus</i>	63
Tabela 14 – Avaliação da acção do painel de sete REs utilizadas para caracterizar a HC em cromossomas de <i>P. eremicus</i>	68
Tabela 15 – Avaliação da acção do painel de sete REs utilizadas para caracterizar as sequências de HC em cromossomas de <i>P. tullbergi</i>	73
Tabela 16 – Avaliação da percentagem de similaridade entre as sequências CCR L1, PER L1, PTU L1, MMU L1 completa e RNO ORFII L1	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

~ - Aproximadamente

% - Percentagem

SSC - “Saline Sodium Citrate”

4xT – “Detergent Wash Solution”

A – Absorvância

ADP – Solução alcalina (Fujifilm Life Science)

AT – Adenina e Timina

2n - número diploide

Ba(OH)₂ – Hidróxido de Bário

bp – “base pair” (pares de base)

BSA – “Bovine Serum Albumin”

C – Bandas-C

CG – Citosina e Guanina

CBP – Bandeamento-C por acção de hidróxido de bário com coloração por Iodeto de propídeo

CEN - Centrómero

c.f – “Confer” (comparar com)

°C – Graus Celsius

cm, mm, µm – centímetro, milímetro, micrómetro

CMA₃ – Cromomicina A₃

DAPI - 4' - 6 - “diamidino - 2 - phenylindole”

DNA – Ácido Desoxirribonucleíco

DOP – PCR – “Degenerated Oligonucleotide Primed – PCR”

DTT – “Dithiothreitol solution”

dUTP – desoxiuridina trifosfato

EDP – A – RNase A (Fujifilm Life Science)

EDP – B – RNase B (Fujifilm Life Science)

EDT – Proteínase K (Fujifilm Life Science)

EDTA – “Ethylene diamine tetracetate” (etileno diamino tetracetato)

e.g. – *exempli gratia* (por exemplo)

EtBr – “Ethidium bromide” (Brometo de Etídeo)

FISH – “Fluorescent in situ hybridization”

G – Bandas-G

GTD – Bandas-G obtidas com tripsina e coradas com DAPI

CpG – “CpG islands”

g, mg, µg, ng – grama, miligrama, micrograma, nanograma

HCl – Ácido clorídrico

HBO – Lâmpada de mercúrio

HBSS – “Hank’s Balanced Salt Solution”

HC – Heterocromatina constitutiva

INV Peric – Inversão pericêntrica

Kb – Kilobase

LB – Meio de Cultura Luria-Bertani

LDT – Tampão de lise (Fujifilm Life Science)

LINE -1 – “Long Interspersed Nuclear Elements-1”

L1 - “Long Interspersed Nuclear Elements-1”

M13 – “Primers” universais específicos

mL, µL – mililitro, microlitro

Ma – Milhões de anos

M, mM – Molar, milimolar

Mb – Megabase

mRNA – RNA mensageiro

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

MNHN – “Muséum National d’Histoire Naturelle”

NaOH – Hidróxido de Sódio

NaI – Iodeto de Sódio

(NH₄)₂SO₄ – Sulfato de Amônio

NCBI – “National Center for Biotechnology Information”

NDP – Tampão de neutralização (Fujifilm Life Science)

nm – Nanómetro

ORF – “Open Reading Frame”

ORFII L1- ORF II da sequência LINE-1

PAR – Regiões pseudoautosomais

PBS – “Phosphate Buffered Saline”

PCR – “Polymerase Chain Reaction” (Reacção em cadeia da polimerase)

PI – “Propidium Iodide” (Iodeto de propídeo)

Q – Bandas-Q

R – Bandas-R

RNA – Ácido ribonucleico

RNOX – Cromossoma X de *Rattus norvegicus*

rDNA – DNA ribossómico

RE – “Restriction Endonuclease” (Endonuclease de restrição)

RNase – ribonuclease

rpm – Rotações por minuto

S – Coeficiente de sedimentação

SOC – “Super Optimal Broth”

TBE – Tris Borate EDTA

U – Unidades de enzima activa

UTAD - Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

UTR – “Untranslated region”

UV – Ultravioleta

V – Voltes

v/v – Volume por volume

W – Watts

WPC – “Whole Chromosome Painting”

XAR – Regiões adicionadas ao cromossoma X

XCR – Regiões conservadas do cromossoma X

YAR - Regiões adicionadas ao cromossoma Y

YCR - Regiões conservadas do cromossoma Y

LISTA DE ABREVIATURAS DOS NOMES DAS ESPÉCIES

CCR – *Cricetus cricetus*

MMU – *Mus musculus*

NSQ – *Nectomys squamipes*

MAR – *Microtus arvalis*

MCA – *Microtus cabreræ*

PCA – *Peromyscus californicus*

PER – *Peromyscus eremicus*

PMA – *Peromyscus maniculatus*

PLE – *Peromyscus leucopus*

PNU – *Peromyscus nudipes*

PTU – *Praomys tulbergi*

RFU – *Reithodontomys fluvescens*

RNI – *Rhipidomys nitela*

RNO – *Rattus norvergicus*

SHI – *Sigmodon hispidus*

Capítulo I

Objetivos

OBJECTIVOS

A Ordem Rodentia constitui a Ordem de mamíferos com o maior número de espécies, encontrando-se estes animais bem adaptados a uma grande variedade de ambientes, podendo desta forma ser observados em todo o mundo (Feldhamer *et al.* 2003). No entanto, este elevado sucesso evolutivo nem sempre foi acompanhado por alterações morfológicas significativas, dificultando a sistemática desta Ordem (Veyrunes *et al.* 2004). O esclarecimento das relações filogenéticas dentro da Ordem Rodentia é de elevada importância para estudos de fisiologia, imunologia e oncologia, já que a investigação biomédica utiliza organismos modelos pertencentes à superfamília Muroidea, como o rato e a ratazana, permitindo este esclarecimento aumentar as espécies disponíveis para futuras investigações. Estudos sobre a evolução cromossómica em roedores, como os realizados neste trabalho, poderão contribuir para a resolução da filogenia desta ordem, ao permitirem estudar rearranjos cromossómicos que podem estar na base da especiação.

Em comparação com os humanos e outros mamíferos, os genomas de roedores sofreram uma rápida evolução cromossómica, durante a qual ocorreram complexos rearranjos cromossómicos (Veyrunes *et al.* 2007), sendo aceite que a presença de heterocromatina constitutiva (HC) pode facilitar a ocorrência destes rearranjos (Yunis e Yasmineh 1971, Peacock *et al.* 1982, John 1988, Chaves *et al.* 2004). Desta forma, um dos objectivos deste trabalho foi a caracterização da HC dos genomas de *C. cricetus*, *P. eremicus* e *P. tullbergi*. Os cromossomas destas espécies foram submetidos a restrição *in situ* e bandeamento-C sequencial (com um painel de sete endonucleases de restrição), permitindo esta metodologia a caracterização da HC em termos da sua localização, detecção de diferentes subclasses e revelação da sua composição molecular.

As sequências LINE-1 (“Long Interspersed Nuclear Elements-1”) são consideradas marcadores filogenéticos que em muito podem elucidar acerca das relações filogenéticas entre espécies (Waters *et al.* 2007). Desta forma, e não estando ainda caracterizadas estas sequências no genoma das três espécies em análise, isolaram-se as sequências LINE-1 a partir do DNA genómico de cada uma das espécies, e compararam-se estas sequências com outras sequências LINE-1 de roedores disponíveis na base de dados “NCBI Nucleotide”. Lyon (1998), propôs pela primeira vez o envolvimento das sequências LINE-1 na inactivação do cromossoma X, ao observar uma localização preferencial destas sequências nos cromossomas X do Homem e rato. Com o objectivo de contribuir para o esclarecimento do eventual envolvimento das sequências

LINE-1 no mecanismo de inactivação do cromossoma X, analisou-se a distribuição das sequências LINE-1 de *C. cricetus*, *P. eremicus* e *P. tullbergi* nos respectivos cromossomas.

Em mamíferos placentários, considera-se que os autossomas e os cromossomas sexuais evoluíram de forma independente, no que diz respeito ao tempo e modo (Rubtsov *et al.* 2002, Khil e Camerini - Otero 2005). Em roedores tendo vindo a ser descrito que o cromossoma X evoluiu pela ocorrência de complexos rearranjos cromossómicos (Veyrunes *et al.* 2007). Com o objectivo de caracterizar o cromossoma X das três espécies de roedores estudadas neste trabalho, hibridou-se uma sonda de “painting” representativa do cromossoma X de *Rattus norvegicus* (RNOX), em preparações cromossómicas de *C. cricetus*, *P. eremicus* e *P. tullbergi*, para identificar com exactidão o cromossoma X de cada uma das espécies estudadas e as regiões conservadas entre estes cromossomas.

Neste trabalho pretendeu-se também relacionar directamente e de uma forma precisa a localização cromossómica de sequências repetitivas em tandem e a localização de regiões de “breakpoints” evolutivos, através de análise *in silico*.

Capítulo II

Introdução

INTRODUÇÃO

II. 1- Radiação dos mamíferos

No decorrer da Era Mesozóica [248 - 65 Milhões de anos (Ma)] até ao início da Era Cenozóica (~65 Ma), os mamíferos eram relativamente raros e constituíam uma parte insignificante da fauna, em comparação com os répteis. Durante cerca de 140 Ma, mamíferos e dinossauros partilharam o mesmo habitat até à extinção dos últimos (Benton 1997). De acordo com registos fósseis, as diferentes linhagens de mamíferos existentes actualmente foram originadas após a radiação dos mamíferos durante o início da Era Cenozóica. Esta radiação teve origem em dois grandes eventos: a extinção dos dinossauros no final do Período Cretácio e a separação da Pangea. Desde então, nos últimos 65 Ma, os mamíferos tornaram-se os vertebrados terrestres dominantes (Feldhamer *et al.* 2003).

Existem actualmente três grandes linhagens de mamíferos: os “Eutheria” (mamíferos placentários), os “Metatheria” (marsupiais) e os “Prototheria” (monotrematas). As linhagens “Eutheria” e “Metatheria” formam a subclasse “Theria” (Belov *et al.* 2002). Dados moleculares sugerem que a subclasse “Theria” divergiu da subclasse “Prototheria” há 210 Ma (Woodburne *et al.* 2003). Segundo alguns autores, a divergência entre “Eutheria” e “Metatheria” terá ocorrido há cerca de 130 Ma, no entanto o fóssil mais antigo dos “Eutheria” – *Eomaia scansoria*, encontrado na China, foi recentemente datado de há 125 Ma (Ji *et al.* 2002).

Várias Ordens actuais de mamíferos placentários tiveram origem na Época Paleocénica (~65 a 56 Ma): Insectívora, Carnívora moderna, Chiroptera, Primata, Peryssodactila e Rodentia (cf. figura 1) (Benton 1997).

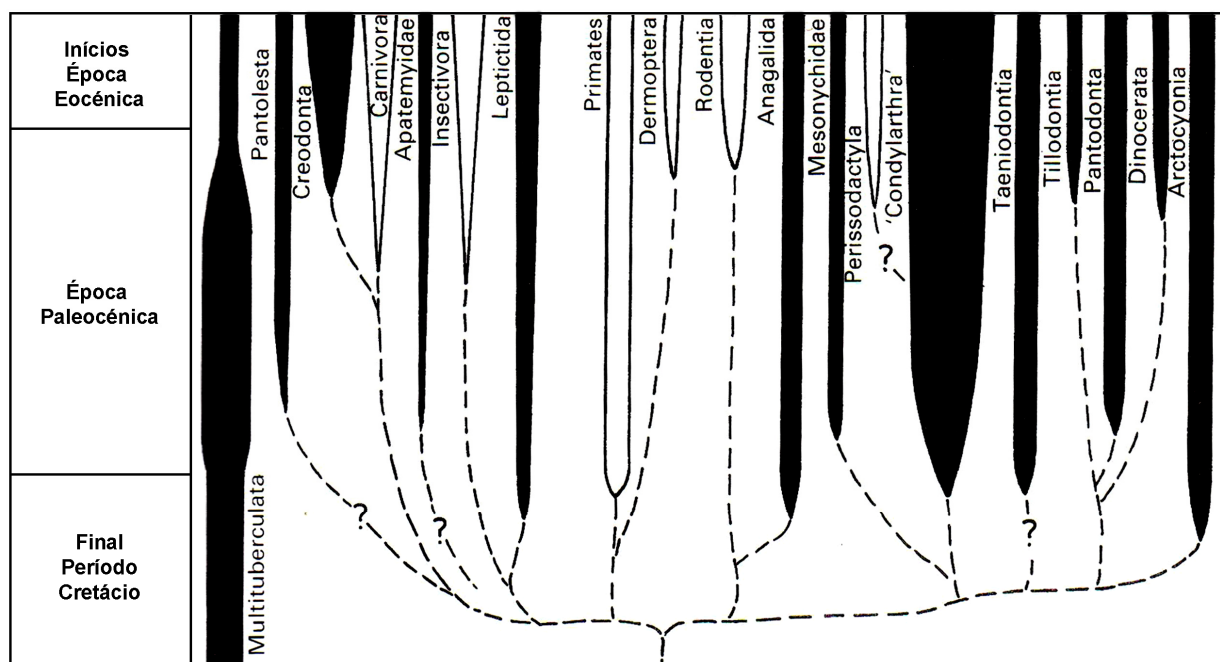


Figura 1- Radiação dos mamíferos na Época Paleocénica da Europa e América do Norte. Esta radiação evidencia duas fases de acordo com registos fósseis, uma no final do Período Cretácio e início da Época Paleocénica (~ 65 Ma) e outra o final da Época Paleocénica (~56 Ma). Os grupos já extintos estão representados a preto. Adaptado de Benton (1997).

II. 1.1- Ordem Rodentia: radiação e biogeografia

Os roedores (Ordem Rodentia) caracterizam-se morfologicamente por possuírem um único par de incisivos superiores e inferiores, que crescem durante toda a sua vida, encontrando-se bem adaptados a uma grande variedade de ambientes, podendo desta forma ser observados em todo o mundo (Feldhamer *et al.* 2003). A Ordem Rodentia constitui a Ordem de mamíferos com o maior número de espécies, existindo no entanto alguma discordância sobre o número total de espécies que a constituem. Benton (1997) referiu que a Ordem Rodentia era constituída por 1800 espécies, ou seja, cerca de 40% de todas as espécies de mamíferos hoje existentes. Por sua vez, Huchon *et al.* (2002) consideraram que esta Ordem era constituída por aproximadamente 2050 espécies, divididas em 28 famílias. Em 2003, Adkins afirmou que das cerca de 4200 espécies de mamíferos existentes, aproximadamente 1750 são roedores (42%). Feldhamer *et al.* (2003) referiram que a Ordem Rodentia era constituída por 2016 espécies, correspondendo a 43% do total das espécies de mamíferos, estando estas distribuídas por 28 famílias. Apesar desta discordância, todos os autores estão de acordo quanto às dificuldades relacionadas com a determinação de datas de radiação, das relações entre famílias e da monofilia desta Ordem.

O primeiro roedor conhecido, *Paramys atavus*, viveu no final da Época Paleocénica e durante a Época Eocénica (~56 - 37 Ma) na América do Norte e Eurásia, considerando-se o ancestral de várias famílias actuais de roedores (Benton 1997). De acordo com a dentição e estrutura muscular da mandíbula, o castor das montanhas (*Aplodontia rufa*), pertencente à família Aplodontidae, é o seu descendente vivo mais próximo (Feldhamer *et al.* 2003).

Evidências fósseis indicam que a radiação dos roedores deverá ter ocorrido há aproximadamente 55 Ma (Hartenberger 1998), no entanto dados moleculares sugeriram que a radiação deste grupo de animais ocorreu mais cedo, durante o Período Cretácio (~125 - 85 Ma) (Janke *et al.* 1997, Kumar e Hedges 1998, Cao *et al.* 2000). Em 2002, Huchon *et al.* estimaram, através de dados moleculares (comparação de sequências de três genes nucleares), que a radiação dos roedores deverá ter ocorrido há aproximadamente 55 Ma, na transição entre as Época Paleocénica e Eocénica, o que permitiu reconciliar as informações obtidas por estes dois tipos de dados.

Vários dados paleontológicos e moleculares suportam a monofilia da Ordem Rodentia, considerando-se que todos os membros desta Ordem descendem do mesmo ancestral, sendo estes os seus únicos descendentes (Hervé 1997). Alguns autores (Graur *et al.* 1991 e D' Erchia *et al.* 1996) no entanto, com base na análise de sequências nucleares e mitocondriais, sugeriram a parafilia para esta Ordem, onde se considera que nem todos os descendentes do ancestral pertencem à Ordem Rodentia. Trabalhos mais recentes apoiam a origem monofilética dos roedores (e.g. Michaux *et al.* 2001, Huchon *et al.* 2002).

Actualmente a filogenia da Ordem Rodentia ainda está longe de ser completamente compreendida. Neste trabalho seguiu-se a classificação disponível nas bases de dados “NCBI Taxonomy” (www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez) e “Tree of Life Web Project” (www.tolweb.org/tree/). Estas bases de dados compilam cuidadosamente dados de trabalhos recentes, baseados em informações obtidas a partir da análise de registos fósseis e dados moleculares, sendo frequentemente actualizadas.

II. 1.1.1-Superfamília Muroidea

A consulta das bases de dados anteriormente referidas (“NCBI Taxonomy” e “Tree of Life Project”) indica que as espécies estudadas neste trabalho (*Cricetus cricetus*, *Peromyscus eremicus* e *Praomys tullbergi*) pertencem a uma mesma superfamília: superfamília Muroidea (cf. figura 2). Segundo Steppan *et al.* (2004) esta é a maior superfamília de mamíferos existente, contendo cerca de um terço de todas as espécies de mamíferos conhecidas,

revelando-se muito difícil a análise da sua filogenia (como já foi referido). Estes mesmos autores sugerem que a esta superfamília pertence a clade Eumuroidea (ancestral comum mais recente de algumas subfamílias desta Ordem) e a família Spalacidae (cf. figura 2).

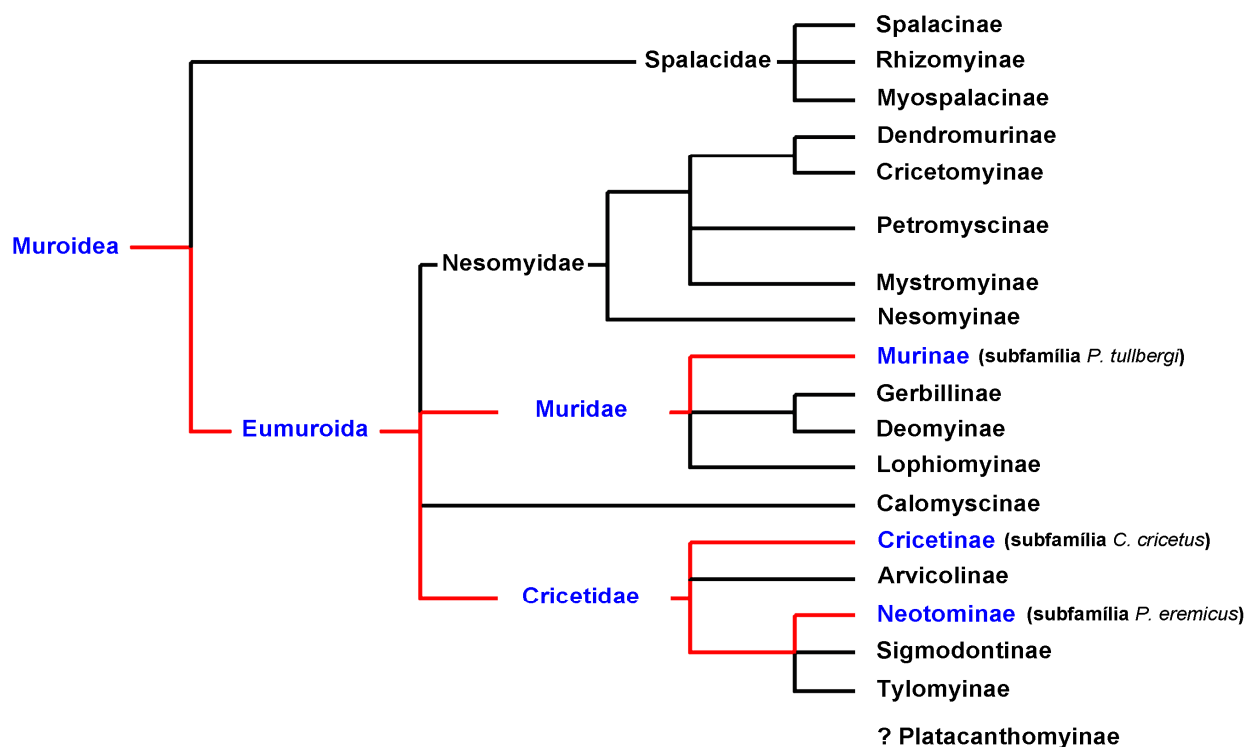


Figura 2- Árvore filogenética da superfamília Muroidea. Esta árvore resulta principalmente da compilação de dados dos trabalhos de Steppan *et al.* (2004), Jansa e Weksler (2004), Michaux *et al.* (2001), Robinson *et al.* (1997) e Michaux e Catzefflis (2000). Adaptado de Tree of life Web Project.

Neste trabalho serão apenas descritas as famílias a que pertencem as espécies estudadas, família Cricetidae (*P. eremicus* e *C. cricetus*) e a família Muridae (*P. tullbergi*), segundo a classificação disponível no “NCBI Taxonomy” e “Tree of Life Web Project”.

I. 1.1.1.1- Família Cricetidae: géneros *Cricetus* e *Peromyscus*

Segundo registos fósseis estima-se que a família Cricetidae teve origem nos inícios ou meados da Época Eocénica (~58 a 47 Ma) (Hartenberger 1998), sendo considerada por muitos paleontólogos como ancestral à família Muridae (Steppan *et al.* 2004). A determinação das relações filogenéticas entre as espécies pertencentes a esta família tem-se revelado bastante difícil (Steppan *et al.* 2005). A partir da consulta das bases de dados anteriormente referidas (“NCBI Taxonomy” e “Tree of Life Web Project”) e restringindo a análise apenas às espécies alvo em estudo neste trabalho, considera-se que a esta família pertençam as subfamílias

Cricetinae e Neotominae, nas quais se incluem os géneros *Cricetus* e *Peromyscus*, respectivamente.

Na subfamília Cricetinae podem ser encontrados os hamsters, pequenos roedores que originalmente viveram em estepes naturais ou semi-naturais da Eurásia (Nechay 2000). Segundo Romanenko *et al.* (2007) estima-se que a esta subfamília pertençam 7 géneros e 20 espécies. Existem registos fósseis de um grande número de espécies da subfamília Cricetinae que datam dos meados e finais da Época Miocénica (12 a 5 Ma) da Eurásia (McKenna e Bell 1997). Neumann *et al.* (2006), com base em dados moleculares (comparação de sequências parciais de dois genes mitocondriais e um gene nuclear), consideraram que a maioria das espécies Cricetinae teve origem nos finais da Época Miocénica (12 a 5 Ma), podendo esta origem estar relacionada com as alterações climáticas e tectónicas que ocorreram na Eurásia, durante este período de tempo.

O género *Cricetus* contém uma única espécie *C. cricetus*, vulgarmente designada por hamster comum (cf. figura 3) (Nechay 2000). Estes animais podem ser encontrados em regiões da Eurásia, desde a Bélgica até à Sibéria, compreendendo o seu habitat natural regiões de terrenos aráveis, estepes e margens de rios (Nowak 1992).



Figura 3- *C. cricetus*. Espécie descrita pela primeira vez por Linneaus em 1758. Imagem disponível em <http://www.rhein-main-deponie.de/feldhamster.html>

De acordo com a informação de registos fósseis encontrados na América do Norte, sugeriu-se que os Neotominae descendem de roedores do género *Copemys*, que viveram durante a Época Miocénica há aproximadamente 16 - 9 Ma (Baskin 1989). Os roedores desta subfamília habitam predominantemente regiões desérticas do sul da América do Norte, considerando-se que o seu centro de distribuição e abundância reside no México, estendendo-se alguns géneros para regiões a norte da América do Sul (Engel *et al.* 1998). A esta subfamília pertence o género *Peromyscus* (“NCBI Taxonomy” e Tree of Life Web Project”), existindo alguma dificuldade em compreender as relações filogenéticas entre as espécies pertencentes a

este género (Engel *et al.* 1998, Riddle *et al.* 2000). Do género *Peromyscus* faz parte a espécie *P. eremicus*, que se distribui por regiões desérticas da América do Norte (Riddle *et al.* 2000) (cf. figura 4).

Figura 4- *P. eremicus*. Espécie descrita pela primeira vez por Baird em 1958. Imagem disponível em <http://www.biolib.cz/cz/gallery/dir683>



II. 1.1.1.2- Família Muridae

Os roedores da família Muridae são o grupo mais diverso de mamíferos, estimando-se que nele estejam contidas, pelo menos, 1326 espécies distribuídas por mais de 281 géneros, sendo os géneros *Mus* e *Rattus* (ratos e ratazanas) os mais vulgarmente conhecidos (Musser e Carleton 2005). Tal como acontece para a família Cricetidae, a sistemática evolutiva desta família tem sido muito difícil de delinear e apesar dos diversos estudos realizados nesta área, várias incertezas têm persistido (Martin *et al.* 2000, Michaux *et al.* 2001, Adkins 2003, Steppan *et al.* 2004, Steppan *et al.* 2005). Dados paleontológicos sugerem que os Muridae tiveram origem na Época Eocénica (~54 - 37 Ma) e a maior parte da sua radiação ocorreu na Época Pleistocénica (~1.8 - 0.01 Ma) (Benton 1997).

Considera-se que a espécie *P. tullbergi* pertence à subfamília Murinae, da qual também fazem parte as espécies *Mus musculus* e o *Rattus norvegicus* (muito utilizadas em laboratório) (“NCBI Taxonomy” e “Tree of Life Web Project”). De acordo com os registos fósseis, considera-se que os Murinae tiveram origem no Sudeste Asiático durante a Época Miocénica (~24 a 5 Ma) e depois se expandiram por todo o Velho Mundo (Ásia, Europa e África) (Jacobs 1978). Denys e Jaeger (1986), usando o mesmo tipo de dados, sugeriram que a chegada destes roedores à África subsariana tenha ocorrido há aproximadamente 5 Ma (fronteira entre as Épocas Miocénica e Pliocénica). Actualmente, neste continente, existem pelo menos dois grupos de roedores pertencentes a esta subfamília: o grupo *Praomys* (ao qual pertence uma das espécies em estudo neste trabalho) e o grupo *Arvicanthine* (Steppan *et al.* 2005).

II. 1.1.1.2.1- Grupo *Praomys*

Até recentemente, devido a dificuldades associadas à diferenciação morfológica dos roedores deste grupo, incluíam-se no género *Praomys* espécies que se consideram pertencentes aos géneros *Mastomys*, *Hylomyscus* e *Myomys*. Assim, embora estas espécies pertençam a diferentes géneros, como apresentam grandes similaridades morfológicas são incluídas no mesmo grupo (grupo *Praomys*) (Singleton *et al.* 2003), o que justifica este tipo de classificação pouco convencional (grupo). Segundo registos fósseis, considera-se que as espécies do grupo *Praomys* descendem dos roedores do género *Progonomys*, que viveram no Sudeste Asiático durante a época Miocénica (Jacobs 1978). Actualmente incluem-se neste grupo cerca de 40 espécies, que se distribuem por 8 géneros, sendo considerado um dos mais diversos e abundantes grupos de roedores do Velho Mundo, que colonizaram vários biótipos em África e também algumas regiões da Península Arábica (Nicolas *et al.* 2005). Lecompte *et al.* (2005) sugeriram, de acordo com dados morfológicos e moleculares, que a radiação do grupo *Praomys* terá ocorrido há cerca de 7 - 9 Ma, durante a Época Miocénica. Estes mesmos autores consideram também a monofilia para este grupo, que já tinha sido anteriormente sugerida por outros autores (Lecompte *et al.* 2002, Denys *et al.* 2003), propondo a parafilia para alguns géneros nele contidos, como por exemplo o género *Praomys*.

É ainda pouco claro o número total de espécies que contém o género *Praomys* (Lecompte *et al.* 2005), no entanto, nele está contida a espécie *P. tullbergi* (“NCBI Taxonomy” e “Tree of Life Web Project”), endémica do oeste de África. Nicolas *et al.* (2005), de acordo com dados craniométricos e moleculares (sequência do gene 16S rDNA), considerou que esta espécie, tal como as restantes espécies do género *Praomys*, tenha tido origem durante a rápida radiação adaptativa que teve lugar na Época Pliocénica (~5 - 2 Ma), como consequência de alterações climáticas em África. Estes mesmos autores, sugeriram também a existência de dois complexos de espécies no género *Praomys*: *jacksoni* e *tullbergi*, pertencendo a este último a espécie *Praomys tullbergi* (cf. figura 5).



Figura 5- *P. tullbergi*. Espécie descrita pela primeira vez por Thomas em 1894. Imagem disponível em <http://ib.berkeley.edu/includes/show-image.php?id=121&original>

II. 2 – Evolução de sequências de heterocromatina constitutiva

Em 1928, Heitz considerou que sequências de DNA que coravam intensamente num núcleo em interfase, correspondiam à fracção da cromatina que se mantinha condensada durante todo o ciclo celular. Este autor deu a esta fracção o nome de heterocromatina, designando as restantes sequências da cromatina por eucromatina (Zhimulev e Belyaeva 2003). Assume-se que a eucromatina corresponde à fracção da cromatina com actividade codificante (Clark e Wall 1996). O termo heterocromatina ainda não é completamente compreendido, no entanto, estudos recentes começam por decifrar este mistério com quase 80 anos (Dillon 2004). No passado, apesar de vários autores terem aplicado termos como “junk DNA” e “selfish genetic material” a esta fracção do genoma, sabe-se actualmente que a heterocromatina é um elemento essencial do genoma dos eucariotas (Dimitri *et al.* 2004, Corradini *et al.* 2007, Rossi *et al.* 2007).

A definição inicial de Heitz (1928) baseava-se apenas no grau de condensação da heterocromatina. Os parâmetros utilizados para definir heterocromatina devem ter em conta não só a condensação, como o tempo de replicação (replicação tardia), as propriedades de coloração e o tipo de DNA e proteínas que contém (Sumner 2003). Actualmente considera-se que a heterocromatina tem actividade transcricional, o já foi observado em plantas (Nagl e Schmitt 1985), alguns vertebrados (Varley *et al.* 1980), *Drosophila melanogaster* (Dimitri *et al.* 2004, Dillon 2004, Corradini *et al.* 2007, Rossi *et al.* 2007) e *Homo sapiens* (Brun *et al.* 2003, Dimitri *et al.* 2004, Grunau *et al.* 2006).

II. 2.1- Heterocromatina constitutiva

A heterocromatina constitutiva (HC) localiza-se preferencialmente em regiões centroméricas dos cromossomas, podendo encontrar-se menos usualmente em regiões terminais e intersticiais (Corradini *et al.* 2007). Estas sequências correspondem a cerca de 30% do genoma em *H. sapiens*, 30% em *Drosophila melanogaster*, mais de 50% em *Dipodomys ordii* (rato canguru) e mais de 90% em algumas espécies de nemátodes (Singer 1982, Corradini *et al.* 2007). A presença ubíqua destas sequências nos genomas dos eucariotas superiores até hoje analisados, parece sugerir o seu valor adaptativo (Dimitri *et al.* 2004).

As regiões de HC dos cromossomas dos eucariotas são constituídas principalmente por sequências altamente repetidas de DNA satélite (Jonh 1988, Chaves *et al.* 2004), podendo também conter sequências mediantemente repetidas (Ananiev *et al.* 1998). As sequências de DNA

satélite ocorrem em “arrays” numa organização em tandem (Slamovits *et al.* 2001). Usualmente, o tamanho da unidade de repetição destas sequências varia entre as centenas e os milhares de pares de bases, podendo cada “array” ter milhares de unidades de repetição, compondo nos cromossomas, blocos de cromatina altamente condensada (Slamovits e Rossi 2002).

Embora as sequências de HC estejam presentes no genoma de todos os eucariotas superiores, estas não se encontram conservadas (Slamovits *et al.* 2001). Determinadas sequências de DNA satélite estão apenas presentes no genoma de determinados grupos taxonómicos, podendo mesmo ser específicas do genoma de uma determinada espécie, o que sugere que as sequências que lhe deram origem eram diferentes (Jobse 1995, Nijman e Lenstra 2001). Esta forma de ocorrência das sequências de HC parece ser o resultado de processos evolutivos dinâmicos, levando a contínuas alterações das sequências, do número de repetições, substituição e eliminação de sequências de DNA satélite (Slamovits e Rossi 2002).

II. 2.1.1- Origem e evolução dos “arrays” de repetição

A duplicação de uma sequência através de replicação “slippage” (c.f. figura 6a) e o processo de “unequal exchange” (cf. figura 6b), podem representar o primeiro passo na origem de uma repetição (Walsh 1987). A replicação “slippage” pode envolver a duplicação de uma sequência durante a replicação, iniciando-se assim uma repetição em tandem (Levinson e Gutman 1987). O processo de “unequal exchange” é um mecanismo de recombinação que envolve uma troca desigual de material genético entre cromossomas homólogos (Strachan e Read 2004). Depois de um grande número de acontecimentos de “unequal exchange”, pode surgir uma periodicidade na sequência (Smith 1976). Outra alternativa para a origem de “arrays” de repetição é a geração de novos “arrays” a partir de “arrays” já existentes em outras localizações do genoma (Slamovits e Rossi 2002). A excisão e circularização de algumas repetições a partir de um “array” em tandem, pode originar um molde para a replicação em círculo rolante (cf. figura 6c). Posteriormente, seguem-se acontecimentos de amplificação, linearização e integração desses “arrays” de repetição numa nova localização do genoma (Walsh 1987, Hamilton *et al.* 1990).

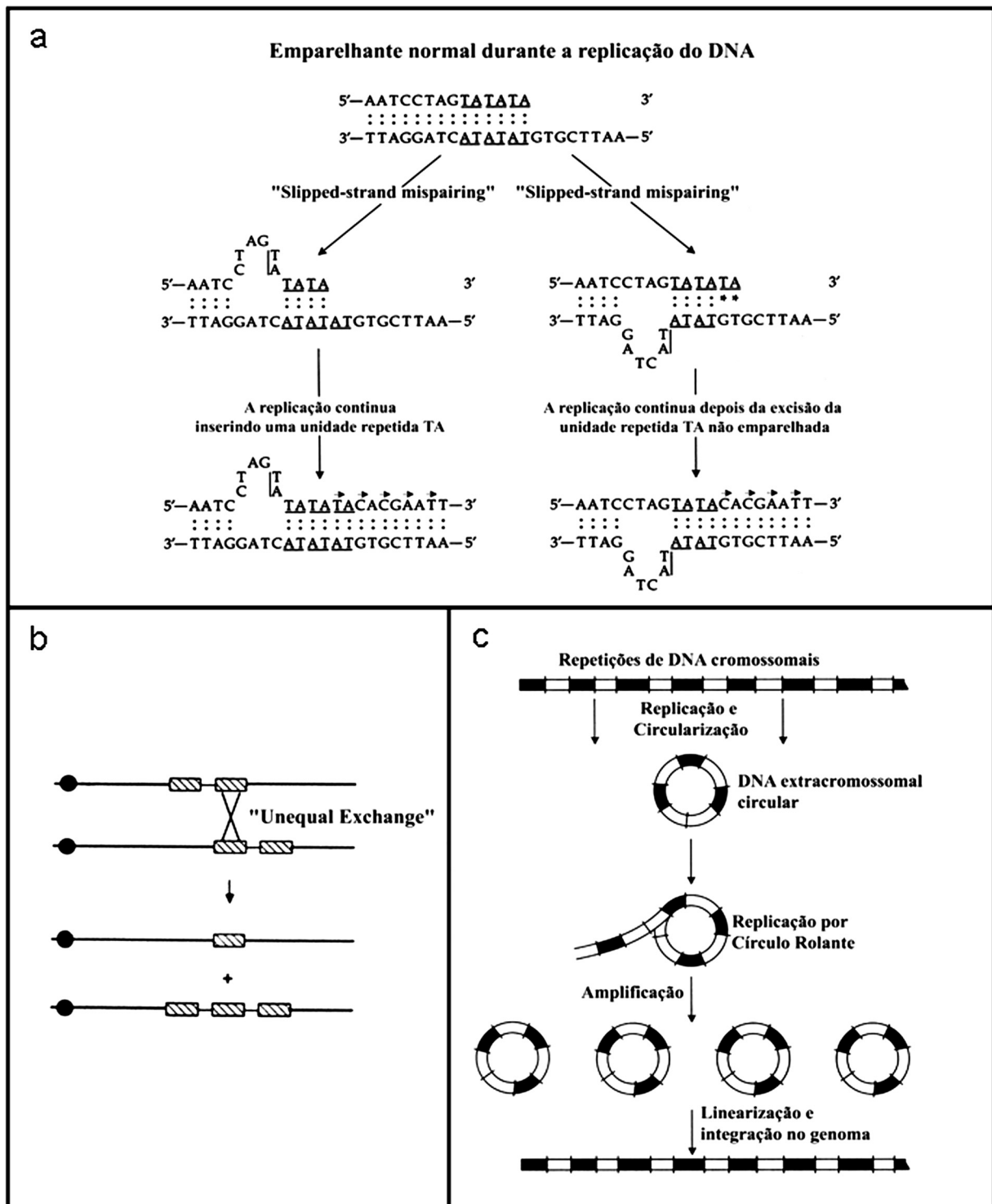


Figura 6 – Esquematização de alguns mecanismos envolvidos na origem e/ou dinâmica dos “arrays” de repetição. (a) Mecanismo de replicação “slippage” (ou “slippage-strand mispairing”) que tem como consequência a geração de duplicações e deleções. As setas pequenas indicam a direcção da síntese de DNA e os pontos indicam o emparelhamento de bases. O “slippage” na direcção 5’ – 3’ resulta na inserção de uma unidade de repetição. Um “slippage” na outra direcção (3’ - 5’) resulta na deleção de uma unidade de repetição. (b) Efeito da ocorrência de “unequal exchange” na variação do tamanho de um “array”. (c) Modelo de círculo rolante. As partes preenchidas a preto representam os motivos de repetição. A amplificação envolve a formação de uma cópia circular extracromossomal que contém um número variado de repetições, que depois são amplificadas por múltiplos acontecimentos de replicação por círculo rolante. Retirado de Chaves (2002).

II. 2.1.2- Funções da heterocromatina constitutiva

O aumento do nosso conhecimento sobre a natureza molecular da heterocromatina constitutiva, permite defini-la como um importante componente genómico, com funções ao nível da estrutura e regulação do genoma (Dimitri *et al.* 2004). Nas duas últimas décadas, estudos realizados em *Drosophila melanogaster*, têm demonstrado que a HC, além de possuir funções importantes de actividade centromérica e emparelhamento cromossómico (Dimitri *et al.* 2004), contém genes essenciais para a viabilidade e fertilidade (Henikoff *et al.* 2001, Dimitri *et al.* 2004, Corradini *et al.* 2007, Rossi *et al.* 2007). A presença de genes na HC não está apenas descrita em *Drosophila melanogaster*, parecendo ser uma característica conservada nos genomas dos eucariotas (Corradini *et al.* 2007). Recentemente, foram identificados genes na HC de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*), *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* e *H. sapiens* (Dimitri *et al.* 2004, Corradini *et al.* 2007, Rossi *et al.* 2007). Em *H. sapiens*, especula-se que estes genes possam estar envolvidos na codificação de factores de crescimento, imunoglobulinas e plasminogénio, referindo-se a transcrição destas sequências na linha germinativa, em tecidos fetais ou cancerosos (Brun *et al.* 2003, Dimitri *et al.* 2004, Grunau *et al.* 2006).

Diferenças na localização e quantidade de heterocromatina nos cromossomas de espécies próximas são bastante comuns, o que pode sugerir o papel destas sequências na evolução de genomas (Slamovits e Rossi 2002). Para além das funções já referidas, de acordo com vários trabalhos, é hoje aceite que a presença de sequências de HC pode facilitar a ocorrência de rearranjos cromossómicos, considerando-se mesmo “hotspots” de ocorrência de rearranjos (Yunis e Yasmineh 1971, Peacock *et al.* 1982, John 1988, Chaves *et al.* 2004). Vários autores têm vindo a sugerir que a rápida evolução das sequências de DNA satélite promove a ocorrência dos rearranjos cromossómicos, através da capacidade destas sequências alterarem o seu número de repetições e assumirem novas localizações no genoma (Wichman *et al.* 1991, Reig *et al.* 199, Schluter *et al.* 1997, Slamovits *et al.* 2001, Slamovits e Rossi 2002). Recentemente, Ruiz-Herrera *et al.* (2006) analisaram, nos autossomas de Homem, a relação entre a densidade de sequências repetitivas em tandem, e a localização de regiões de “breakpoints” evolutivos (regiões do cromossoma susceptíveis a quebra e reorganização), observando uma elevada correlação entre a distribuição destas sequências nos cromossomas e as regiões de “breakpoints” evolutivos.

II. 2.2- Caracterização da heterocromatina constitutiva por restrição *in situ* e bandeamento-C sequencial

A técnica de bandeamento-C é extremamente útil para identificar regiões de heterocromatina constitutiva nos cromossomas, porém, são necessárias outras metodologias para obter um conhecimento mais detalhado sobre a natureza molecular e a origem destas sequências. Entre estas metodologias, destaca-se a utilização de endonucleases de restrição (REs - digerem o DNA em locais específicos) e de fluorocromos (coram regiões cromossômicas ricas em determinados tipos de bases de DNA) seguida de bandeamento-C, que tem provado ser bastante útil no estudo da evolução das sequências de HC em diferentes genomas. Estas metodologias têm ainda a capacidade de demonstrar a heterogeneidade das sequências de HC (Chaves *et al.* 2004, Adegas *et al.* 2005, Adegas *et al.* 2007).

Gould *et al.* (1976) e Jones (1977) foram os primeiros investigadores a restringirem cromossomas fixados com REs, no entanto, o verdadeiro potencial desta técnica só foi revelado com os estudos de Mezzanotte *et al.* (1983a, 1983b) e Miller *et al.* (1983). Estes autores publicaram uma série de trabalhos em cromossomas de Homem, que demonstraram a capacidade das endonucleases produzirem padrões de diferenciação longitudinal em cromossomas.

As REs são enzimas isoladas a partir de bactérias, que clivam o DNA estranho de cadeia dupla, após reconhecimento de sequências específicas de nucleótidos (sequências de reconhecimento) (Verma e Babu 1995). As regiões cromossômicas que têm um elevado número de locais de reconhecimento no seu DNA, para uma endonuclease em particular, quando restringidas com essa endonuclease originarão fragmentos de DNA mais pequenos, sendo o DNA preferencialmente perdido nestas regiões. As restantes regiões, que possuem poucos locais de reconhecimento para a endonuclease, perderão pouco ou mesmo nenhum DNA cromossômico (Verma e Babu 1995). Sugeriu-se já nos anos 80 (Miller *et al.* 1984, Bianchi *et al.* 1985), que os fragmentos maiores que 1Kb permanecem na cromatina, enquanto que fragmentos menores, com cerca de 200 bp, são extraídos dos cromossomas. Contudo, Burkholder (1989) mostrou que nem sempre isto se verifica, indicando que fragmentos maiores que 4 Kb podem ser removidos de cromossomas de rato. Gosálvez *et al.* (1997) assumiram que o genoma de cada espécie é singular, não existindo regras para o reconhecimento, restrição e perda de sequências de DNA mediada por REs. Estes autores consideram que a estrutura da cromatina influencia, provavelmente, a capacidade de uma RE restringir o DNA de cromossomas fixados, e a perda de DNA após restrição nesses mesmos cromossomas.

A acção das endonucleases de restrição nos cromossomas revela bandas normalmente relacionadas com as bandas-G, R ou C (Verma e Babu 1995), observando-se uma reprodutibilidade dos resultados, pelo menos para os cromossomas de mamíferos (Chaves *et al.* 2002, Chaves *et al.* 2004, Adega *et al.* 2005, Adega *et al.* 2007) e bivalves (Leitão *et al.* 2004). A restrição *in situ* seguida de bandeamento-C permite uma caracterização da heterocromatina (em termos da sua localização, detecção de diferentes subclasses e revelação da sua composição molecular) de uma forma mais precisa que o bandeamento-C clássico, que apenas permite localizar blocos de HC (Chaves *et al.* 2004, Adega *et al.* 2005). Para além disso, ao utilizar esta metodologia, é também possível detectar bandas-C crípticas - bandas de HC apenas reveladas após a acção de REs. Vários autores indicam que este facto pode ser justificado pela possibilidade da acção das endonucleases causar modificações ao nível das sequências de HC, o que pode favorecer a ligação do corante ou contrastante a regiões cromossómicas específicas (Gosálvez *et al.* 1997, Nieddu *et al.* 1999, Chaves *et al.* 2004, Adega *et al.* 2005).

II. 2.2.1- Restrição *in situ* e bandeamento-C sequencial em cromossomas de roedores

A técnica de restrição *in situ* e bandeamento-C sequencial tem vindo a ser utilizada para a caracterização de sequências de heterocromatina constitutiva em cromossomas de roedores, sendo aqui apresentados alguns exemplos. Os cromossomas de algumas espécies de género *Ctenomys* (Família Octodontidae - *C. talarum*, *C. rionegrensis*, *C. pearsoni*, *C. dorbignyi*) foram submetidos à acção das endonucleases AluI e Sau3A, demonstrando-se a existência de diferenças na quantidade e na natureza molecular de sequências de HC entre cromossomas homólogos de espécies diferentes (Garcia *et al.* 2000). Estes resultados indicam uma diferente composição molecular entre as sequências de heterocromatina analisadas, o que sugere uma diferente origem para estas sequências. Foram também analisados os padrões de bandeamento produzidos pelas endonucleases EcoRI e MboI, em cromossomas de espécies pertencentes ao género *Reithrodontomys* (família Muridae), observando-se bandas-C crípticas após a acção da enzima EcoRI (Van Den Bussche *et al.* 1993).

II. 3 – Evolução dos cromossomas sexuais

As mutações são o “motor” dos vários processos evolutivos. No entanto, para sequências com funções essenciais (e.g. sequências de genes), existe uma pressão selectiva no sentido da manutenção das suas sequências e consequentemente preservação da função original. Desta forma, sugere-se que os processos evolutivos requerem a duplicação de sequências (e.g. sequências de genes), como também de segmentos de cromossomas, cromossomas e mesmo genomas, de modo que uma das cópias garanta a função original, ficando a outra livre para divergir (Strachan e Read 2004). Supõe-se que esta premissa também se possa aplicar à evolução dos cromossomas sexuais. Numa determinada altura da evolução um par de cromossomas duplicou, ficando uma das cópias livre para divergir, originando num grande número de taxa, dois cromossomas heteromórficos (citogeneticamente diferentes), com pequenas regiões de homologia. Actualmente aceita-se que a diferenciação dos cromossomas sexuais (incluindo os de mamíferos) se iniciou a partir de um par de cromossomas homólogos, o que foi proposto pela primeira vez por Ohno (1967), ao estudar os cromossomas Z e W em diferentes famílias de cobras.

II. 3.1- Diferenciação dos cromossomas sexuais

O mecanismo pelo qual um par de cromossomas homomórficos (citogeneticamente iguais) divergiu, originando dois cromossomas heteromórficos, ainda não é completamente entendido. A hipótese mais aceite para explicar a diferenciação dos cromossomas sexuais, considera que esta teve início com uma supressão da recombinação entre o par de cromossomas homólogos, devido ao estabelecimento de genes de determinismo sexual (Griffin *et al.* 2002, Ayling e Griffin 2002, Graves *et al.* 2002, Sumner 2003). Rice (1987) referiu que o primeiro gene de determinismo sexual deverá ter surgido num dos cromossomas homólogos, por mutação (em mamíferos no cromosoma Proto Y- primeiro cromossoma Y) e esta mutação ter-se-á fixado por ser vantajosa para os indivíduos. Este mesmo autor propôs que, posteriormente, em localizações cromossómicas adjacentes, pode ter existido uma selecção para acumulação de outros genes, responsáveis pelo dimorfismo sexual (cf. figura 7). Charlesworth (1996) considera que a supressão da recombinação se torna assim necessária para manter estes genes em “cluster”, sugerindo que poderia ocorrer esterilidade ou hermafroditismo quando separados por recombinação. Na supressão da recombinação podem estar envolvidas alterações estruturais no cromossoma proto Y, como a ocorrência de

inversões, translocações e acumulações de heterocromatina, que inibem a recombinação como consequência de emparelhamentos falhados e formação de “loops” durante a meiose (Griffin *et al.* 2002). Desta forma, ocorre assim uma eventual degradação funcional e estrutural do cromossoma proto Y, já que a supressão da recombinação pode facilitar a fixação de mutações numa população, reduzindo a probabilidade da mutação ser reparada (Ayling e Griffin 2002). A ocorrência de novas mutações no cromossoma proto Y dificulta ainda mais a recombinação, acentuando a diferenciação entre os dois cromossomas (Griffin *et al.* 2002). Clark e Wall (1996) referem que quando a diferenciação deste par de cromossomas é suficientemente elevada, ocorre uma acentuada diminuição da actividade meiótica do já considerado cromossoma Y, seguindo-se vários ciclos de degeneração, como se pode observar na figura 8. Após a ocorrência de vários ciclos de degeneração, observa-se uma “degradação” do potencial codificante do cromossoma Y pela possível acumulação de mutações e elementos transponíveis (Larsson e Meller 2006), como será abordado a seguir no ponto II. 3.1.1.

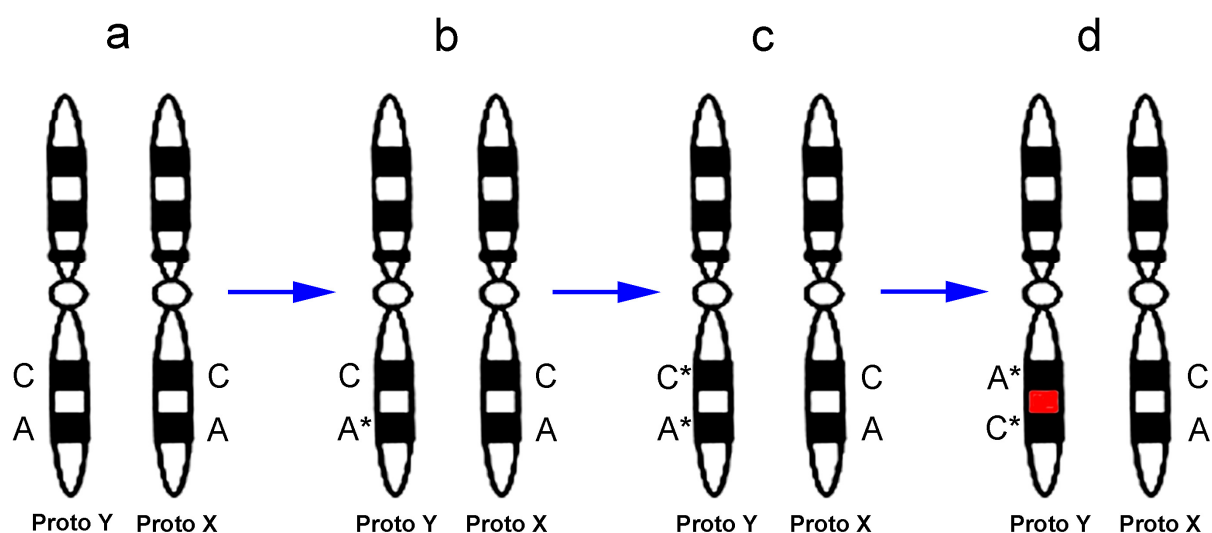


Figura 7- Sequência hipotética de acontecimentos que iniciaram a diferenciação dos cromossomas sexuais. (a) Cromossomas homólogos (b) Mutação do gene A originando o gene A*. (c) Mutação do gene C originando o gene C*. (d) Supressão da recombinação na região entre os genes A* e C*.

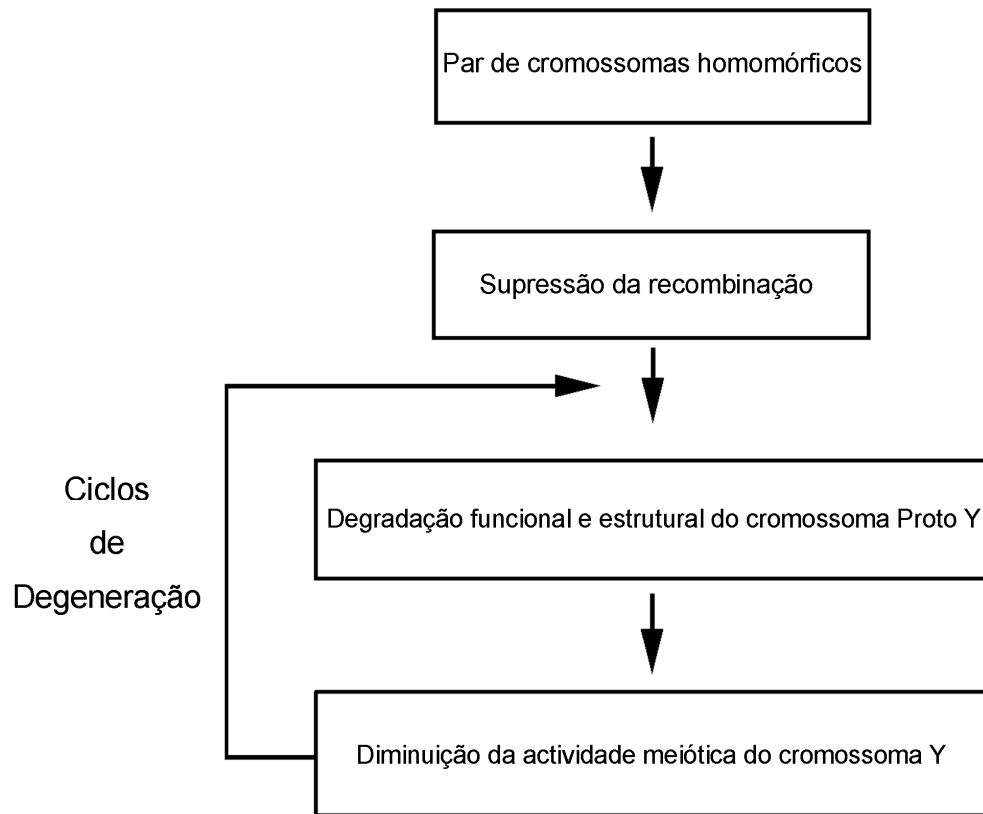


Figura 8- Processo cíclico de degeneração do cromossoma Y. Adaptado de Griffin *et al.* (2002).

Considerando o que anteriormente foi descrito, seria de esperar que o conteúdo e a função dos genes do cromossoma X estivessem conservados em relação ao autossoma ancestral. No entanto, após sequenciação do genoma humano, verificou-se que o conteúdo em genes do cromossoma X deverá ter sido igualmente moldado por forças selectivas. Em análises recentes sobre a função dos genes mapeados no cromossoma X humano, concluiu-se que os genes envolvidos na reprodução representam a maior fracção de genes presentes neste cromossoma (Graves 2006).

II. 3.1.1- Degeneração do cromossoma Y: acumulação de mutações e elementos transponíveis

Pelo que foi referido anteriormente, compreende-se porque o cromossoma Y é considerado o cromossoma menos conservado do genoma (Ayling e Griffin 2002). A perda de função de genes do cromossoma Y, por mutação ou acumulação de elementos transponíveis, resulta no sentido da não manutenção das sequências originais (Strachan e Read 2004, Graves

2006). Estudos realizados em várias espécies são concordantes em indicar que o cromossoma Y degenera a um ritmo rápido, chegando-se mesmo a sugerir o seu eventual desaparecimento no decurso da sua evolução (Graves 2005, 2006).

II. 3.1.1.1- Degeneração do cromossoma Y por acumulação de mutações

A acumulação de mutações no cromossoma Y pode ser explicada pelo mecanismo de “Muller’s Ratchet” (Charlesworth e Charlesworth 1997, Ayling e Griffin 2002, Griffin *et al.* 2002). Em 1964, Muller propôs uma teoria (designada de mecanismo “Muller’s Ratchet”) para explicar como, na ausência de recombinação, um conjunto de mutações podem ser acumuladas nos cromossomas. Considera-se que a frequência de mutação em todos os cromossomas seja bastante baixa, todavia a fixação destas mutações é mais provável no cromossoma Y, devido à supressão da recombinação como consequência do estabelecimento de genes de determinismo sexual, característicos deste cromossoma (Ayling e Griffin 2002). O mecanismo “Muller’s Ratchet” é considerado como um processo pelo qual é eliminada da população a classe menos representativa de indivíduos, portadores de um menor número de mutações, e as restantes classes originam as gerações seguintes (Muller 1964, Charlesworth e Charlesworth 1997). Uma representação simples desta teoria pode ser observada na figura 9.

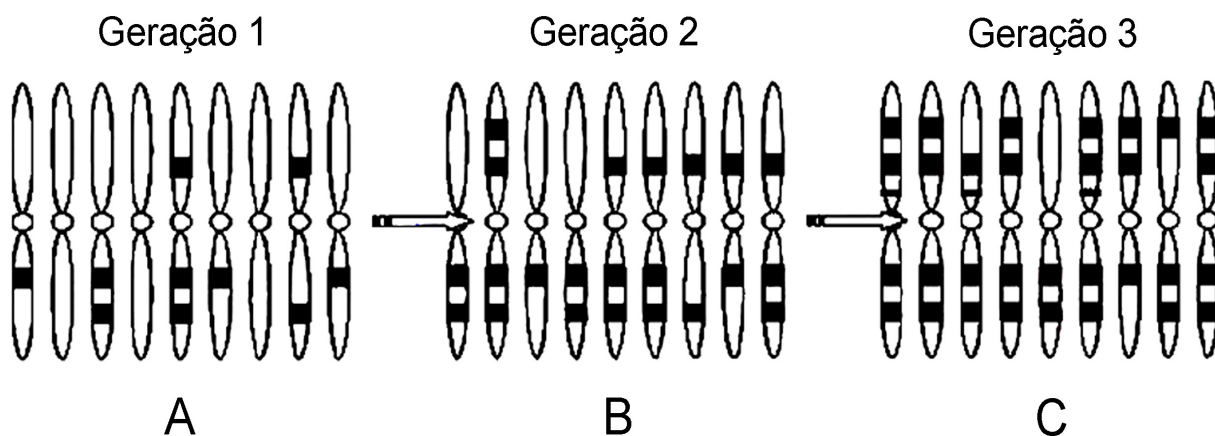


Figura 9- Mecanismo de “Muller’s Ratchet”. A - Na geração 1 existem indivíduos com 0 a 3 mutações no cromossoma Y. Eliminação da classe com um menor número de mutações (cromossoma Y com 0 mutações), as restantes classes originam a geração 2. B - A geração 2 tem entre 1 a 4 mutações no cromossoma Y. Eliminação da classe com um menor número de mutações (cromossoma Y com 1 mutação), as restantes classes originam a geração 3. C - A geração 3 tem entre 2 a 5 mutações no cromossoma Y. Eliminação da classe com um menor número de mutações (cromossoma Y com 2 mutações), as restantes classes originam a geração seguinte. Esta situação vai acontecendo sucessivamente. Adaptado de Ayling e Griffin (2002).

II. 3.1.1.2- Degeneração do cromossoma Y por acumulação de elementos transponíveis

Vários autores (Lyon 1998, Bailey 2000, Marchal *et al.* 2004, Marchal *et al.* 2006) têm vindo a observar, no Homem e em várias espécies de roedores, uma localização preferencial das sequências LINE-1 nos cromossomas sexuais, em comparação com os autossomas. Steinemann e Steinemann (2005) propõem que a acumulação de sequências LINE -1 no cromossoma Y favorece a sua degeneração, já que aquando da transposição podem inserir-se nos genes possibilitando, o seu silenciamento e resultando na degeneração da sua sequência.

II. 3.2- Evolução dos cromossomas sexuais em mamíferos

De acordo com a hipótese anteriormente referida, considera-se actualmente que a evolução dos cromossomas sexuais em mamíferos se iniciou com a diferenciação de um par de cromossomas homomórficos (Griffin *et al.* 2002, Ayling e Griffin 2002, Graves *et al.* 2002, Anopriyenko e Zakian 2003, Khil e Camerini-Otero 2005, Graves 2005, Graves 2006). Mapas comparativos mostram que os cromossomas Z e W das aves, e os cromossomas X e Y dos mamíferos não apresentam homologia. O cromossoma X do Homem é homólogo aos cromossomas 1 e 4 da galinha e o cromossoma Z é homólogo aos cromossomas 9, 5, 8 e 18 do Homem (Nanda *et al.* 2002). Desta forma, sugere-se que os cromossomas sexuais de aves e mamíferos tenham evoluído independente, a partir de um diferente par de autossomas (Graves *et al.* 2002) e após a divergência destas linhagens de vertebrados (Griffin *et al.* 2002), há aproximadamente 310 Ma (Khil e Camerini-Otero 2005) (cf. figura 10).

A diferenciação dos cromossomas sexuais em mamíferos resultou num cromossoma de maior tamanho e mais rico em genes (cromossoma X), em comparação com um cromossoma de menor tamanho e pobre em genes (cromossoma Y) (Griffin *et al.* 2002). Contudo, estes cromossomas possuem ainda algumas regiões de homologia, não estando completamente diferenciados, designadas por regiões pseudoautossomais (regiões PAR), onde ocorre o emparelhamento cromossómico e recombinação (Ayling e Griffin 2002, Graves *et al.* 2002). A extensão destas regiões varia entre as diferentes linhagens de mamíferos, envolvendo grandes regiões cromossómicas em monotrematas, pequenas regiões em mamíferos placentários e sendo aparentemente inexistentes em marsupiais (Anopriyenko e Zakian 2003).

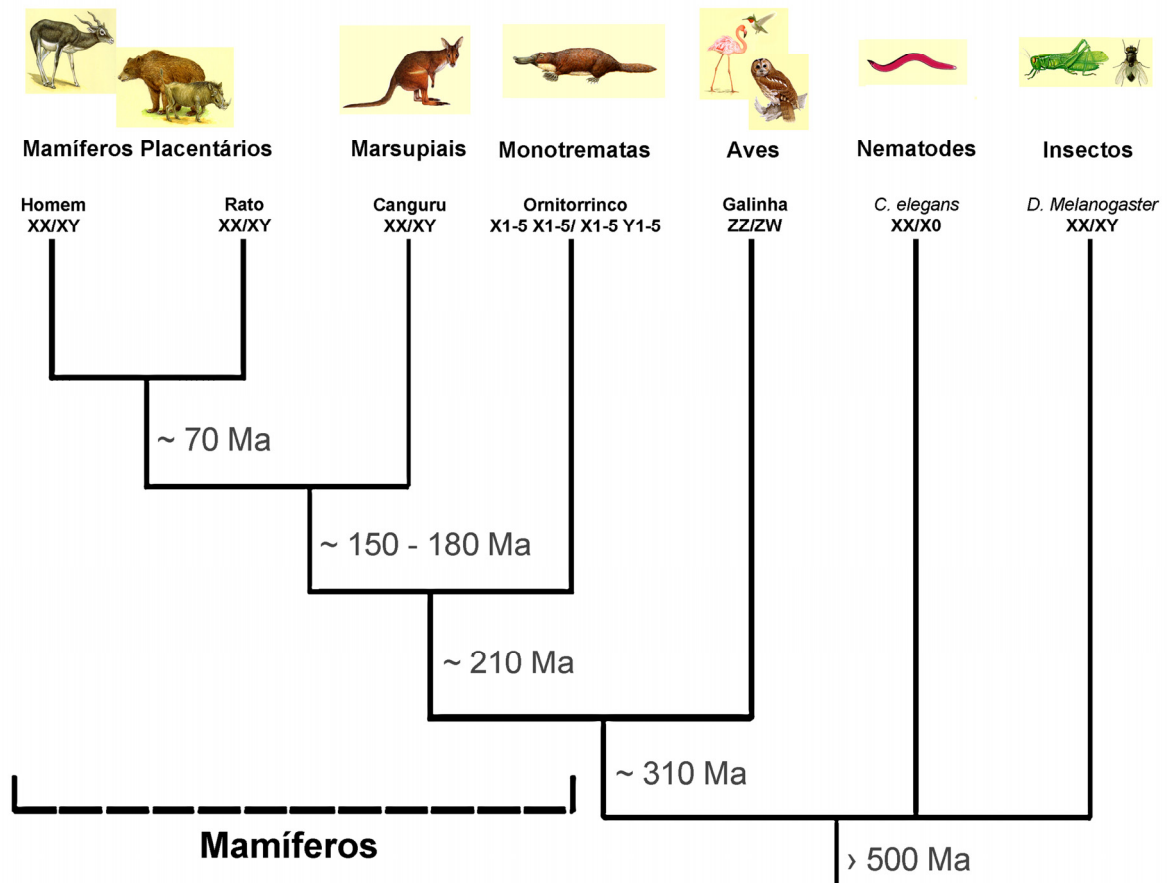


Figura 10- Evolução de cromossomas sexuais. Pensa-se que os cromossomas sexuais dos mamíferos (X e Y) se diferenciaram após a divergência entre mamíferos e aves. Adaptado de Khil e Camerini-Otero (2005).

O sistema de determinismo sexual observado em mamíferos é do tipo XX/XY, sendo os machos heterogaméticos (XY) e as fêmeas homogaméticas (XX), existindo algumas exceções (Charlesworth e Dempsey 2001), como acontece por exemplo em três espécies de roedores, *Tokudaia osimensis*, *Tokudaia tokunoshimensis* e *Ellobius lutescens* (família Muridae). Estas espécies têm uma constituição sexual cromossômica do tipo X0 em ambos os sexos, não se observando o cromossoma Y (Soullier *et al.* 1998, Sutou *et al.* 2001, Just *et al.* 1995, Vogel *et al.* 1998). Nestes casos, a distinção cromossômica entre os dois sexos faz-se pela ocorrência de dimorfismos cromossômicos (duas formas diferentes de um cromossoma) entre machos e fêmeas (De La Maza e Sawyer 1976, Arakawa *et al.* 2002). As regiões cromossômicas sexuais dimórficas chamam-se de regiões sexuais específicas, considerando-se que possam ter resultado de pequenas adições de sequências do cromossoma Y ao cromossoma X nas duas espécies do género *Tokudaia* (Kobayashi *et al.* 2007), e ao cromossoma 1 na espécie *Ellobius lutescens* (De La Maza e Sawyer 1976).

II. 3.2.1- Translocações entre autossomas e cromossomas sexuais em mamíferos

Em 1995, Graves propôs uma hipótese para a evolução dos cromossomas sexuais em mamíferos, chamada hipótese de “addition - attrition”. Esta hipótese considera que proto gonossomas (primeiros cromossomas sexuais) destes animais, possuindo regiões de homologia, sofrem ciclos de adição de material autossómico (“addition”) por translocação, seguidos de uma degeneração gradual do cromossoma Y (“attrition”). De acordo com esta hipótese, a adição de material autossómico a uma região PAR do cromossoma X (“addition”) permite originar um cromossoma X composto, com regiões sexuais primitivas e regiões autossómicas adicionadas. Por recombinação entre as regiões PAR, o cromossoma Y adquire o material autossómico, observando-se um aumento destas regiões. Posteriormente, supõe-se que o cromossoma Y é sujeito a pressões selectivas, reduzindo-se a recombinação, o que leva à acumulação de mutações (“attrition”) (Graves 1995). Os proto gonossomas são depois sujeitos a novos ciclos de “addition”, recombinação e “attrition” (Graves *et al.* 1998, Ayling e Griffin 2002), como se pode observar na figura 11.

Graves e Shetty (2000) sugeriram, de acordo com esta hipótese, que a degradação progressiva do cromossoma Y tem sido equilibrada por novas “additions” à região PAR, passando as regiões autossómicas adicionadas a fazer parte desta região homóloga. Estes mesmos autores consideram também que se estas “additions” não ocorrerem, os cromossomas sexuais perderão as regiões PAR, deixando de ser observar ciclos de “addition - attrition”. Graves (2006) propôs que se ocorrer o desaparecimento do cromossoma Y, um novo gene de determinismo sexual poderá surgir noutra cromossoma, iniciando-se um novo ciclo de diferenciação sexual. Este autor pensa que isto esteja a acontecer nas espécies de roedores *Tokudaia osimensis*, *Tokudaia tokunoshimensis* e *Ellobius lutescens* (família Muridae), que apresentam constituição cromossómica do tipo XO, como atrás referido.

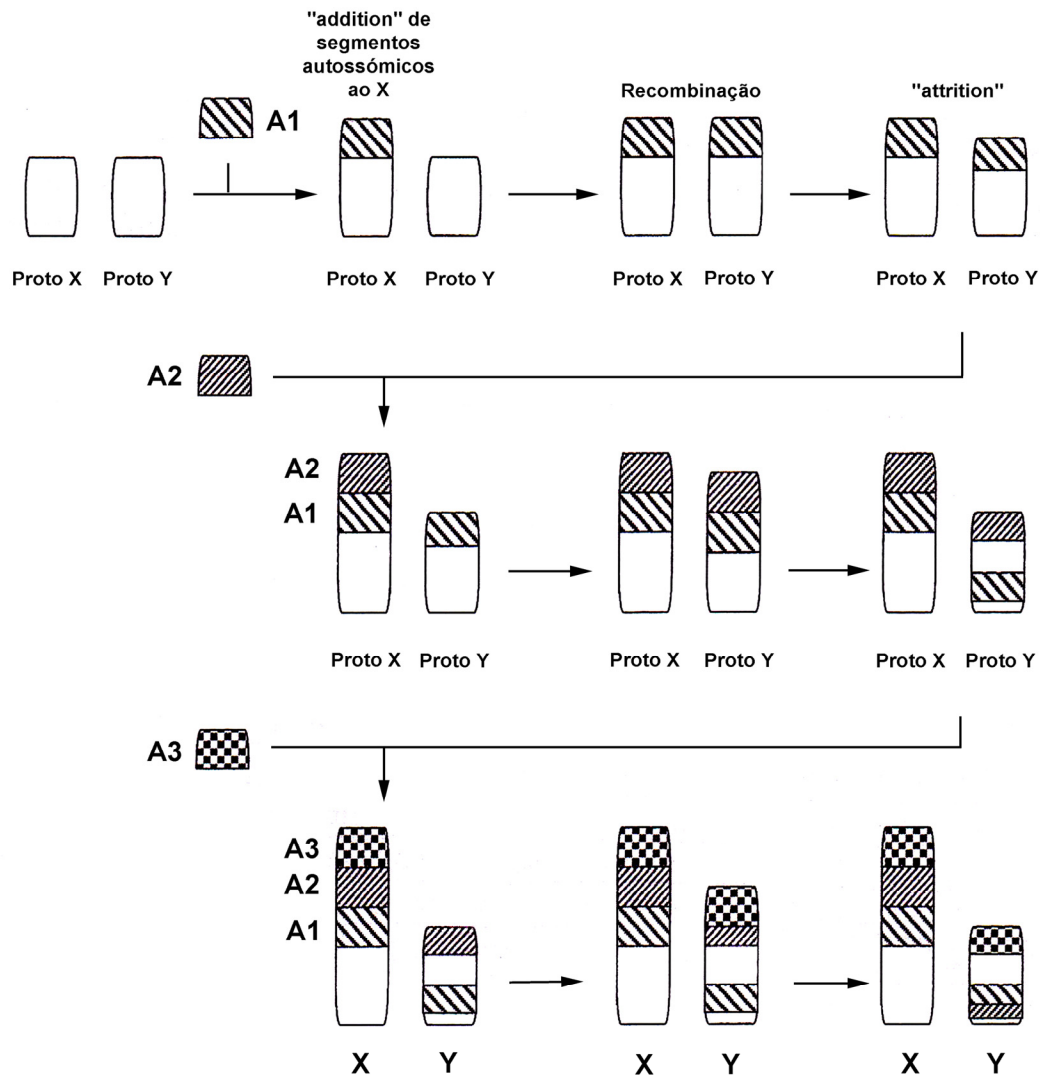


Figura 11 – Hipótese de “addition – attrition” para a evolução dos cromossomos sexuais de mamíferos. (A1, A2 e A3 segmentos autossômicos). Adaptado de Ayling e Griffin (2002).

Graves *et al.* (1998) referem que diferentes segmentos autossômicos podem ser adicionados por translocação às regiões PAR em diferentes linhagens de mamíferos, o que pode justificar o diferente conteúdo em genes destas regiões. Como nos marsupiais as regiões PAR são aparentemente inexistentes, pode sugerir-se que os seus cromossomos sexuais estejam completamente diferenciados e não ocorram “additions” de material autossômico (Toder *et al.* 1997). Porém, Graves *et al.* (1998) consideram que devem ter já existido regiões PAR nos cromossomos sexuais de marsupiais, o que possibilitaria ciclos de “addition-attrition”, podendo estas regiões PAR ter sido perdidas após uma intensa degradação do cromossoma Y.

Em mamíferos placentários, particularmente em roedores, vários têm sido os trabalhos onde foi possível observar translocações entre autossomas e cromossomos sexuais, tendo sido

considerado este tipo de rearranjos como um dos passos no complexo processo evolutivo que origina os cromossomas sexuais nestes animais, seguindo-se a hipótese de “addition – attrition” (Fredga 1972, Viegas- Pequignot *et al.* 1982, Kasahara e Dutrillaux 1983, Wahrman *et al.* 1983, Ratomponirina *et al.* 1986, Tucker 1986, Pack *et al.* 1993, Vassart *et al.* 1995, Yang *et al.* 1997, Dobigny *et al.* 2002, Dobigny *et al.* 2004, Veyrunes *et al.* 2004, Deuve *et al.* 2006).

A partir da análise de mapas comparativos entre os cromossomas X de Homem, marsupiais e monotrematas, considera-se que o cromossoma X de mamíferos placentários é composto por regiões conservadas (XCR) e regiões que lhe foram posteriormente adicionadas (XAR) (Griffin *et al.* 2002). As regiões XCR estão presentes no cromossoma X das três linhagens de mamíferos, o que indica que estariam presentes no seu ancestral comum antes da divergência dos “Theria” (mamíferos placentários e marsupiais) e “Prototheria” (monotrematas) (Watson *et al.* 1991, Graves *et al.* 2002, Anopriyenko e Zakian 2003), que segundo Woodburne *et al.* (2003) ocorreu há aproximadamente 210 Ma. As restantes regiões do cromossoma X de Eutheria (XAR) foram mapeadas em autossomas de marsupiais e monotrematas (Watson *et al.* 1991, Graves *et al.* 2002, Anopriyenko e Zakian 2003) (cf. figura 12).

Tal como se observa para o cromossoma X, a análise de mapas comparativos entre marsupiais e Homem, aponta para que o cromossoma Y do Homem também seja composto por regiões ancestrais (YCR) e regiões que lhe foram posteriormente adicionadas (YAR) (Graves 2006).

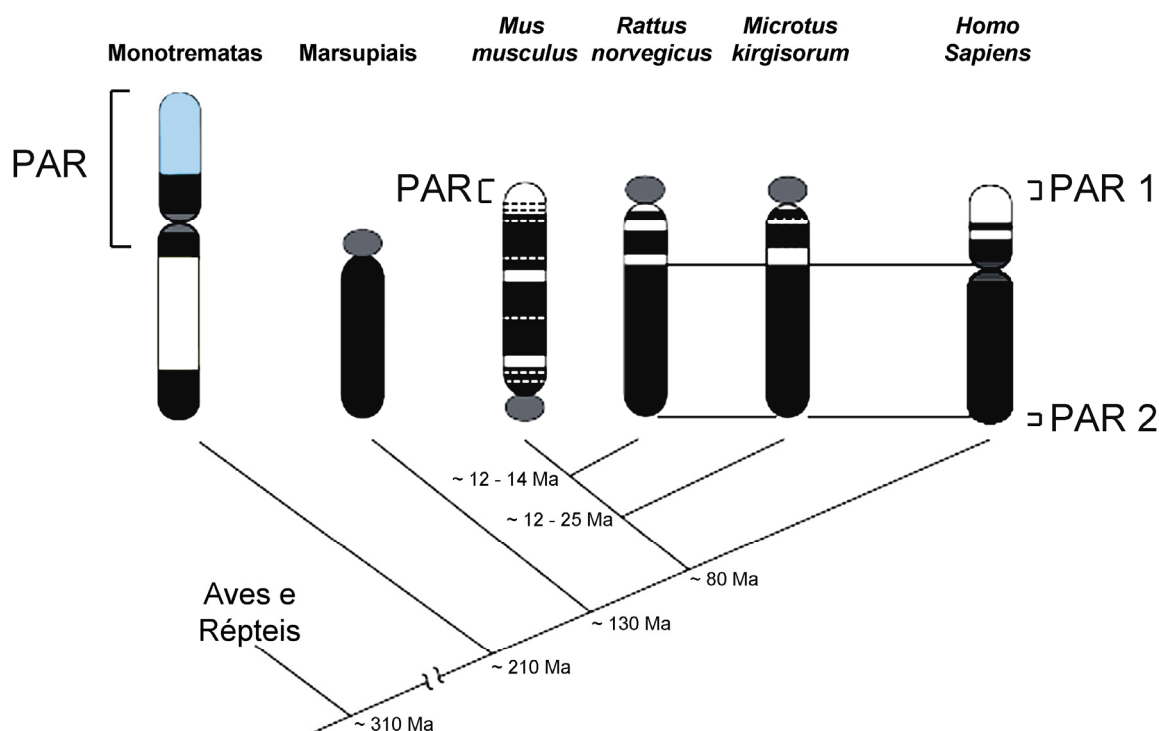


Figura 12- Estrutura do cromossoma X de mamíferos placentários, marsupiais e monotrematas. Os mamíferos placentários estão representados por duas ordens: Ordem Rodentia (*M. musculus*, *R. norvegicus* e *M. kirgisorum*) e Ordem Primata (*H. sapiens*). As regiões conservadas do cromossoma X (XCR) presentes nas três linhagens de mamíferos são apresentadas a preto e as regiões adicionadas por translocação (XAR), presentes apenas nos mamíferos placentários, são apresentadas a branco. As regiões apenas presentes no cromossoma X de monotrematas são apresentadas a azul claro, não tendo ainda sido estudada nestes mamíferos a região apresentada a branco. Os tracejados representam regiões de possíveis rearranjos cromossômicos, considerando-se que o cromossoma X de rato é mais rearranjado que o cromossoma X do Homem, sugerindo-se que as inversões são um rearranjo comum durante a evolução do cromossoma X de mamíferos (Kuroiwa *et al.* 2001). As datas (Ma) aqui apresentadas estão de acordo com os trabalhos de Ji *et al.* (2002), Woodburne *et al.* (2003) e Anopriyenko e Zakian (2003). Adaptado de Anopriyenko e Zakian (2003).

II. 3.3- Inativação do cromossoma X em mamíferos

Como consequência da existência de dois cromossomas X nas fêmeas de mamíferos e apenas um cromossoma X nos machos, seria de esperar o dobro de transcritos dos genes presentes no cromossoma X nas fêmeas (Sumner 2003), o que não acontece. Pensa-se que existe uma compensação de dose relativamente aos transcritos do cromossoma X, que permite regular os transcritos em ambos os sexos, sendo inativado um dos cromossomas X nas fêmeas (Chow *et al.* 2005), o que foi proposto pela primeira vez por Lyon (1961). Esta inativação do cromossoma X é uma forma de regulação génica em que milhares de genes de um cromossoma são silenciados (Bailey *et al.* 2000). Nos mamíferos placentários, a inativação do cromossoma X ocorre ao acaso durante a embriogénese das fêmeas (Chow *et al.* 2005). Em marsupiais e nos monotrematas, pouco se sabe sobre o mecanismo de inativação deste cromossoma (Hore *et al.* 2007, Shevchenko *et al.* 2007, Davidow *et al.* 2007).

Lyon (1998) propôs pela primeira vez que as sequências LINE-1 podem estar envolvidas na inativação do cromossoma X em mamíferos. Esta hipótese baseia-se na observação de uma localização preferencial de sequências LINE-1 no cromossoma X de Homem e rato, em relação aos autossomas, apresentando-se também as regiões que escapam à inativação “pobres” nessas sequências (Lyon 1998, 2006). Vários trabalhos realizados em roedores têm vindo reforçar a hipótese de Lyon (1998), como por exemplo os trabalhos de Baker e Kass (1994) e Marchal *et al.* (2006). Nestes trabalhos, diferentes espécies dos géneros *Peromyscus* (Família Cricetidae) e *Microtus* (Família Muridae) apresentam uma distribuição preferencial de sequências LINE-1 nos cromossomas sexuais, em relação aos autossomas. Contudo, também existem trabalhos que colocam esta hipótese em causa, tendo sido observado que as sequências LINE-1 se encontram uniformemente distribuídas por todos os cromossomas do complemento das espécies *Cryptomys mehowi* (Família Bathyergidae) (Deuve *et al.* 2006) e *Sigmodon hispidus* (família Muridae) (Casavant *et al.* 2000), não se observando uma localização preferencial destas sequências no cromossoma X.

Capítulo III

Material e Métodos

MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo serão descritos os materiais e métodos utilizados ao longo de todo o trabalho. A metodologia referente a cada uma das técnicas aqui apresentadas será acompanhada de uma introdução prévia, na qual serão apresentados, sempre que possível, os mecanismos subjacentes a essas mesmas técnicas.

III. 1- Cultura de células e preparações cromossômicas

Neste trabalho foram utilizadas linhas celulares de fibroblastos de *Cricetus cricetus* (CCR), *Peromyscus eremicus* (PER) (ambos pertencentes à família Cricetidae) e *Praomys tullbergi* (PTU) (pertencente à família Muridae). Cada uma destas linhas foi gentilmente cedida pelo Doutor Vitaly Volobouev [“Department of Systematics and Evolution, Muséum National d’Histoire Naturelle” (MNHN)]. A cultura de células foi realizada segundo procedimentos “standard” descritos por Chaves *et al.* (2004), de forma a se obterem preparações cromossômicas em quantidade e qualidade (no que diz respeito à morfologia e espalhamento dos cromossomas).

III. 2- Restrição *in situ*

Com o objectivo de se caracterizar a heterocromatina constitutiva (HC) dos cromossomas das três espécies de roedores estudadas neste trabalho (CCR, PER e PTU), foi realizado bandeamento por restrição *in situ* com endonucleases de restrição, seguido de bandeamento-C.

III. 2.1- Técnicas de bandeamento

A capacidade de bandeamento cromossômico é a característica dos cromossomas mais explorada mas também uma das menos compreendidas (Hayes 1995), tendo uma função na identificação de cromossomas e organização de cariótipos. O primeiro método publicado para a demonstração de bandas ao longo dos cromossomas envolvia o uso de mustarda de quinacrina ou di-hidroclorídeo de quinacrina, para produção de um padrão de diferenciação longitudinal fluorescente (Caspersson *et al.* 1971). Este método é designado de bandeamento-Q, tendo

surgido posteriormente outros métodos de bandeamento que permitem obter bandas-G, bandas-R, bandas-C, bandas-T e NOR's (Verma e Babu 1995).

O uso de fluorocromos capazes de reconhecer sequências de DNA enriquecidas em bases AT e GC (Verma e Babu 1995) e a utilização de endonucleases de restrição (Babu e Verma 1986) permite também obter um padrão de diferenciação longitudinal em cromossomas metafásicos. Gould *et al.* (1976) e Jones (1977) foram os primeiros investigadores a restringirem cromossomas fixados com enzimas de restrição, no entanto, o verdadeiro potencial desta técnica para a obtenção de um padrão de diferenciação longitudinal nos cromossomas, só foi descoberto com os estudos de Mezzanotte *et al.* (1983a, 1983b) e Miller *et al.* (1983), em cromossomas humanos fixados.

III. 2.1.1- Bandeamento-G por acção da tripsina com coloração por DAPI (GTD)

A técnica de bandeamento-G foi descrita pela primeira vez por Sumner *et al.* (1971), sendo actualmente muito utilizada para a identificação de cromossomas e organização de cariótipos. As bandas obtidas após a utilização desta técnica (bandas-G) resultam da digestão dos cromossomas com enzimas proteolíticas inespecíficas como a tripsina, no entanto, o mecanismo subjacente a este tipo de bandeamento ainda não é completamente conhecido (Verma e Babu 1995).

Neste trabalho o bandeamento-G observado após a acção da tripsina e coloração com DAPI (4' – 6' – “diamidino – 2- phenylindole”) (GTD), foi apenas usado para a identificação dos cromossomas em placas metafásicas que não foram sujeitas a restrição *in situ*. Estes cromossomas são posteriormente sujeitos a bandeamento-C, permitindo uma comparação entre bandas-C obtidas após bandeamento-G (bandeamento-C clássico) ou após restrição *in situ*.

Protocolo 1- Bandeamento-G por acção da tripsina com coloração por DAPI (GTD) (Técnica usada no laboratório de Genómica Comparativa Funcional e Tecnológica do IBB, CGB-UTAD)

1. As lâminas preparadas a partir de cultura fixadas com um bom índice mitótico e espalhamento foram envelhecidas “overnight” numa incubadora a 65°C.
2. No dia seguinte foram retiradas da incubadora e deixaram-se arrefecer até atingirem a temperatura ambiente.

3. Posteriormente as lâminas foram colocadas numa solução de Hank's Balanced Salt Solution (HBSS – Invitrogen Life Technologies) durante 5 minutos, transferindo-se posteriormente (uma lâmina de cada vez) para uma solução de tripsina a 3% (v/v) em tampão fosfato, onde permaneceram apenas alguns segundos (~ 5 segundos).
4. Para inibir a acção da tripsina as lâminas foram novamente mergulhadas na solução de HBSS, onde permaneceram cerca de 1 minuto, sendo posteriormente mergulhadas numa solução de etanol a 70%, seguida de uma solução de etanol a 100%, durante 3 minutos. Deixaram-se secar ao ar.

Montagem

5. Colocou-se uma gota de DAPI (Vector Laboratories) no centro de uma lamela 24×50 mm. Inverteu-se a lâmina sobre a lamela e pressionou-se o conjunto invertido (lâmina/lamela) sobre uma camada espessa de papel absorvente, de forma a remover o excesso de DAPI e eliminar bolhas de ar. As lâminas foram guardadas ao abrigo da luz a 4°C, até serem observadas.
6. Observaram-se as lâminas ao microscópio.

III. 2.1.2- Bandeamento por restrição *in situ*

As endonucleases de restrição (REs) são enzimas isoladas a partir de bactérias, que degradam o DNA estranho de cadeia dupla, após reconhecimento de sequências específicas de nucleótidos (Verma e Babu 1995). As REs utilizadas neste trabalho, a sua origem, e as sequências de DNA que reconhecem, estão descritas na tabela seguinte (tabela 1).

Tabela 1 – Sequências de reconhecimento para clivagem das endonucleases de restrição utilizadas na metodologia de restrição *in situ*

Endonucleases de restrição	Sequências Reconhecimento	Bactéria de Origem
AluI (Invitrogen Life Technologies)	AG↓CT TC↑GA	<i>Arthrobacter luteus</i>
ApaI (Invitrogen Life Technologies)	GGGCC↑C C↓CCGGG	<i>Acetobacter pasteurianus</i>
BamHI (Amersham Biosciences)	G↓GATCC CCTAG↑G	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H.
DraI (Amersham Biosciences)	TTT↓AAA AAA↑TTT	<i>Deinococcus radiophilus</i>
HaeIII (Invitrogen Life Technologies)	GG↓CC CC↑GG	<i>Haemophilus aegyptius</i>
PstI (Invitrogen Life Technologies)	CTGCA↑G G↓ACGTC	<i>E. coli</i> portadora do gene <i>Pst I</i> (<i>Providencia stuartii</i>)
RsaI (Invitrogen Life Technologies)	GT↓AC CA↑TG	<i>Rhodopseudomonas sphaeroides</i>

Protocolo 2 – Bandeamento por restrição *in situ* e coloração com DAPI (Técnica original de Chaves *et al.* 2002)

1. As lâminas preparadas a partir de cultura fixadas foram envelhecidas a 65°C, durante 6 horas. Decorrido esse tempo deixaram-se arrefecer à temperatura ambiente.
2. Procedeu-se à preparação da mistura de reacção enzimática (tabela 2) de acordo com as indicações do fabricante de cada enzima de restrição utilizada. Independentemente das diferentes concentrações das enzimas de restrição, foi utilizada uma concentração final de 30 U de enzima por lâmina, num volume total de reacção (por lâmina) de 100 µL. Para uma óptima concentração salina na reacção, cada enzima foi usada com o respectivo tampão (10x concentrado) (ver tabela 2).
3. Em cada lâmina foram colocados 100 µL de mistura reacção previamente preparada.
4. Sobrepos-se uma lamela em cada lâmina, tendo o cuidado de evitar a formação de bolhas de ar, para um espalhamento adequado e homogéneo da solução por toda a lâmina.
5. As lâminas foram colocadas numa câmara húmida, previamente preparada, e incubadas a 37°C durante toda a noite. Esta é a temperatura óptima da acção das enzimas de restrição, utilizadas neste trabalho.

Tabela 2 – Preparação da mistura de reacção enzimática

E. restrição	Alu I	Apa I	BamH I	Dra I	HaeIII	Pst I	Rsa I
Tampão (10×)	REACT® 1	REACT® 4	10 K	10 M	REACT® 2	REACT® 2	REACT® 1
Conc. Stock enz. (U/μL)	10 U/μL	10 U/μL	15 U/μL	15 U/μL	50 U/μL	10 U/μL	10 U/μL
Quantidade (μL)							
E. restrição	3	3	2	2	0,6	3	3
Tampão (10×)	10	10	10	10	10	10	10
Água ultrapura	87	87	88	88	89,4	87	87
Total	100	100	100	100	100	100	100

6. No dia seguinte, retirou-se a lamela e realizaram-se 2 lavagens das lâminas em água desionizada e autoclavada, deixando-se secar ao ar.

Fixação e desidratação

7. As lâminas foram posteriormente mergulhadas numa solução de 1× PBS (à temperatura ambiente) durante 5 minutos, sendo esta solução renovada após este período de tempo.
8. Decorridos 5 minutos, as lâminas foram mergulhadas numa solução de formaldeído a 3% (v/v) em 1× PBS (à temperatura ambiente) durante 20 minutos.
9. Após este período de tempo, as lâminas foram mergulhadas em 2 banhos de 1× PBS (à temperatura ambiente), cada um com a duração de 5 minutos.
10. De seguida, as lâminas foram mergulhadas em 3 soluções sequenciais de etanol, previamente arrefecidas a – 20 °C, em concentrações crescentes (70%, 90% e 100%) durante 5 minutos cada, deixando-se secar à temperatura ambiente.

Desnaturação

11. Depois de secas, as lâminas foram desnaturadas a 65°C numa solução de 70% formamida/2×SSC durante 35 segundos, parando-se a acção da formamida ao mergulhar as lâminas numa solução de etanol a 70% previamente arrefecida a – 20 °C, durante 5 minutos.
12. De seguida, as lâminas foram mergulhadas em 2 soluções de etanol (em concentrações crescentes de 90% e 100%) previamente arrefecidas a – 20 °C, durante 5 minutos cada. Posteriormente deixaram-se secar à temperatura ambiente.

Montagem

13. Montaram-se então as lâminas e observaram-se ao microscópio, como descrito nos pontos 5 e 6 do protocolo 1.

III. 2.1.3- Bandeamento-C por acção de hidróxido de bário com coloração por Iodeto de Propídeo (CBP)

A técnica de bandeamento-C revela selectivamente sequências de heterocromatina constitutiva (HC), tendo sido inicialmente descrita por Arrighi e Hsu (1971), envolvendo o método original um tratamento com hidróxido de sódio (NaOH) para desnaturar o DNA cromossómico e uma subsequente incubação numa solução salina. Em 1972, Sumner modifica o método original, utilizando hidróxido de bário $[(\text{Ba}(\text{OH})_2)]$ em alternativa ao NaOH. Ambos os métodos produzem um padrão similar de bandas, embora o último tenha alguma vantagem no que diz respeito ao controlo do processo de desnaturação. Nos dois métodos as bandas-C são reveladas depois de tratamentos sucessivos em condições ácidas (HCl), alcalinas $[(\text{Ba}(\text{OH})_2)]$ e salinas (2xSSC) a temperatura elevada (Verma e Babu 1995).

Neste trabalho utilizou-se o método do $\text{Ba}(\text{OH})_2$ e coloração com Iodeto de Propídeo (PI), como descrito por Chaves (2002), designando-se esta técnica por CBP (bandas-C por acção do “Barium Hydroxide”, com coloração por “Propidium Iodide”).

Protocolo 3- Bandeamento-C por acção de hidróxido de bário com coloração por Iodeto de Propídeo (CBP) [Técnica original de desnaturação e incubação numa solução salina de Sumner (1972), modificada por Chaves (2002)]

1. As lâminas submetidas ao bandeamento-C sequencial a outros tratamentos, nomeadamente bandeamento-G e restrição *in situ*, foram lavadas para se remover o DAPI. Desta forma mergulharam-se numa solução de 2xSSC para facilitar a remoção da lamela e posteriormente colocaram-se numa solução de 4xT a 0,05% (Tween 20 numa solução de 4xSSC) durante toda a noite. No dia seguinte foram novamente mergulhadas numa solução de 2xSSC, durante 1 hora.
2. De seguida as lâminas foram fixadas (só quando os cromossomas foram previamente sujeitas a bandeamento-G) e desidratadas como descrito nos pontos 7, 8, 9 e 10 do protocolo 2.
3. Depois de secas as lâminas foram imersas numa solução 0,1 M de ácido clorídrico (HCl), durante 20 minutos à temperatura ambiente.
4. Posteriormente, foram imersas numa solução de hidróxido de bário $[\text{Ba}(\text{OH})_2]$ durante 7 minutos à temperatura ambiente. A solução de $[\text{Ba}(\text{OH})_2]$ precipita facilmente, por

isso deve ser filtrada imediatamente antes de ser utilizada, para uma tina protegida da luz.

5. As lâminas foram depois mergulhadas e removidas rapidamente da solução de 0,1 M HCl, sendo posteriormente lavadas em água desionizada e autoclavada, impedindo-se assim a formação de precipitados de $\text{Ba}(\text{OH})_2$, que dificultam a observação microscópica.
6. Imergiram-se as lâminas durante 40 minutos numa solução de $2\times\text{SSC}$ a 60°C .
7. Lavaram-se posteriormente em dois banhos de água desionizada e autoclavada, deixando-se secar ao ar.
8. Montaram-se as lâminas como descrito no ponto 5 do protocolo 1, alterando-se apenas o contrastante para PI (Vector Laboratories).

III. 3- Isolamento e clonagem de sequências LINE-1 de CCR, PER e PTU

As sequências LINE-1 (“Long Interspersed Nuclear Elements-1”) são consideradas marcadores filogenéticos que em muito podem elucidar acerca das relações filogenéticas entre espécies, por serem considerados caracteres não homoplásicos (caracteres não convergentes) (Waters *et al.* 2007), tendo sido também sugerido, por vários autores, que estas sequências podem estar implicadas na inactivação do cromossoma X (Lyon 1998, Bailey *et al.* 2000, Marchal *et al.* 2006).

Com o objectivo de contribuir para o esclarecimento da sistemática da Ordem Rodentia e tentar avaliar a implicação das sequências LINE-1 na inactivação do cromossoma X, foram isoladas e clonadas sequências LINE-1 a partir do DNA genómico de cada uma das espécies estudadas.

III. 3.1- Obtenção de DNA genómico a partir de fibroblastos

O DNA genómico é normalmente obtido a partir de células em condições que promovem a degradação das proteínas, preservando a integridade da molécula de DNA. A lise celular e a separação do DNA dos outros constituintes pode ser conseguida recorrendo-se a várias técnicas. Vários são os protocolos que permitem isolar DNA genómico de células em cultura que crescem em “monolayer”, como é o caso dos fibroblastos (Chaves 2002). Neste trabalho optou-se pela utilização de um “kit” designado por: “Genomic DNA Isolation from Human Cultured Cell Line” [Quickgene DNA Tissue Kit S (Fujifilm Life Science)], que permite

extracções rápidas (oito amostras/15 minutos), obtendo-se DNA de elevada qualidade (pureza e concentração).

Após a extracção de DNA genómico, este pode ser submetido a uma electroforese em gel de agarose (como descrito no protocolo 5) para identificar possíveis contaminações com RNA e determinar se o DNA extraído se encontra fragmentado. As contaminações com RNA podem ser constatadas pela observação de uma banda de baixo peso molecular. A fragmentação do DNA pode ser verificada pela visualização de um “smear” no gel, ao invés do aparecimento de uma banda única (Chaves 2002).

Protocolo 4 – Extracção de DNA genómico a partir de fibroblastos em cultura [“Genomic DNA Isolation from Human Cultured Cell Line”, Quickgene DNA Tissue Kit S (Fujifilm Life Science)]

1. Foram adicionados 20 µL de proteinase K (EDT) a uma suspensão de células ($\sim 1 \times 10^6$ células em 180 µL de 1x PBS) e agitou-se gentilmente o tubo. Adicionou-se posteriormente 180 µL de tampão de lise (LDT).
2. “Vortexou-se” a solução durante cerca de 15 segundos e fez-se um “flash spin down”. Incubou-se 10 minutos num banho a 70°C.
3. Após a incubação fez-se um “flash spin down”, adicionando-se posteriormente 240 µL de etanol absoluto. Vortexou-se a solução durante cerca de 15 segundos e fez-se um novo “flash spin down”. O lisado foi então transferido para o sistema automático de isolamento de ácidos nucleicos QuickGene-800 (Fujifilm Life Science), permitindo-se a lavagem e eluição do DNA.

III. 3.2- Electroforese em gel de agarose

Na electroforese em gel de agarose o DNA migra em direcção ao pólo positivo, passando através de uma série de poros formados aquando da polimerização da agarose. Desta forma, os fragmentos de DNA podem ser separados pelo seu tamanho, observando-se que as moléculas mais pequenas migram mais rapidamente devido à sua maior facilidade em passar no “crivo” do gel. A resolução do gel depende do tamanho dos poros, que por sua vez está relacionada com a concentração de agarose utilizada (Verma e Babu 1995). Fragmentos DNA mais pequenos são resolvidos em elevadas concentrações de agarose (Sambrook *et al.* 1989).

Para se poder visualizar o DNA no gel é necessária a incorporação de brometo de etídeo (EtBr) na hélice de DNA, o qual também permite aumentar o efeito de “crivo” da agarose (Verma e Babu 1995). O EtBr ao ser iluminado com luz ultra violeta (UV) com comprimentos de onda entre 260 a 320 nm, fluoresce no espectro da luz visível, permitindo a visualização do DNA (Sambrook *et al.* 1989).

Protocolo 5- Electroforese em gel de agarose a 1,2 % (Técnica usada no laboratório de Genômica Comparativa Funcional e Tecnológica do IBB/CGB-UTAD)

1. Preparou-se um tabuleiro de montagem com um pente, numa superfície plana, onde se depositou a solução de agarose a polimerizar.
2. Num erlenmeyer colocaram-se 1,2 g de agarose (Invitrogen Life Technologies) e adicionaram-se 100 mL de 1× TBE.
3. Ferveu-se a agarose num microondas durante alguns minutos, homogeneizou-se a solução, até ficar completamente translúcida.
4. Colocou-se a solução num goblé de vidro, adicionando-se 5 µL de EtBr (10 mg/mL). Homogeneizou-se e colocou-se o gel no tabuleiro de montagem, previamente preparado, tendo-se o cuidado de retirar bolhas de ar.
5. Depois da agarose polimerizar, retiraram-se os pentes e verificou-se a integridade dos poços, de forma a não se perderem as amostras a depositar.
6. Colocou-se o gel numa tina de electroforese, coberto em 1 a 2 mm por uma solução tampão de 1× TBE.
7. Depositaram-se nos vários poços as amostras de DNA e o marcador. Ligou-se a tina de electroforese à fonte de alimentação e escolheu-se uma voltagem a 100 V.
8. O gel foi visualizado e fotografado num transiluminador (Uvidoc).

III. 3.3- Determinação da concentração e do grau de pureza do DNA genómico extraído

A concentração do DNA genómico extraído foi determinada utilizando o equipamento NanoDrop 3.1.2 (ND-1000 Spectrophotometer). Esta concentração é calculada a partir da absorvância (A) no comprimento de onda de 260 nm. Para um DNA de cadeia dupla, uma medida de A a 260nm corresponde a uma concentração de 50 µg/mL, sendo o grau de pureza obtido pela razão A₂₆₀/A₂₈₀. As amostras que se encontram entre o intervalo 1.6-1.8 são

consideradas livres de contaminantes. Razões acima de 1.8 indicam contaminações com RNA e razões abaixo de 1.6 contaminações com proteínas (Chaves 2002).

III. 3.4- Reacção de PCR

A “Polymerase Chain Reaction” (PCR- Reacção em cadeia da polimerase) é uma reacção bioquímica catalizada pela enzima Taq DNA polimerase, onde um determinado fragmento de DNA ou RNA é amplificado milhares de vezes (Mullis 1990). Esta técnica é actualmente aplicada em muitas áreas de investigação, como por exemplo a biologia molecular, a medicina forense e a evolução, tendo sido concebida por Mullis em 1983 (Verma e Babu 1995).

Protocolo 6- Isolamento de sequências LINE-1 a partir de DNA genómico de CCR, PER e PTU por reacção PCR (Adaptado de Deuve *et al.* 2006)

1. O isolamento de sequências LINE-1 a partir de DNA genómico de CCR, PER e PTU, foi feita através da utilização de “primers” específicos para a amplificação de sequências LINE-1 (Deuve *et al.* 2006).
2. Preparou-se assim, a seguinte mistura de reacção para PCR em gelo (tabela 3):

Tabela 3 – Reacção de PCR para o isolamento de sequências LINE-1 a partir de DNA genómico de CCR, PER e PTU

Reagentes	Quantidade (µL)
DNA genómico (200-300 ng/µL)	1
Tampão PCR 10× [com (NH ₄) ₂ SO ₄] (MBI Fermentas)	5
Mistura de dNTP's (2.5 mM) (Gibco, Life Technologies)	4
MgCl ₂ a 25 mM (MBI Fermentas)	4
“primer” forward (1 µg/mL) ⁽¹⁾ Invitrogen, Life Technologies	1
“primer” reverse (1 µg/mL) ⁽²⁾ Invitrogen, Life Technologies	1
Água ultrapura	33
Homogeneizou-se a solução com um vortex e centrifugou-se	
Taq DNA polimerase (MBI fermentas)	1
Volume final	50

(1) LINE-1 F 5'-CCATGCTCATSGATTGG-3' e (2) LINE 1 R 5'-ATTCTRTTCCATTGGTCTA-3'

3. O programa utilizado é o descrito por Deuve *et al.* (2006), com algumas adaptações (ver tabela 4).

Tabela 4 – Programa de PCR (30 ciclos) para isolamento de sequências LINE-1 a partir de DNA genómico de CCR, PER E PTU

Temperatura	Tempo		Processo
94°C		10 min	Desnaturação inicial
94 °C	45 seg		Desnaturação
52°C	45 seg		“Annealing”
72°C	45 seg		Extensão
72°C		10 min	Extensão final
4°C		Pausa	Pausa

4. No final da reacção foi efectuada uma electroforese em gel de agarose (cf. protocolo 5), esperando-se a obtenção de uma banda com cerca de 290 bp (Deuve *et al.* 2006).

III. 3.5- Purificação de sequências LINE-1 de CCR, PER e PTU

Após o isolamento de sequências LINE-1 de CCR, PER e PTU (cf. protocolo 6), utilizou-se a electroforese em gel de agarose (c.f protocolo 5) para a separação dos fragmentos de DNA obtidos. Em seguida extraíram-se estes fragmentos do gel de agarose e procedeu-se à sua purificação usando-se o “kit” GeneClean[®] II (QBioGene MP Biomedicals). O método subjacente a este “kit” simplifica o processo de purificação, permitindo extrair fragmentos de DNA entre 200 bp a 20 Kb, ficando o DNA imediatamente disponível para uma variedade de aplicações.

Protocolo 7- Purificação de fragmentos de DNA a partir de géis de agarose [GeneClean[®] II (QBioGene MP Biomedicals)]

1. Extraíram-se as bandas do gel de agarose com um bisturi para um “eppendorf” de 1,5 mL. De acordo com o peso de cada banda, estimou-se o seu volume (100 mg corresponde a 100 µL).
2. Adicionou-se 0,5 volumes de TBE “modifier” e 4,5 volumes de iodeto de sódio (NaI). Incubaram-se as amostras a 55°C até a agarose dissolver completamente (cerca de 15 minutos).
3. Quando se confirmou que a agarose estava completamente dissolvida, adicionou-se a resina de sílica (“Glassmilk”), de acordo com o recomendado pelo “kit”.

4. Inverteram-se gentilmente os tubos e incubaram-se 15 minutos à temperatura ambiente, para permitir a ligação da sílica ao DNA (foi-se invertendo de vez em quando).
5. Centrifugou-se a 13200 rpm durante 2 minutos. Removeu-se o sobrenadante e reservou-se num novo tubo para garantir que não se perde o DNA, caso este não se tenha ligado à sílica.
6. Lavou-se o “pellet” com 500 μ L de “new wash” e ressuspendeu-se gentilmente no vortex. Centrifugou-se a 13200 rpm, durante 2 minutos, e rejeitou-se o sobrenadante. Repetiu-se a lavagem mais 2 vezes, removeu-se o sobrenadante e deixou-se secar o “pellet” à temperatura ambiente.
7. Adicionaram-se 10 a 50 μ L de água a 55°C ao “pellet” (a quantidade de água é igual à quantidade de “glassmilk” adicionada anteriormente) e ressuspendeu-se gentilmente (não deve ser feito no vortex nem com uma pipeta).
8. Centrifugou-se a 13200 rpm, durante 2 minutos, e transferiu-se o sobrenadante com o DNA para um novo tubo (1ª eluição). Voltou a adicionar-se água a 55°C ao “pellet”, ressuspendeu-se gentilmente e centrifugou-se a 13200 rpm durante 2 minutos. Transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo (2ª eluição).
9. No final da purificação foi feita uma electroforese em gel de agarose para confirmar o sucesso da purificação (cf. protocolo 5).

III. 3.6- Clonagem de sequências LINE-1 de CCR, PER e PTU no plasmídeo pCR 4-TOPO

O princípio da clonagem de fragmentos de DNA em vectores plasmídicos é bastante directo. O fragmento de DNA que se quer clonar é ligado “in vitro” ao DNA plasmídico, seguindo-se uma transformação em bactérias competentes com os plasmídeos recombinantes resultantes da ligação (Chaves 2002). Neste trabalho clonaram-se sequências LINE-1 de CCR, PER e PTU no plasmídeo denominado de pCR 4-TOPO (cf. figura 13).

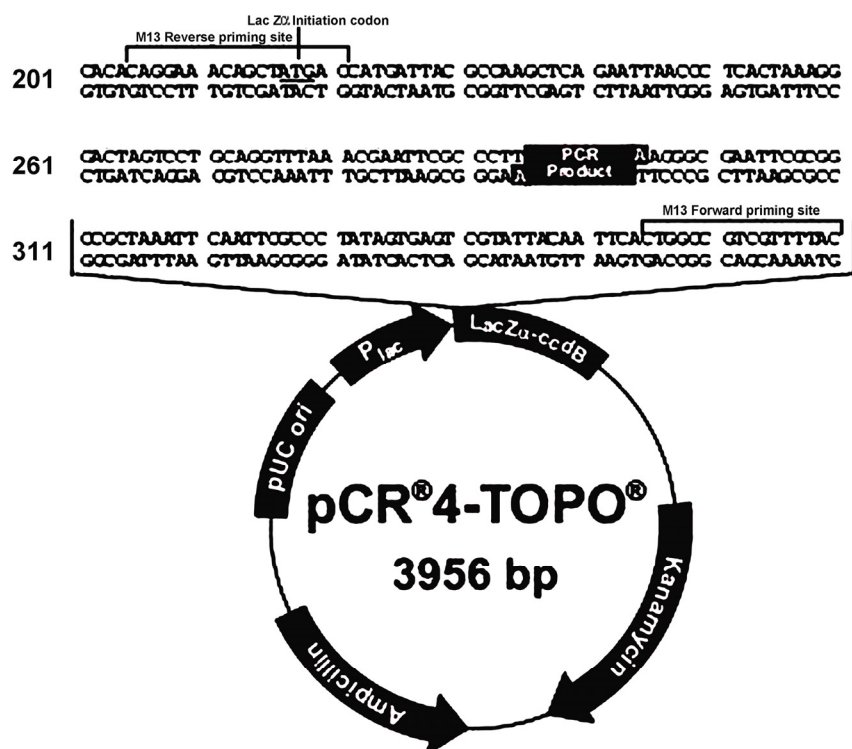


Figura 13- Mapa do vector pCR 4-TOPO. Adaptado do manual da Invitrogen Corporation (2006).

O vector pCR 4-TOPO permite a selecção directa dos recombinantes pela disrupção do gene letal *ccdB* (Bernard e Couturier 1992, Bernard *et al.* 1994), que se encontra ligado à região C-terminal do fragmento LacZα do vector. A ligação de um produto de PCR causa a disrupção da expressão do gene LacZα-*ccdB*, permitindo o crescimento dos recombinantes positivos.

Protocolo 8 – Clonagem, no plasmídeo pCR 4-TOPO, de sequências LINE -1 purificados a partir de gel de agarose [Topo TA Cloning[®] Kit for Sequencing (Invitrogen Life Technologies)]

Ligação do inserto (sequências LINE -1 de CCR, PER e PTU) ao vector pCR 4-TOPO

1. Preparação da reacção de ligação do inserto ao vector pCR 4-TOPO, como se descreve de seguida na tabela 5.

Tabela 5 – Reacção de ligação dos produtos amplificados por PCR ao vector pCR 4-TOPO

Reagentes	Quantidade (μL)
Produto de PCR	4
Solução salina (1,2M NaCl, 0,06 M MgCl ₂)	1
Água ultrapura	--
Vector pCR 4-TOPO (10ng/μL) (50% glicerol, 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 1mM EDTA, 2mM DTT, 0,1% Triton X-100, 100 μg/mL, 30 μM vermelho fenol)	1
Volume final	6

2. A mistura de reacção preparada no passo anterior foi cuidadosamente misturada e incubada durante 30 minutos, à temperatura ambiente.
3. Findo o tempo de incubação, a mistura foi colocada no gelo, ou guardada a -20°C (no caso de não se proceder de imediato à transformação).

Transformação das células TP10 com o vector pCR 4-TOPO ligado ao inserto

O meio de crescimento LB não é fornecido pelo “kit” sendo necessária a sua preparação [25 g LB (Invitrogen Life Technologies) e 1 L água ultrapura]. Ao LB foi adicionada kanamicina numa concentração recomendada de 50 μg/mL.

4. Adicionaram-se 2 μL da mistura de reacção de ligação a cada tubo de bactérias competentes TOP10 e misturou-se cuidadosamente (não misturar por pipetagem).
5. Incubou-se no gelo durante 30 minutos.
6. Realizou-se um “heat-shock” – os tubos foram colocados durante 30 segundos a 42°C, sem agitação, sendo depois transferidos de imediato para o gelo.
7. A cada tubo foram adicionados 250 μL de meio SOC à temperatura ambiente.
8. Os tubos foram agitados na posição horizontal, a 200 rpm a 37°C, durante 1 hora.
9. Plaquearam-se 10-50 μL de cada transformação em placas (caixas de “petri”) de meio Agar (Panreac Química S.A) LB-kanamicina (Invitrogen Life Technologies). Incubaram-se as placas a 37°C durante a noite.

Análise dos recombinantes

10. Analisaram-se as placas e escolheu-se 2 colónias de cada placa.
11. Cada colónia foi inoculada em 10 mL de meio LB - Kanamicina líquido (sem agar) com 50 μL de kanamicina. Incubaram-se as placas a 37°C durante a noite.
12. Foram feitos “stocks” da suspensão celular com os prováveis fragmentos clonados e congelaram-se a -20°C.
13. Prosseguiu-se com a extracção do DNA plasmídico.

III. 3.7- Extração de DNA plasmídico e isolamento da sequência anteriormente clonada

Neste trabalho a extração de DNA plasmídico foi realizada utilizando o “kit” designado por “Plasmid DNA Isolation from *E.coli*” [QuickGene Plasmid kit S (Fujifilm Life Science)]. Após a extração do DNA plasmídico, as sequências clonadas foram isoladas por PCR tendo-se utilizado “primers” universais específicos (M13), que se ligam ao vector perto do local de inserção (cf. figura 13).

Protocolo 9- Purificação de DNA plasmídico [Plasmid DNA Isolation from *E.coli*, QuickGene Plasmid kit S (Fujifilm Life Science)]

1. Transferiram-se 2 mL de cada cultura bacteriana transformada para um tubo “eppendorf” de 2 mL. Centrifugou-se a 13200 rpm durante 2 minutos e rejeitou-se o sobrenadante. Repetiu-se este procedimento mais duas vezes.
2. Adicionou-se 100 µL de RDP mix (100 µL de tampão de ressuspensão (RDP) + 3 µL de RNase A [(EDP-A) + 1 µL de RNase B (EDP-B)] preparado antes de usar. Vortexou-se à máxima velocidade e fez-se um “spin down”.
3. De seguida foram adicionados 100 µL de solução alcalina (ADP). Inverteram-se os tubos cerca de 5 vezes sem agitar e fez-se um “spin down” (este passo não deve demorar mais de 5 minutos).
4. Adicionaram-se 140 µL de tampão de neutralização (NDP). Inverteram-se os tubos cerca 5 vezes sem agitar. Centrifugou-se a 13200 rpm durante 10 minutos.
5. Transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo com 320 µL de tampão de lise (LDP).
6. Vortexou-se à máxima velocidade e fez-se um “spin down”. O lisado foi então transferido para o sistema automático de isolamento de ácidos nucleicos QuickGene-800 (Fujifilm Life Science), permitindo-se a lavagem e eluição do DNA.

III. 3.8- Sequenciação e análise de sequências LINE-1 de CCR, PER e PTU

Os insertos dos vários clones preparados (plasmídeos com sequências LINE-1 de CCR, PER e PTU inseridos) foram sequenciados em ambos os sentidos na empresa “Macrogen”. A análise *in silico* de sequências foi realizada utilizando uma ferramenta da base de dados “NCBI Blast”, designada por “NCBI BLAST Basic Local Alignment Search Tool” (www.ncbi.nlm.gov/Blast/), uma ferramenta da base de dados “Ensembl Multi Blast View”

(www.ensembl.org/Multi/blastview) e um software de bioinformática, Vector NTI Advance 10 (Invitrogen Life Technologies). A ferramenta da base de dados “NCBI Blast” (“NCBI BLAST Basic Local Alignment Search Tool”) permitiu o alinhamento das sequências obtidas neste trabalho, com todas as sequências de DNA que estão depositadas na base de dados “NCBI Nucleotide”, determinando as sequências que lhe são mais similares. A ferramenta do “Ensembl Multi Blast View” permitiu inferir sobre regiões de similaridade entre as sequências obtidas neste trabalho e o genoma de espécies índice como o *Mus musculus* (MMU) e o *Rattus norvegicus* (RNO). O software Vector NTI Advance 10 foi utilizado para obter um “contig” entre as duas cadeias de nucleótidos de cada sequência (Vector NTI Advance 10-ContigExpress), eliminar nos insertos sequências do vector de clonagem, determinar regiões de homologia entre as sequências em análise e os “primers” utilizados para o seu isolamento (Vector NTI Advance 10-Vector NTI) e conseguir alinhamentos entre sequências (Vector NTI Advance 10-AlignX).

As sequências LINE-1 de CCR, PER e PTU serão oportunamente depositadas na base de dados “NCBI Nucleotide” (www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez).

III. 4- Preparação de sondas para hibridação *in situ* fluorescente (FISH): LINE-1 de CCR, PER e PTU e “paint” do cromossoma X de *Rattus norvegicus*

Neste trabalho utilizaram-se dois tipos de sondas: sequências LINE-1 clonadas de CCR, PER e PTU (referidas antes) e uma sonda representativa de cromossoma X de RNO (RNOX) isolada por “Flow Sorting” (sonda de “painting” ou “Whole Chromosome Painting”). Esta última sonda foi gentilmente cedida pelo Doutor Johannes Wienberg e pela Doutora Andrea Kofler (Chrombios Molecular Cytogenetics, Germany). A utilização destes dois tipos de sondas teve como objectivo o estudo da evolução do cromossoma X em roedores.

III. 4.1- Marcação de sondas

As sondas utilizadas neste trabalho foram marcadas de forma indirecta por PCR, ou seja, pela incorporação na sua sequência de nucleótidos ligados a um “hapten” designado por digoxigenina-11-dUTP (Roche, Molecular Biochemicals), durante a sua amplificação. A sonda de “painting” RNOX foi marcada por DOP-PCR (“Degenerated Oligonucleotide Primed” – PCR), uma técnica de PCR modificada. A técnica de DOP-PCR consiste na utilização de um

“primer” universal (e.g. 6-MW), que é uma sequência parcialmente degenerada, num programa PCR que usa uma baixa temperatura de “annealing” nos primeiros ciclos de amplificação (Chaves 2002).

Posteriormente, as sondas marcadas foram submetidas a uma electroforese em gel de agarose. Espera-se que as sondas de sequências LINE-1 de CCR, PER e PTU clonados tenham um peso molecular de cerca de 400 bp, visto que os “primers” utilizados (“primers” M13) na sua marcação amplificam não só a sequência inserida (sequências LINE-1 de CCR, PER e PTU com cerca de 300 bp), como também algumas sequências do próprio vector (c.f figura 13). A sonda de “painting” marcada por DOP-PCR deve apresentar um “smear” entre os 200-2000 bp.

Protocolo 10- Marcação de sondas de sequências LINE-1 de CCR, PER e PTU por PCR (Técnica original de Schwarzacher e Heslop – Harrison 2000)

1. Os clones com as respectivas sequências inseridas, obtidos pelo protocolo 9, foram directamente usados para marcação por PCR. Preparou-se assim a seguinte mistura de reacção para PCR em gelo (cf. tabela 6):

Tabela 6 – Reacção de PCR para marcação de sondas de sequências LINE-1 de CCR, PER e PTU

Reagentes	Quantidade (µL)
DNA plasmídico (130-400 ng/µL)	4
Tampão PCR 10× [com (NH ₄) ₂ SO ₄] (MBI Fermentas)	5
Mistura de dNTP's ⁽¹⁾ (Gibco, Life Technologies)	5
MgCl ₂ a 25 mM (MBI Fermentas)	3
M13 forward (1 µg/mL) ⁽²⁾ (Invitrogen, Life Technologies)	1
M13 reverse (1 µg/mL) ⁽³⁾ (Invitrogen, Life Technologies)	1
Digoxigenina-11-dUTP (1mM)	1,5
Água ultrapura	28,5
Homogeneizou-se a solução com um vortex e centrifugou-se	
Taq DNA polimerase (MBI fermentas)	1
Volume final	50

(1) A mistura de nucleótídeos contém os nucleótídeos dATP, dCTP e dGTP a 2,0 mM e dTTP a 1,5 mM, (2) M13 F 5'-CCC AGT CAC GAC GTT GTA AAA CG-3' e (3) M13 R 5'-AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GG-3'

2. O programa empregue está apresentado na tabela seguinte (tabela 7).

Tabela 7 – Programa de PCR (30 ciclos) para marcação de sondas de sequências LINE-1 de CCR, PER e PTU

Temperatura	Tempo	Processo
94°C	5 min	Desnaturação inicial
94 °C	30 seg	Desnaturação
58°C	30 seg	“Annealing”
72°C	1:30 min	Extensão
72°C	5 min	Extensão final
4°C	Pausa	Pausa

3. No final da marcação por PCR foi feita uma electroforese em gel de agarose a 1,2 % (cf. protocolo 5), para confirmar se a amplificação foi bem sucedida.

Protocolo 11- Amplificação da sonda de “painting” RNOX por DOP-PCR (Técnica original de Telenius *et al.* (1992) modificada por Wienberg *et al.* (1997)

1. Preparou-se a seguinte mistura de reacção PCR, como se pode ver na tabela 8.

Tabela 8 – Reacção de DOP-PCR para obtenção da sonda de “painting” RNO X

Reagentes	Quantidade (µL)
Sequências cromossómicas amplificadas	5
Tampão PCR 10× TAPS	5
Mistura de dNTP's (2,5mM)	4
Detergente W1 a 0,1 % (p/v) (Sigma)	2,5
Primer universal 6-MW ⁽¹⁾ a 140 µM	2
Água ultrapura	30,5
Homogeneizou-se a solução com um vortex e centrifugou-se	
Taq DNA polimerase (MBI fermentas)	1
Volume final	50

(1) “primer” universal 6- MW, 5'- CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G-3', onde N = A, C, G ou T

2. O programa utilizado apresenta-se na tabela seguinte (tabela 9).

Tabela 9 – Programa de DOP-PCR (25 ciclos) para obtenção e marcação da sonda de “painting” RNO X

Temperatura	Tempo	Processo
94°C	9 min	Desnaturação inicial
94 °C	1 min	Desnaturação
62°C	1:30 min	“Annealing”
72°C	3 min	Extensão
72°C	10 min	Extensão final
4°C	Pausa	Pausa

24 Ciclos

- No final da marcação por DOP-PCR foi feita uma electroforese em gel de agarose a 1,5% (cf. protocolo 5, variando apenas a percentagem de agarose utilizada) para analisar se ocorreu amplificação.

Protocolo 12- Marcação da sonda de “painting” RNOX por DOP-PCR (Técnica de Wienberg *et al.* 1997)

- Preparou-se a seguinte mistura de reacção PCR, como se pode ver na tabela 10. O programa utilizado está apresentado na tabela 9.
- No final da marcação por DOP-PCR foi feita uma electroforese em gel de agarose a 1,5% para confirmar a amplificação (cf. protocolo 5, variando apenas a percentagem de agarose utilizada).

Tabela 10 – Reacção de PCR para marcação da sonda de “painting” RNOX

Reagentes	Quantidade (μL)
Produto de amplificação DOP-PCR	5
Tampão PCR 10× TAPS	5
Mistura de dNTP's para marcação ⁽¹⁾	5
Detergente W1 a 0,1 % (p/v) (Sigma)	2,5
Primer universal 6-MW ⁽²⁾ a 140 μM	2
Digoxigenina-11-dUTP (1mM)	1,5
Água ultrapura	28
Homogeneizou-se a solução com um vortex e centrifugou-se	
Taq DNA polimerase (MBI fermentas)	1
Volume final	50

(1) A mistura de nucleotídeos contém os nucleotídeos dATP, dCTP, e dGTP a 2,0 mM e dTTP a 1,5 mM e (2) “primer” universal 6- MW-5'-CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G-3', onde N = A, C, G ou T

Protocolo 13- Precipitação das sondas de sequências LINE-1 de CCR, PER e PTU

(Técnica utilizada no laboratório de Genômica Comparativa Funcional e Tecnológica do IBB/CGB-UTAD)

1. Depois de marcadas cada uma das sondas de sequências LINE-1 foi precipitada em 3 volumes de etanol a 100% previamente refrigerado a -20°C (45µL de sonda e 135 µL de etanol a 100%).
2. No dia seguinte centrifugou-se a mistura anterior a 14000 rpm, durante 30 minutos, numa microcentrífuga refrigerada a 0°C.
3. Rejeitou-se o sobrenadante e deixou-se secar o sedimento.
4. A sonda foi ressuspensa directamente em 30 µL de solução de hibridação (solução feita com 50% formamida em 2×SSC). Para que a sonda fique bem dissolvida na solução de hibridação, a mistura (sonda e solução hibridação) foi colocada durante cerca de 4 horas, com agitação frequente, num agitador a 37°C.

Protocolo 14- Precipitação da sonda de “painting” RNOX (Técnica usada no laboratório de Genômica Comparativa Funcional e Tecnológica do IBB/CGB-UTAD)

1. Antes da hibridação *in situ* fluorescente com uma sonda de “painting” é necessária a realização de um “preanneal” de modo a bloquear hibridações inespecíficas da sonda. Deste modo a precipitação da sonda de “painting” foi realizada como descrito na tabela 11. O Cot 1-DNA Mouse pré-híbrida durante o “preanneal” com as sequências repetitivas da sonda. Assim, após o “preanneal” a sonda de “painting” apenas hibrida com sequências de cópia única específicas de determinados cromossomas.

Tabela 11 – Preparação e precipitação da sonda de “painting” RNOX

Reagentes	Volume (µL)		
	CCR	PER	PTU
Sonda de “painting” marcada por DOP-PCR	25	25	20
DNA esperma de salmão (SS-DNA, Gibco, Life Technologies)	6	6	5
Cot 1-DNA Mouse (Gibco, Life Technologies)	10	10	10
Etanol a 100% (Amresco)	123	123	105
Volume Total	164	164	140

2. A partir deste momento procedeu-se como descrito nos pontos 2, 3 e 4 do protocolo 13. As únicas variações são a nível das quantidades de etanol e solução de hibridação adicionadas (105 a 164 e 7,5 µL, respectivamente).

III. 5- Hibridação *in situ* fluorescente de sequências LINE-1 de CCR, PER e PTU e da sonda de “painting” RNOX, em preparações cromossómicas de CCR, PER e PTU

A hibridação *in situ* fluorescente é uma técnica que permite a detecção de sequências de ácidos nucleicos, tanto DNA como RNA, em preparações citológicas. Este método foi primeiramente utilizado no mapeamento físico de sequências específicas ou genes nos cromossomas (Verma e Babu 1995). Actualmente, este método tem uma grande variedade de aplicações. Alguns exemplos são o mapeamento físico de sequências de DNA (cópia única, repetitivas, etc.), a identificação e caracterização de cromossomas ou segmentos cromossómicos, a detecção de rearranjos cromossómicos no genoma e, a detecção da presença e expressão de genes responsáveis por patologias nos eucariotas (Schwarzacher e Heslop – Harrison 2000).

Protocolo 15 – Hibridação *in situ* com sondas de sequências LINE-1 de CCR, PER e PTU (Técnica adaptada de Chaves 2002)

Envelhecimento e desidratação

1. Realizou-se o mesmo procedimento descrito nos pontos 1 e 2 do protocolo 1. As lâminas não foram fixadas (em formaldeído a 3% (v/v) em 1× PBS), pois observaram-se melhores resultados quando não se fixavam as lâminas.
2. De seguida as lâminas foram mergulhadas numa solução de etanol a 100%, previamente arrefecido a – 20 °C, durante 10 minutos, deixando-se secar ao ar.

Desnaturação das lâminas

3. Depois de secas, as lâminas foram desnaturadas tal como descrito nos pontos 11 e 12 do protocolo 2, variando apenas a temperatura e o tempo de incubação na solução de 70% formamida/2×SSC (72°C e 1 minuto, respectivamente).

Desnaturação da sonda

4. A sonda (já com solução de hibridação) foi desnaturada a 65°C, durante 15 minutos.

5. Decorrido este tempo foi transferida para o gelo, onde permaneceu até ser colocada na lâmina.

Hibridação *in situ*

6. Colocaram-se 7,5 μ L de sonda em cada “drop” da lâmina. Colocou-se uma lamela (22×22 mm) por cima, de modo a espalhar bem a sonda por todo o “drop”.
7. Incubaram-se as lâminas numa câmara húmida, durante a noite, a 37°C.

Lavagens pós-hibridação

8. No dia seguinte, retiraram-se as lamelas das lâminas num banho de 2×SSC a 37°C.
9. As lâminas foram então lavadas sequencialmente em banhos a 37°C de: 2× (50% Formamida/2×SSC) e 2×SSC, durante 5 minutos cada.
10. Transferiram-se as lâminas para uma solução de 4×T à temperatura ambiente.

Deteção

Este passo é necessário devido à marcação indirecta das sondas, sendo as sondas detectadas utilizando o anticorpo anti-digoxigenina-Rodamina (Roche, Molecular Biochemicals). Bloqueiam-se os locais inespecíficos, aos quais se ligaria este anticorpo, com uma solução bloqueadora.

11. Removeu-se o excesso de solução das lâminas (nunca se devem deixar secar as lâminas a partir deste passo, pois o sal pode precipitar causando “background”) e colocaram-se 100 μ L de solução bloqueadora [3% de BSA (Bovine Serum Albumin)]. Colocou-se uma lamela em cada lâmina e incubou-se durante cerca de 15 minutos à temperatura ambiente.
12. Entretanto preparam-se os anticorpos a uma diluição de 1:200 em 4×SSC. Os anticorpos assim preparados foram centrifugados a 13000 rpm, durante 10 minutos, passando o sobrenadante para um novo tubo protegido da luz (utiliza-se apenas o sobrenadante pois o precipitado dos anticorpos causa um enorme “background”).
13. Colocaram-se 80 μ L/lâmina de anticorpo diluído e incubou-se a 37°C durante 1 hora, numa câmara húmida.
14. Depois as lâminas foram lavadas três vezes em 4×T (5 minutos cada banho) à temperatura ambiente e protegidas da luz, com agitação frequente.

Montagem das lâminas

15. Retirou-se o excesso de solução das lâminas, sem nunca as deixar secar, sendo depois montadas como descrito no ponto 5 do protocolo 1.

III. 5.1- “Chromosome Painting”

Em 1994, Scherthan *et al.* demonstraram pela primeira vez que aumentando o tempo de hibridação e diminuindo a restringência, era possível aplicar “paints” representativos de cromossomas entre espécies diferentes, que divergiram há 50-80 milhões de anos (Ma) (Morais 2004). Um “paint” cromossômico é específico para um único cromossoma e hibrida com um cromossoma inteiro ou com diferentes segmentos cromossômicos em metafases alvos de outras espécies. Desta forma, a utilização do “Comparative Chromosome Painting” tem vindo a ser verificada na reconstrução das relações filogenéticas entre espécies (Wienberg *et al.* 2000).

Protocolo 16 – Hibridação *in situ* com a sonda de “painting” RNOX em preparações cromossômicas de CCR, PER e PTU (Técnica adaptada de Chaves 2002)

Envelhecimento, fixação e desidratação das lâminas

1. Realizou-se o mesmo procedimento descrito nos pontos 1 e 2 do protocolo 1 e nos pontos 7, 8, 9 e 10 do protocolo 2.

Desnaturação da sonda

2. A sonda foi desnaturada como descrito no ponto 4 do protocolo 15.
3. Decorrido este tempo a sonda foi transferida para uma incubadora, onde permaneceu 4 horas em “preanneal”, a 37°C sem agitação.

Desnaturação das lâminas

4. Antes de terminar o “preanneal”, as lâminas foram desnaturadas tal como descrito nos pontos 11 e 12 do protocolo 2, variando apenas o tempo de incubação na solução de 70% formamida/2×SSC (50 segundos).
5. Após confirmação de que as lâminas estavam completamente secas, prosseguiu-se com a hibridação “*in situ*” como descrito nos pontos 6-15 do protocolo 15, sendo apenas diferente o tempo de incubação das lâminas na câmara húmida (8 dias) e o tempo das lavagens pós-hibridação (3 minutos).

III. 6- Microscopia e análise de imagem

As preparações cromossômicas sujeitas aos diferentes procedimentos descritos neste capítulo foram observadas ao microscópio óptico de epifluorescência. O equipamento utilizado

na obtenção das imagens que serão analisadas no capítulo que se segue, possui as seguintes características: Microscópio Axioplan II (Zeiss), com lâmpada de mercúrio (HBO) de 100W, e uma câmara digital de alta resolução a cores AxioCam (Zeiss). O controlo da câmara e a aquisição da imagem digital (RGB, 8-bits por canal) foi feito por computador (PC-Pentium III). As imagens foram adquiridas com o software Axiovision Rel. 4.5 (Zeiss) e apresentam uma ampliação final de 1250×. As características dos filtros de fluorescência e respectivos fluorocromos utilizados encontram-se descritos na tabela 12.

Tabela 12 – Características dos filtros de fluorescência e respectivos fluorocromos

Microscópio Axioplan II (Zeiss)				
Fluorocromos	Exc. (nm)	Emis. (nm)	Filtro	Especificações
5- Carboxitetrametilrodamina (5TAMRA)	542	568	15 (Exc BP 546/12; BS. FT 580; Emis. Lp 590)	Excitação simples
4'-6 – “Diamidino – 2 – Phenylindole” (DAPI)	359	461	01 (Exc BP 365/12; BS. FT 395; Emis. Lp 397)	Excitação simples
Iodeto de Propídeo (PI)	536	617	15 (Exc BP 546/12; BS. FT 580; Emis. Lp 590)	Excitação simples

O processamento das imagens apresentadas neste trabalho foi realizado com o software Adobe Photoshop 5.0 (Adobe). Todos os tratamentos foram efectuados com funções que afectam igualmente toda a imagem.

III.7 – Distribuição de sequências repetitivas em tandem no cromossoma X de *Mus musculus* e sua correlação com a localização de “breakpoints” evolutivos

Um aspecto intrigante que surgiu dos estudos de genómica comparativa, foi a descoberta de que regiões de “breakpoints” evolutivos são ricas em sequências repetitivas, podendo existir uma relação entre a ocorrência de rearranjos cromossómicos e algumas repetições em tandem, como por exemplo [TA]_n (Kehrer-Sawatzki *et al.* 2005) e [TCTG]_n (Puttagunta *et al.* 2000). Assim, tendo em conta o que foi referido, foi analisada a correspondência entre a localização de regiões de “breakpoints” evolutivos, determinada pela sintenia entre cromossomas de *Mus musculus*, *Rattus norvegicus* e *Homo sapiens* [base de dados “Ensembl Mouse SyntenicView” (www.ensembl.org/Mus_musculus/syntenicview)], e a distribuição de sequências repetitivas em tandem no cromossoma X de *M. musculus*, cuja sequência completa pode ser consultada na base de dados “NCBI Genome” [Build 37 (www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez)]. Para se

conseguir tal objectivo foi utilizado o software de bioinformática designado por “Tandem Repeats Finder” [versão 4 (Benson 1999)], um algoritmo matemático que permitiu determinar a densidade e distribuição de sequências repetitivas em tandem ao longo de todo o cromossoma. Para aumentar a precisão da análise, fragmentos sequenciados do cromossoma X de *M. musculus* foram divididos em fragmentos de 250000bp, utilizado o “script” designado por Split_seq (“Bioperl Project”), sendo posteriormente analisados pelo software anterior. Para se ter uma ideia mais clara sobre a distribuição das sequências repetitivas em tandem ao longo do cromossoma X, utilizou-se um ideograma deste cromossoma disponível na base de dados “Ensembl Mouse ContigView” (www.ensembl.org/Mus-musculus/contigview), sobre o qual se irá colocar toda a informação fornecida pelo software “Tandem Repeats Finder”.

Capítulo IV

Resultados e Discussão de Resultados

RESULTADOS E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

IV. 1 – Resultados

IV. 1.1 – Descrição dos cariótipos de *Cricetus cricetus*, *Peromyscus eremicus* e *Praomys tullbergi*

O cariótipo de *C. cricetus* (CCR) é constituído por 11 pares de cromossomas, tendo sido descrito pela primeira vez por Matthey (1952), contudo o bandeamento-G e C só foi realizado, pela primeira vez, anos mais tarde por Fonctsch (1973) e Vistorin *et al.* (1976), respectivamente. O cariótipo de CCR é constituído por cinco pares de autossomas meta/submetacêntricos, quatro pares submetacêntricos e um par acrocêntrico, sendo o cromossoma X um meta/submetacêntrico grande (cf. figura 14). Como a linha celular utilizada foi estabelecida a partir de fibroblastos de uma fêmea, foi impossível a caracterização do cromossoma Y.

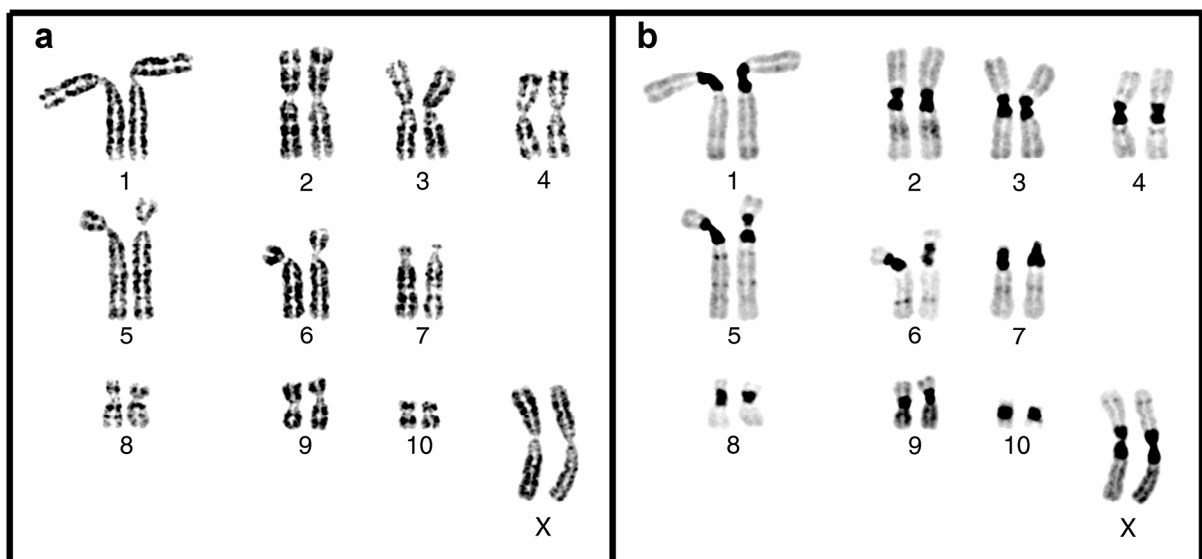


Figura 14- Cariótipo de *C. cricetus*. Identificação dos cromossomas está de acordo com Gamperl *et al.* (1976). (a) Bandeamento GTD (protocolo 1, capítulo III). (b) Bandeamento CBP (protocolo 3, capítulo III).

O cariótipo de *P. eremicus* (PER) ($2n=48$) foi descrito pela primeira vez por Hsu e Arrighi (1966). Os primeiros bandeamentos-G e C obtidos nestes cromossomas foram realizados por Pathak *et al.* (1973). Todos os cromossomas de PER são submetacêntricos, sendo o cromossoma X um submetacêntrico grande, e o cromossoma Y submetacêntrico pequeno (cf. figura 15).

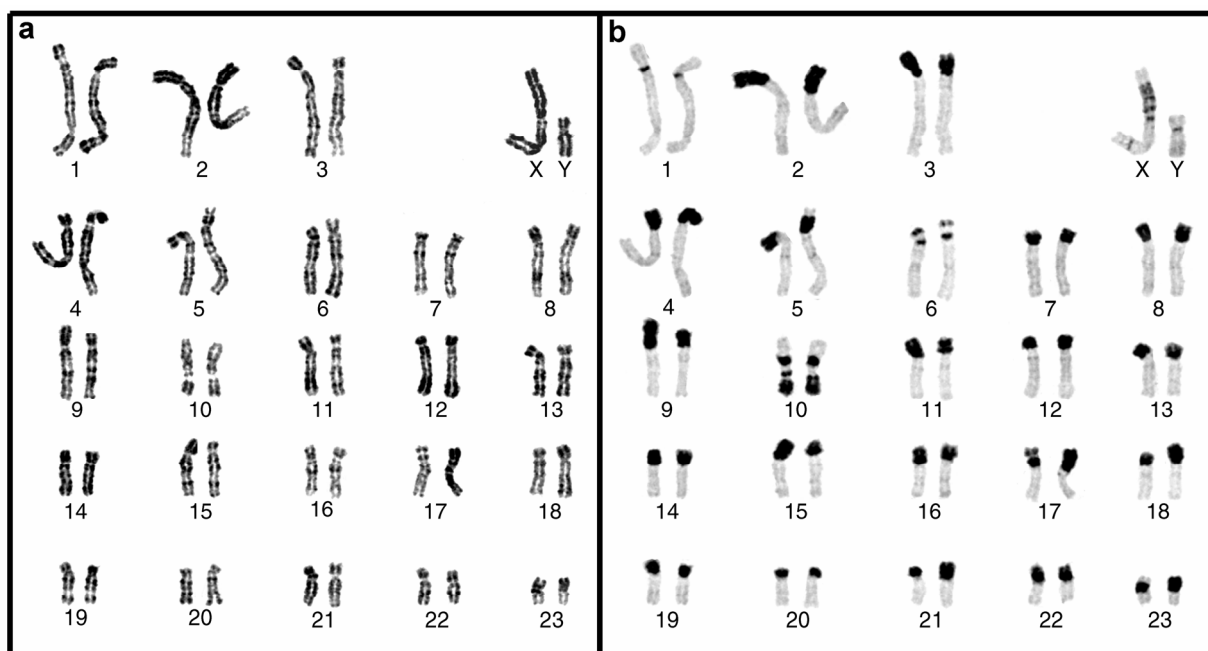


Figura 15- Cariótipo de *P. eremicus*. Identificação dos cromossomas de acordo Com. Comm. Stand. Chromos. *Peromyscus* (1977) (a) Bandejamento GTD (protocolo 1, capítulo III). (b) Bandejamento CBP (protocolo 3, capítulo III).

O cariótipo de *Praomys tullbergi* (PTU) é composto por 34 cromossomas (cf. figura 16), sendo todos os autossomas acrocêntricos. O cromossoma Y é um acrocêntrico pequeno e o cromossoma X um submetacêntrico grande (Matthey 1958, Qumsiyeh *et al.* 1990, Capanna 1996, Meles *et al.* 2007). Este cariótipo foi descrito pela primeira vez em 1958 (Matthey 1958), tendo o bandejamento-G e C sido realizado pela primeira vez em 1990 por Qumsiyeh *et al.*.

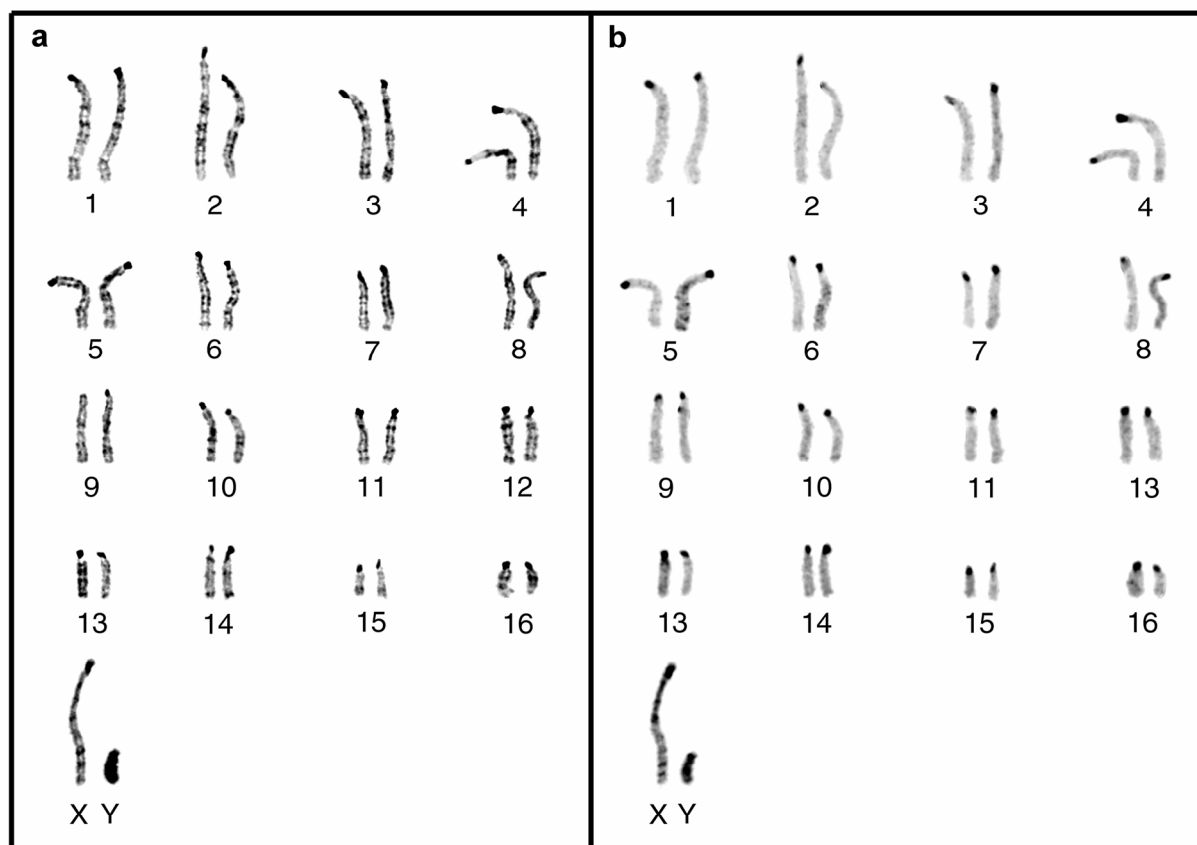


Figura 16- Cariótipo de *P. tullbergi*. Identificação dos cromossomas de acordo com Meles *et al.* (2007). (a) Bandejamento GTD (protocolo 1, capítulo III). (b) Bandejamento CBP (protocolo 3, capítulo III).

IV. 1.2 – Caracterização da heterocromatina constitutiva nos cromossomas de *Cricetus cricetus*, *Peromyscus eremicus* e *Praomys tullbergi*

Neste trabalho foi possível caracterizar a heterocromatina constitutiva (HC) dos cromossomas de *C. cricetus*, *P. eremicus* e *P. tullbergi*, utilizando a metodologia de restrição *in situ* e bandejamento-C sequencial. Ao utilizar esta metodologia, os cromossomas foram submetidos à acção de sete endonucleases de restrição (REs), nomeadamente AluI, ApaI, BamHI, DraI, HaeIII, PstI e RsaI (protocolo 2, capítulo III), seguida de bandejamento-C (protocolo 3, capítulo III). Na figura 17 podem ser visualizadas preparações cromossómicas de *C. cricetus*, *P. eremicus* e *P. tullbergi* submetidas à acção das endonucleases AluI, PstI e RsaI, respectivamente.

A restrição *in situ* resultante da acção de cada uma das sete RE produz um bandejamento tipo-G nos cromossomas das espécies analisadas (c.f figura 17), sendo este padrão de bandejamento útil para a identificação dos cromossomas. Embora a acção de cada uma das REs seja diferente obtendo-se um padrão de bandas característico, observaram-se padrões de

bandeamento semelhantes entre as diferentes enzimas. No entanto, algumas enzimas (ApaI, PstI e RsaI nos cromossomas de *C. cricetus*; BamHI, PstI e RsaI em *P. eremicus*, e HaeIII, PstI e RsaI em *P. tullbergi*) produzem um maior contraste entre bandas. A enzima AluI é talvez a enzima que produz o menor número de bandas, mas o maior contraste entre bandas, evidenciando significativamente a região centromérica na maioria dos cromossomas das três espécies estudadas, em comparação com as restantes regiões dos cromossomas. É importante referir que o padrão de bandeamento produzido por cada enzima é reprodutível e que estes cromossomas podem ser submetidos a procedimentos experimentais sequenciais sem perda da morfologia.

De um modo geral pode verificar-se que a HC se encontra principalmente nas regiões centroméricas dos cromossomas, mas também em regiões intersticiais e teloméricas [c.f figura 17 (lado direito da imagem)]. Nos indivíduos analisados foram detectados alguns polimorfismos heterocromáticos, tal como observado em cromossomas de porco (Adega *et al.* 2005) ou em cromossomas de algumas espécies pertencentes à família Tayassuidae (Adega *et al.* 2006), quando submetidos a este tipo de tratamento. Os polimorfismos detectados nos cromossomas das espécies em estudo não são relevantes para a análise relativa à caracterização da HC.

Todas as imagens obtidas, referentes ao bandeamento-G, bandeamento-C, bandeamento por restrição *in situ* e bandeamento-C após restrição *in situ* dos cromossomas das três espécies em análise, são apresentadas a preto e branco, para obtenção de um maior contraste e visualização mais nítida das bandas. Estas imagens são representativas da análise de pelo menos 35 metafases por cada enzima utilizada, tendo sido a restrição *in situ* repetida pelo menos, 5 vezes em diferentes períodos de tempo.

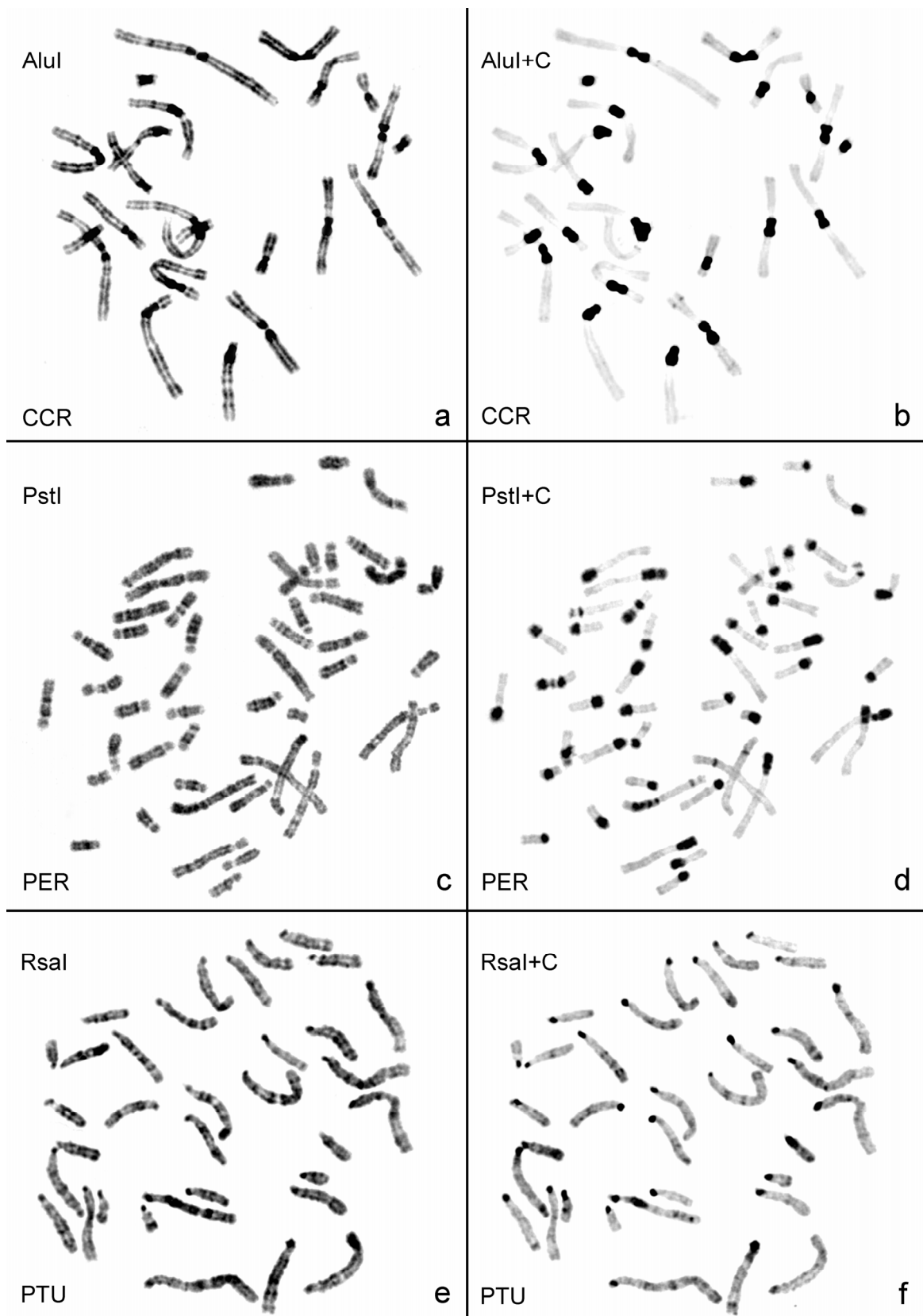


Figura 17- Imagem representativa de preparações cromossômicas de *C. cricetus*, *P. eremicus* e *P. tullbergi* submetidas à ação de endonucleases de restrição. Cromossomas de *C. cricetus* submetidos à ação da endonuclease AluI (a) e respectivo bandeamento-C (b). Cromossomas de *P. eremicus* submetidos à ação da endonuclease PstI (c) e respectivo bandeamento-C (d). Cromossomas de *P. tullbergi* submetidos à ação da endonuclease RsaI (e) e respectivo bandeamento-C (f).

IV. 1.2.1- Caracterização da heterocromatina constitutiva dos cromossomas de *Cricetus cricetus*

Os resultados da acção das diferentes endonucleases de restrição, ao nível sequências de heterocromatina constitutiva dos cromossomas de *C. cricetus*, estão resumidos na figura 18 e na tabela 13. Na figura 18, a coluna à esquerda apresenta os bandeamentos-G e C característicos de cada par cromossómico. Os cromossomas que se apresentam nesta coluna serviram de controlo na análise da acção de cada RE ao nível da HC. As bandas-C identificadas foram denominadas por letras (a, b, c, ...), de acordo com a sua localização nos cromossomas (do braço curto ao braço longo). A tabela 13 sumaria a avaliação da acção de cada RE utilizada neste trabalho ao nível da HC, por comparação entre os padrões de bandeamento-C após bandeamento-G (bandeamento-C clássico) e bandeamento-C realizado após restrição *in situ*.

Os cromossomas de *C. cricetus*, quando submetidos a bandeamento-C clássico, exibem uma exuberante banda de heterocromatina (peri)centromérica, que para a maioria dos cromossomas parece estar dividida em dois blocos [excepção para os cromossomas CCR7, CCR8 e CCR10 que parecem apresentar apenas um bloco de HC (cf. figura 18)]. É de realçar o grande bloco de HC no cromossoma CCR7 (banda a), o único cromossoma acrocêntrico deste cariótipo. Pode observar-se que todos os cromossomas, excepto os cromossomas CCR3, CCR8 e CCR 10 exibem bandas de HC intersticial e que os cromossomas CCR1, CCR3, CCR5, CCR6 e CCR9 exibem ainda bandas teloméricas de HC [cf. figura 18 e tabela 13 (CCR1 banda f, CCR3 bandas a e d, CCR5, CCR6 e CCR9 bandas a)].

Quando os cromossomas foram sujeitos a bandeamento-C após restrição *in situ*, foi possível detectar a heterogeneidade das sequências de HC, verificando-se que bandas-C (peri)centroméricas, intersticiais ou teloméricas apresentam uma diferente natureza molecular, exibindo diferentes padrões de restrição quando submetidas ao mesmo painel de REs. Ao comparar os padrões de bandeamento-C após bandeamento-G, com o bandeamento-C após restrição *in situ*, foi possível observar bandas-C reveladas apenas após acção das REs, tendo estas sido designadas por bandas crípticas (indicadas por setas na figura 18).

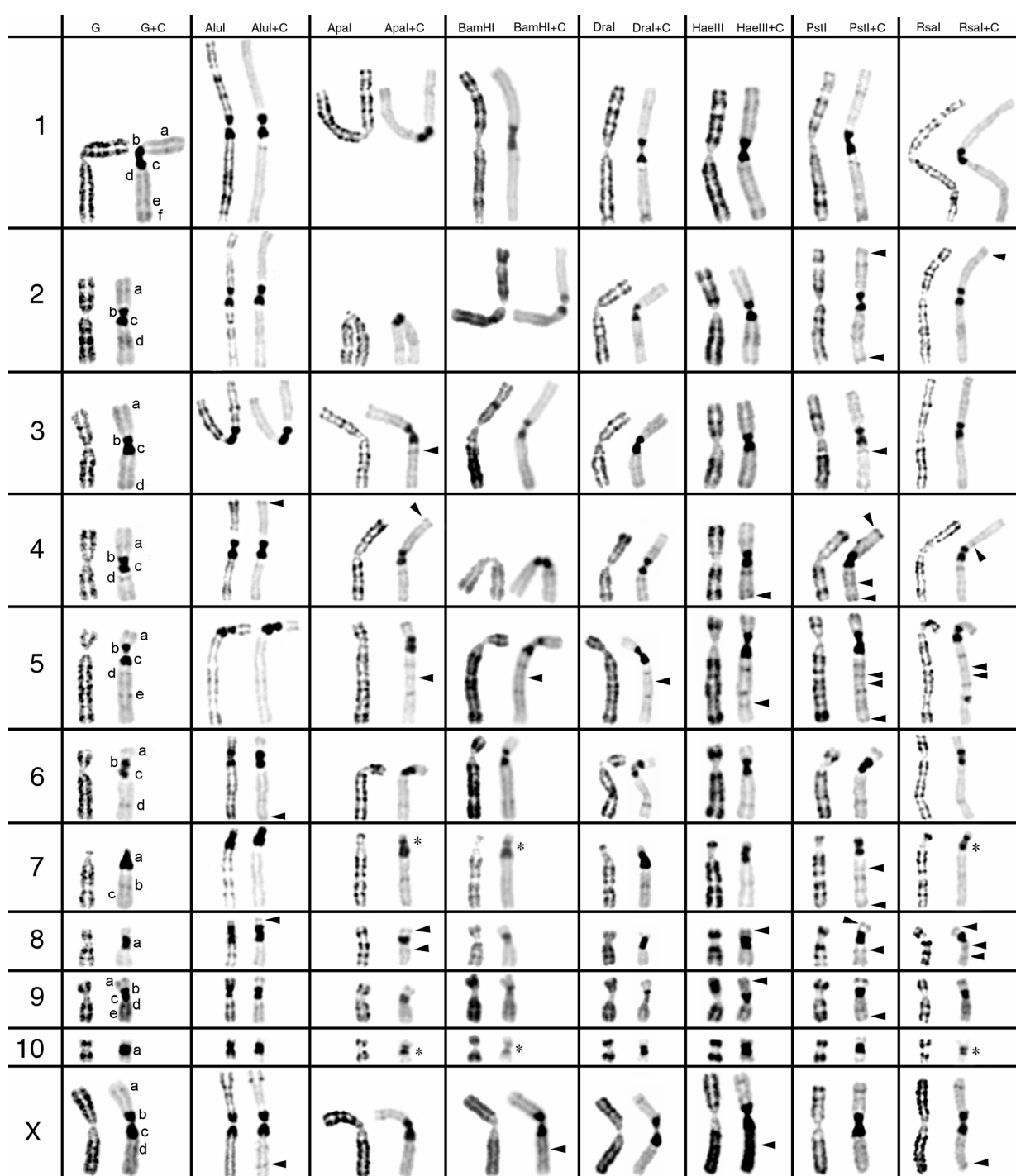


Figura 18 – Painel resumo da restrição *in situ* dos cromossomas de *C. cricetus* e bandeamento-C sequencial. Bandeamento-G e bandeamento-C característicos dos cromossomas de *C. cricetus* (coluna da esquerda). Bandas resultantes da acção de sete endonucleases de restrição (REs), antes e após bandeamento-C (restantes colunas). As setas indicam bandas de heterocromatina constitutiva apenas reveladas após a acção de REs nos cromossomas (bandas crípticas). Heterogeneidade intra bandas (*).

Tabela 13 – Avaliação da acção do painel de sete REs utilizadas para caracterizar a HC em cromossomas de *C. cricetus*

crom.	banda	Localiz.	AluI+C	ApaI+C	BamHI+C	DraI+C	HaeIII+C	PstI+C	RsaI+C
Bandas (peri)centroméricas nos autossomas (7 subclasses)									
1	b	(peri)centr	+	+	+	r	+	+	+
	c		+	+	+	+	+	+	+
2	b	(peri)centr	+	+	+	+	+	+	+
	c		+	+	+	+	+	+	+
3	b	(peri)centr	+	+	r	+	+	+	+
	c		+	+	r	+	+	+	+
4	b	(peri)centr	+	+	+	+	+	+	+
	c		+	+	+	+	+	+	+
5	b	(peri)centr	+	+	r	+	+	+	+
	c		+	+	+	+	+	+	+
6	b	(peri)centr	+	+	r	r	+	+	+
	c		+	+	r	r	+	+	+
7	a	(peri)centr	+	+	r	+	+	+	+
8	a	(peri)centr	+	+	r	+	+	+	+
9	b	(peri)centr	+	r	r	r	-	+	+
	c		+	r	r	r	+	+	+
10	a	(peri)centr	+	r	r	+	+	+	r
X	b	(peri)centr	+	+	+	+	+	+	+
	c		+	+	+	+	+	+	+
Bandas intersticiais nos autossomas (13 subclasses)									
1	a	intersticial	-	+	r	+	+	+	+
	d		+	r	r	+	+	+	+
	e		-	r	-	+	+	+	-
2	a	intersticial	-	-	-	r	-	+	r
	d		-	-	-	r	+	r	r
4	a	intersticial	-	-	-	+	+	+	-
	d		+	+	+	+	+	+	+
5	d	intersticial	-	+	+	+	+	+	+
	e		r	+	+	+	+	+	+
6	d	intersticial	r	+	+	+	+	+	+
7	b	intersticial	-	+	-	+	r	+	r
	c		-	+	-	-	r	+	-
9	d	intersticial	r	-	+	+	+	-	+
	e		-	-	+	+	-	+	+
Bandas teloméricas nos autossomas (6 subclasses)									
1	f	telomérica	r	+	r	+	+	+	r
3	a	telomérica	+	+	-	-	-	+	+
	d		+	r	+	+	+	r	+
5	a	telomérica	-	+	-	-	+	+	+
6	a	telomérica	+	+	-	-	+	+	+
9	a	telomérica	+	+	-	+	-	+	+
Bandas cromossomas X (3 subclasses: 1 centromérica e 2 intersticiais)									
X	b	(peri)centr	+	+	+	+	+	+	+
		(peri)centr	+	+	+	+	+	+	+
	a	intersticial	+	+	+	+	+	+	+
			+	+	-	r	+	+	+

Foram atribuídas diferentes classificações para a acção de uma determinada endonuclease em cada uma das bandas de HC identificadas nos vários cromossomas de CCR [presença de banda (+), ausência de banda (-) e banda de tamanho reduzido (r)].

Do painel das sete REs utilizadas neste trabalho, a endonuclease BamHI+C (acção da endonuclease BamHI seguida de bandeamento-C) foi aquela que de um modo geral, provocou um padrão de restrição mais acentuado nas sequências de HC dos cromossomas de *C. cricetus*. Salienta-se a acção desta enzima sobre as sequências de HC dos cromossomas CCR7, CCR8, CCR9 e CCR10, observando-se bandas menos intensas em comparação com os cromossomas controlo (c.f figura 18). Esta enzima, tal como as enzimas ApaI+C e RsaI+C, parece produzir uma divisão da banda de HC (peri)centromérica observada nos cromossomas CCR7 e CCR10 em duas bandas, o que sugere a existência de dois blocos de HC (peri)centromérica nestes cromossomas, em vez de um único bloco [c.f figura 18, bandas assinaladas com um asterisco (*)]. Algumas enzimas parecem ter provocado um padrão de restrição mais acentuado nas regiões de HC (peri)centromérica de alguns cromossomas, como por exemplo, as regiões de HC (peri)centromérica dos cromossomas CCR1 e CCR6 (bandas b e c) após a acção da enzima DraI+C, a região de HC (peri)centromérica do cromossoma CCR5 (bandas b) com a enzima BamHI+C e a região de HC (peri)centromérica do cromossoma CCR9 (bandas b e c) com as enzimas BamHI+C e DraI+C (c.f figura 18).

O bandeamento-C após bandeamento-G permitiu identificar nos cromossomas de *C. cricetus* (cf. figura 18) pelo menos três grandes classes de HC: (peri)centromérica, intersticial e telomérica. Com o bandeamento-C após restrição *in situ*, estas classes puderam ser diferenciadas em pelos menos 26 subclasses nos autossomas [7 (peri)centroméricas, 13 intersticiais e 6 teloméricas] e três subclasses no cromossoma CCRX [1 (peri)centromérica e 2 intersticiais] (cf. tabela 13). As diferentes subclasses são identificadas pelos diferentes padrões de restrição apresentados entre bandas-C, obtidos após a acção das diferentes REs.

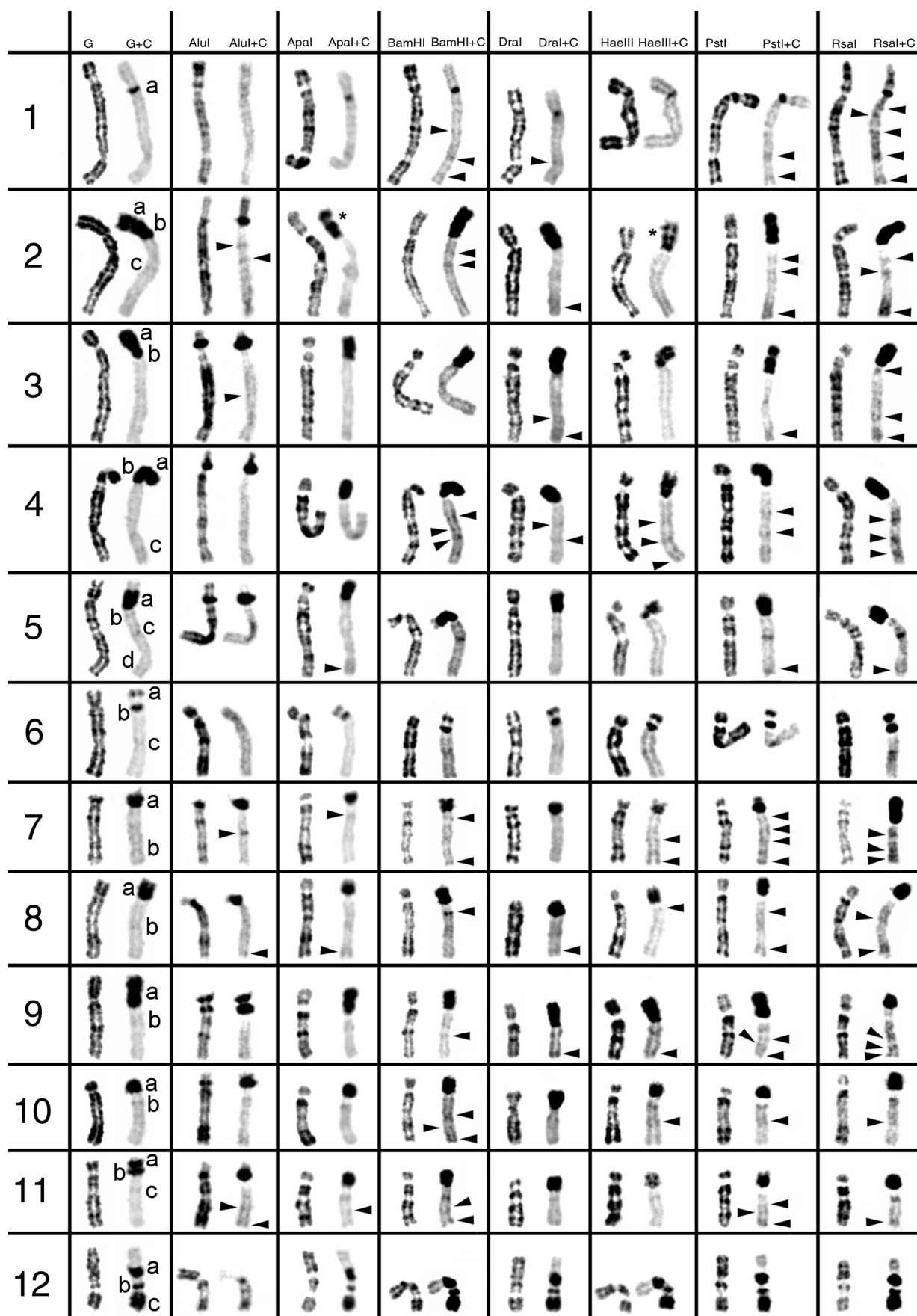
IV. 1.2.2- Caracterização da heterocromatina constitutiva dos cromossomas de *Peromyscus eremicus*

Os resultados da acção das diferentes endonucleases de restrição ao nível sequências de heterocromatina constitutiva dos cromossomas de *P. eremicus*, estão resumidos na figura 19 e na tabela 14, sendo estes resultados apresentados como na figura 18 e tabela 13 para os cromossomas de *C. cricetus*. Como se observa na figura 19, a maioria dos cromossomas de *P. eremicus* quando submetidos a bandeamento-C após bandeamento-G, exibe uma proeminente banda de HC (peri)centromérica, localizando-se esta em alguns dos cromossomas desde a região centromérica ao telómero do braço curto (destacam-se os cromossomas PER9 e PER17).

Noutros cromossomas, esta banda parece dividir-se em duas bandas, uma claramente centromérica e outra que ocupa quase todo o braço curto até ao telómero, como se pode observar nos cromossomas PER2, PER3 e PER4 (bandas a e b, cf. figura 19). Os cromossomas PER11 e PER16 parecem ter duas bandas de HC (peri)centromérica (bandas a e b), contudo esta observação não é conclusiva, devido ao pequeno tamanho dos seus braços curtos (cf. figura 19). Os cromossomas PER1 e PERY são talvez os cromossomas menos heterocromáticos. A situação observada no cromossoma PERY não é usual para a maioria das espécies de mamíferos, em que este cromossoma é normalmente o mais heterocromático de todo o complemento. Alguns cromossomas exibem ainda bandas de HC intersticiais, apresentando o cromossoma PERX o maior número destas bandas (pelo menos 7 bandas de HC intersticiais). Bandas-C teloméricas podem ser observadas em alguns cromossomas desta espécie [e.g. PER6, PER11, PER12, PER15 e PER16 (cf. figura 19)].

Quando se realizou bandeamento-C após restrição *in situ* nos cromossomas de *P. eremicus*, foi possível detectar a heterogeneidade da sua HC, verificando-se que bandas-C (peri)centroméricas, intersticiais ou teloméricas apresentam uma diferente natureza molecular, exibindo diferentes padrões de bandeamento quando submetidas ao painel de REs. As setas apresentadas na figura 19 assinalam a presença de bandas crípticas, com uma localização intersticial e telomérica. Das sete REs utilizadas neste trabalho, é a acção da enzima RsaI+C, seguida das enzimas PstI+C e BamHI+C que revela o maior número de bandas crípticas.

De uma forma geral, a enzima que produz um padrão de restrição mais acentuado na HC dos cromossomas de *P. eremicus* é a enzima AluI+C, o que é especialmente evidente nos cromossomas PER1 e PER6, verificando-se bandas de menor tamanho ou quase ausência de bandas-C em comparação com o controlo. A acção desta enzima nos cromossomas de *P. eremicus* é peculiar, permitindo uma grande redução no tamanho, deixando mesmo de se observar algumas bandas de HC, quase não afectando outras bandas (salientam-se as bandas de HC dos cromossomas PER7 e PER16).



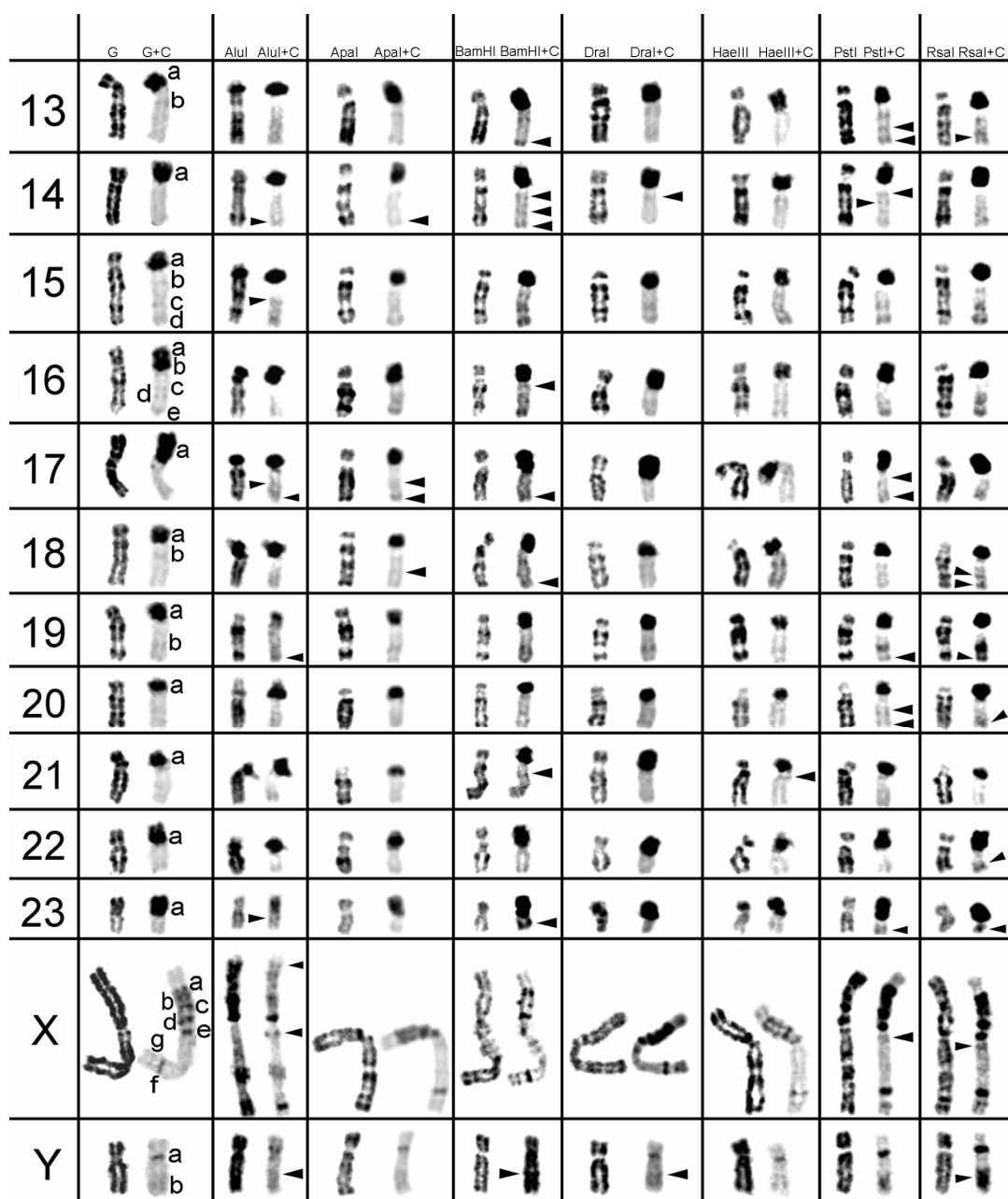


Figura 19 – Painel resumo da restrição *in situ* dos cromossomas de *P. eremicus* e bandeamento-C sequencial. Bandeamento-G e bandeamento-C característicos dos cromossomas de *P. eremicus* (coluna da esquerda). Bandas resultantes da acção de sete endonucleases de restrição (REs), antes e após bandeamento-C (restantes colunas). As setas indicam bandas de heterocromatina constitutiva apenas reveladas após a acção de REs nos cromossomas (bandas crípticas). Heterogeneidade intra bandas (*).

Tabela 14 – Avaliação da acção do painel de sete REs utilizadas para caracterizar a HC em cromossomas de *P. eremicus*

crom	banda	Localiz.	AluI+C	ApaI+C	BamHI+C	DraI+C	HaeIII+C	PstI+C	RsaI+C
Bandas (peri)centroméricas nos autosomas (7 subclasses)									
1	a	(peri)centr	r	+	+	+	+	+	+
2	b	(peri)centr	r	+	+	+	r	+	+
3	b	(peri)centr	-	+	+	+	+	+	+
4	b	(peri)centr	+	+	+	+	r	+	+
5	a	(peri)centr	+	+	+	+	+	+	+
6	b	(peri)centr	r	+	+	+	+	+	+
7	a	(peri)centr	+	+	+	+	r	+	+
8	a	(peri)centr	+	+	+	+	+	+	+
9	a	(peri)centr	+	+	+	+	+	+	+
10	a	(peri)centr	+	+	+	+	+	+	+
11	b	(peri)centr	+	+	+	+	r	+	+
12	a	(peri)centr	-	+	+	+	+	+	+
13	a	(peri)centr	+	+	+	+	+	+	+
14	a	(peri)centr	+	+	+	+	+	+	+
15	a	(peri)centr	+	+	+	+	+	+	+
16	b	(peri)centr	+	+	+	+	+	+	+
17	a	(peri)centr	r	r	+	+	r	+	+
18	a	(peri)centr	+	+	+	+	+	+	+
19	a	(peri)centr	r	+	+	+	+	+	+
20	a	(peri)centr	r	+	+	+	+	+	+
21	a	(peri)centr	+	+	+	+	+	+	+
22	a	(peri)centr	+	+	+	+	+	+	+
23	a	(peri)centr	r	+	+	+	+	+	+
Bandas intersticiais nos autosomas (13 subclasses)									
2	c	intersticial	+	+	+	+	r	+	+
4	c	intersticial	-	+	+	r	+	+	+
5	b	intersticial	+	-	+	r	r	r	+
	c		+	-	+	+	r	+	+
	d		-	-	-	-	+	-	+
6	c	intersticial	-	-	+	+	+	+	+
7	c	intersticial	-	-	+	+	+	+	+
8	b	intersticial	+	+	+	+	+	+	-
9	b	intersticial	-	+	+	+	+	+	+
10	b	intersticial	-	+	+	+	+	+	+
11	c	intersticial	+	+	+	+	+	+	+
12	b	intersticial	r	+	+	+	+	+	+
13	b	intersticial	r	+	+	+	-	+	+
15	b	intersticial	-	+	+	-	+	r	+
	c		-	+	+	+	+	+	+
16	c	intersticial	-	+	+	+	-	-	+
	d		-	+	+	+	+	+	+
18	b	intersticial	-	+	+	+	+	+	+
19	b	intersticial	+	+	+	+	+	+	+

Tabela 14 – Avaliação da acção do painel de sete Res utilizadas para caracterizar as sequências de heterocromatina constitutiva em cromossomas de *P. eremicus* (continuação)

Crom.	Banda	Localiz.	AluI+C	ApaI+C	BamHI+C	DraI+C	HaeIII+C	PstI+C	RsaI+C
Bandas (sub)teloméricas nos autossomas (6 subclasses)									
2	a	(sub)telom	r	+	+	+	r	+	+
3	a	(sub)telom	r	+	+	+	+	+	+
4	a	(sub)telom	r	+	+	+	r	+	+
6	a	(sub)telom	r	+	+	+	+	+	+
11	a	(sub)telom	-	+	+	+	r	+	+
12	c	(sub)telom	r	+	+	+	+	+	+
15	d	(sub)telom	+	+	+	+	+	+	+
16	a	(sub)telom	+	+	+	+	r	+	+
	e		-	+	+	+	+	+	+
Bandas cromossoma X (3 subclasses: 1 centromérica e 2 intersticiais)									
X	e	centromérica	+	+	+	+	+	+	+
	a	intersticial	+	+	+	+	+	+	+
	b		+	+	+	+	+	+	+
	c		+	+	+	+	+	+	+
	d		+	+	+	+	+	+	+
	f		-	+	+	+	+	+	+
	g		+	+	+	+	+	+	+
Bandas cromossoma Y (2 subclasses: 1 centromérica e 1 telomérica)									
Y	a	centromérica	+	+	+	+	+	+	+
	b	telomérica	+	+	+	+	+	+	+

A HC dos braços curtos dos cromossomas PER2, PER3 e PER4, é de particular interesse no que respeita à sua natureza molecular. Nestes braços heterocromáticos a HC exhibe uma grande heterogeneidade, o que é verificado pelos diferentes padrões de restrição produzidos pelas diferentes enzimas ao nível das sequências de HC. No braço curto do cromossoma PER2 foram reconhecidas duas bandas de HC após bandeamento-C sequencial a bandeamento-G (bandas a e b), contudo, após a acção da enzima AluI+C observou-se uma menor intensidade de uma destas bandas (banda a). A acção das enzimas ApaI+C e HaeIII+C evidenciou a presença de uma terceira banda nestes braços cromossómicos, que parece ter resultado da divisão de uma das anteriores [cf. figura 19, bandas assinaladas com um asterisco (*)].

Também nos cromossomas de *P. eremicus* (cf. figura 19) foi possível identificar três grandes classes de HC: (peri)centromérica, intersticial e telomérica. Com a utilização das sete enzimas de restrição, estas classes de HC foram diferenciadas em pelo menos 26 subclasses nos autossomas [7 na região (peri)centromérica, 13 intersticialmente e 6 nas regiões teloméricas], três subclasses no cromossoma PERX (1 centromérica e 2 intersticiais) e duas subclasses no cromossoma PERY (1 centromérica e 1 telomérica) (cf. tabela 14).

IV. 1.2.3- Caracterização da heterocromatina constitutiva dos cromossomas de *Praomys tullbergi*

Os resultados da acção das diferentes endonucleases de restrição ao nível sequências de heterocromatina constitutiva dos cromossomas de *P. tullbergi*, estão sumariados na figura 20 e na tabela 15, sendo estes resultados apresentados como na figura 18 e tabela 13 para os cromossomas de *C. cricetus*. Das três espécies estudadas, a espécie *P. tullbergi* é aquela cujos cromossomas exibem menos HC centromérica, quando sujeitos a bandeamento-C após bandeamento-G (c.f figura 20). Nestes cromossomas, tal como nos cromossomas das outras duas espécies, foi possível identificar três classes de HC: centromérica, intersticial e telomérica. Em alguns cromossomas, a HC intersticial é quase tão abundante como a centromérica, contrariamente ao observado para a maioria dos cromossomas das outras duas espécies analisadas. No entanto, os cromossomas PTU5 e PTU10 (controlo) apresentam uma pequena banda de HC centromérica, não apresentando bandas de HC intersticiais. A maioria dos cromossomas apresenta várias bandas de HC intersticial, sendo os cromossomas PTU1 e PTU2 os que apresentam o maior número destas bandas. Em alguns cromossomas são claramente identificadas bandas de HC telomérica, como por exemplo nos cromossomas PTU10, PTU12 ou PTU15 (cf. figura 20). O cromossoma PTUX também apresenta três classes distintas de HC: centromérica, intersticial e telomérica. O cromossoma PTUY exhibe uma banda centromérica e duas intersticiais.

A restrição cromossómica com um painel de sete enzimas de restrição seguida de bandeamento-C, revelou uma elevada heterogeneidade da HC nos cromossomas desta espécie, tal como foi descrito para as outras duas espécies de roedores estudadas neste trabalho. De uma forma geral, das sete enzimas utilizadas neste trabalho, a enzima AluI+C é a que produz o maior contraste entre as classes de HC centromérica *versus* intersticial/telomérica, ou seja, após a acção desta enzima observam-se bandas de menor tamanho, ou ausência de bandas de HC intersticial/telomérica, enquanto simultaneamente a HC centromérica é evidenciada (cf. figura 20). São de destacar os cromossomas PTU15 e PTU16, onde quase não se observa HC centromérica após bandeamento-C sequencial a bandeamento-G, estando estas sequências significativamente evidenciadas após bandeamento-C sequencial à acção da enzima AluI. A enzima DraI+C parece evidenciar a HC telomérica, como se pode observar nos cromossomas PTU 7 ou PTU 16.



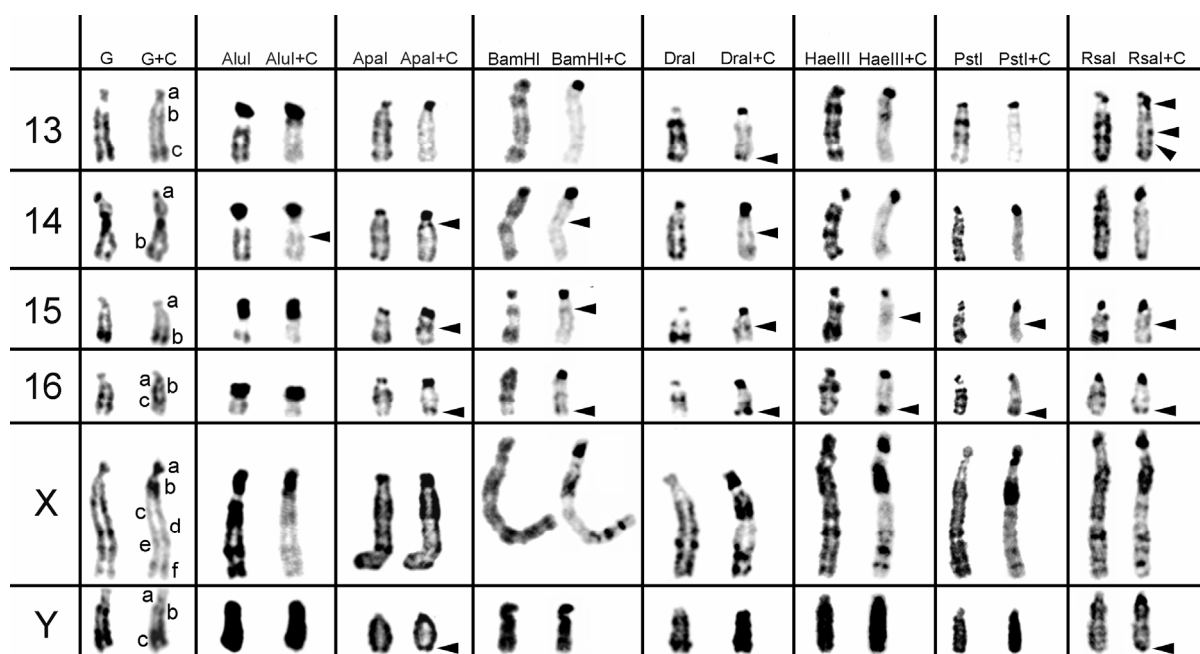


Figura 20- Painel resumo da restrição *in situ* dos cromossomos de *P. tulbergi* e bandeamento-C sequencial. Bandeamento-G e bandeamento-C característicos dos cromossomos de *Praomys tullbergi* (coluna da esquerda). Bandas resultantes da ação de sete endonucleases de restrição (REs), antes e após bandeamento-C (restantes colunas). As setas indicam bandas de heterocromatina constitutiva apenas reveladas após a ação de REs nos cromossomos (bandas crípticas).

A enzima RsaI+C parece ser a enzima que produziu um bandeamento mais similar ao controle, induzindo no entanto a ocorrência de bandas crípticas, como se pode observar nos cromossomos PTU4, PTU5, PTU10, ou PTUX (cf figura 20). A presença de bandas crípticas também foi demonstrada para outras enzimas, especialmente a DraI+C, BamHI+C ou HaeIII+C.

Nos cromossomos de *P. tullbergi* a utilização do painel de sete enzimas de restrição, permitiu diferenciar as três classes de HC em pelo menos 45 subclasses nos autossomos (2 na região centromérica, 35 intersticiais e 8 na região telomérica), 4 subclasses no cromossoma PTUX (1 centromérica e 3 intersticiais) e três no cromossoma PTUY (1 centromérica e 2 intersticiais), como se pode observar na tabela 15.

Tabela 15 – Avaliação da acção do painel de sete REs utilizadas para caracterizar as sequências de HC em cromossomas de *P. tullbergi*

Crom	banda	Localiz.	AluI+C	ApaI+C	BamHI+C	DraI+C	HaeIII+C	PstI+C	RsaI+C
Bandas centroméricas nos autosomas (2 subclasses)									
1	a	centromérica	+	+	+	r	+	+	+
2	a	centromérica	+	+	+	+	+	+	+
3	a	centromérica	+	+	+	+	+	+	+
4	a	centromérica	+	+	+	+	+	+	+
5	a	centromérica	+	+	+	+	+	+	+
6	a	centromérica	+	+	+	+	+	+	+
7	a	centromérica	+	+	+	+	+	+	+
8	a	centromérica	+	+	+	+	+	+	+
9	a	centromérica	+	+	+	+	+	+	+
10	a	centromérica	+	+	+	+	+	+	+
11	a	centromérica	+	+	+	+	+	+	+
12	a	centromérica	+	+	+	+	+	+	+
13	a	centromérica	+	+	+	+	+	+	+
14	a	centromérica	+	+	+	+	+	+	+
15	a	centromérica	+	+	+	+	+	+	+
16	a	centromérica	+	+	+	+	+	+	+
Bandas Intersticiais nos autosomas (35 subclasses)									
1	b	intersticial	+	+	-	+	-	r	-
	c		+	+	+	+	+	r	-
	d		-	-	+	+	r	+	+
	e		+	+	+	+	+	+	+
	f		-	+	-	r	r	+	+
	g		+	+	-	r	+	+	+
2	b	intersticial	-	r	+	-	-	-	r
	c		-	r	+	-	+	+	+
	d		+	-	+	+	r	+	+
	e		-	-	+	+	+	+	+
	f		r	+	+	+	+	+	-
	g		r	+	+	+	+	+	-
3	b	intersticial	-	-	+	-	+	+	+
	c		-	-	+	+	+	+	+
	d		-	-	-	r	r	+	+
	e		-	-	-	+	+	+	-
	e		-	-	-	+	+	+	-
4	b	intersticial	+	+	+	+	+	+	-
	c		+	+	+	+	-	-	-
6	b	intersticial	+	+	+	r	-	+	-
	c		-	+	-	-	+	+	-
	d		-	-	-	+	-	-	+
7	b	intersticial	-	-	r	-	-	r	-
	c		-	-	+	-	-	+	+
	d		-	+	+	+	+	r	+
8	b	intersticial	-	-	-	-	-	-	+
	c		-	+	+	-	-	+	+
	d		-	+	r	+	r	+	+
9	b	intersticial	+	+	+	-	+	+	+
	c		+	+	+	+	+	-	+
	d		+	+	+	+	+	+	+
	e		+	+	+	-	-	+	-
11	b	intersticial	-	+	+	+	r	+	+
	c		-	+	+	+	r	+	+

Tabela 15 – Avaliação da acção do painel de sete Res utilizadas para caracterizar as sequências de HC em cromossomas de *P. tullbergi* (continuação)

Crom	banda	Localiz.	AluI+C	ApaI+C	BamHI+C	DraI+C	HaeIII+C	PstI+C	RsaI+C
Bandas Intersticiais nos autossomas (35 subclasses) continuação									
12	b	intersticial	-	r	-	r	r	-	r
13	b	intersticial	+	-	-	+	+	-	+
	c		r	-	-	-	-	-	+
14	b	intersticial	r	+	-	+	+	-	+
16	b	intersticial	+	+	-	-	-	+	r
	c		-	r	+	+	-	+	+
Bandas teloméricas dos autossomas (8 subclasses)									
1	h	telomérica	+	+	+	r	+	r	+
2	h	telomérica	-	-	r	+	-	+	-
4	d	telomérica	r	+	r	+	-	-	-
5	b	telomérica	+	-	+	-	-	-	+
8	e	telomérica	-	+	r	+	r	+	+
10	b	telomérica	r	+	+	+	-	+	+
12	c	telomérica	-	+	+	+	+	+	-
15	b	telomérica	-	r	-	-	-	-	r
Bandas do cromossoma X (4 subclasses: 1 centromérica e 3 intersticiais)									
X	a	centromérica	+	+	+	+	+	+	+
	b	intersticial	r	+	+	+	+	+	+
	c		r	+	+	+	+	+	+
	d		+	+	+	+	+	+	+
	e		+	+	+	+	+	-	+
	f		r	+	+	+	+	+	+
Bandas do cromossoma Y (3 subclasses:1 centromérica e 2 Intersticiais)									
Y	a	centromérica	+	+	+	+	+	+	+
	b	intersticial	+	+	+	+	+	+	+
	c		+	+	+	+	+	+	r

IV. 1.3 – Análise molecular e citogenética de sequências LINE-1 de *Cricetus cricetus*, *Peromyscus eremicus* e *Praomys tullbergi*

A sequência completa LINE-1 (“Long Interspersed Nuclear Elements-1”) tem aproximadamente 7000bp, contendo duas “untranslated regions” (3’-UTR e 5’-UTR) e duas “open reading frames” (ORFI e ORFII) (Mayorov *et al.* 1999).

Neste trabalho foi possível isolar (protocolo 6 capítulo II), clonar (protocolo 8 capítulo II) e sequenciar pela primeira vez, um fragmento da ORFII da sequência LINE-1 de *Cricetus cricetus* (CCR L1), *Peromyscus eremicus* (PER L1) e *Praomys tullbergi* (PTU L1), com cerca de 300bp. A análise molecular destes fragmentos, onde foi feita a comparação entre as sequências das três espécies estudadas e outras sequências LINE-1 de roedores presentes na base de dados “NCBI Nucleotide”, permitiu estabelecer considerações sobre as relações filogenéticas entre as diferentes espécies analisadas.

Lyon (1998), propôs pela primeira vez o envolvimento das sequências LINE-1 na inativação do cromossoma X, ao observar uma localização preferencial destas sequências nos cromossomas X do Homem e rato, em comparação com os autossomas. O mapeamento físico (análise citogenética) das sequências LINE-1 de *C. cricetus*, *P. eremicus* e *P. tullbergi* nos respectivos cromossomas, possibilitou estabelecer considerações sobre o possível envolvimento das sequências LINE-1 na inativação do cromossoma X.

IV. 1.3.1- Análise molecular das sequências LINE-1 de *Cricetus cricetus*, *Peromyscus eremicus* e *Praomys tullbergi*

A análise da sequência LINE-1 de *C. cricetus* (CCR L1) utilizando uma ferramenta da base de dados “NCBI Blast” (“NCBI BLAST Basic Local Alignment Search Tool”), permitiu observar uma elevada similaridade entre esta sequência e uma região da ORFII das sequências LINE-1 (ORFII L1) de *Microtus arvalis* (acima de 83%), *Nectomys squamipes* (acima de 80%), *Rhipidomys nitela* e *Sigmodon hispidus* (acima de 78%), todas pertencentes à família Cricetidae. Observou-se também grande similaridade desta sequência com a sequência parcial LINE-1 de *Microtus cabreræ* (acima de 82%), pertencente à mesma família. Utilizando a mesma ferramenta foi possível observar elevada similaridade entre a sequência LINE-1 de *P. eremicus* (PER L1) e uma região da ORFII L1 de *Peromyscus californicus* (acima de 92%), *Peromyscus nudipes*, *Peromyscus maniculatus*, *Peromyscus leucopus* e *Reithrodontomys fulvescens* (acima de 89%), todos pertencentes à família Cricetidae, e a maioria das espécies pertencente ao género *Peromyscus*. Da mesma forma, a sequência LINE-1 de *P. tullbergi* (PTU L1) revelou elevada similaridade com sequências que estão dispersas em todos os cromossomas de *Mus musculus*, oscilando os valores de similaridade entre os 87 a 89%.

Ao utilizar uma ferramenta da base de dados “Ensembl Multi Blast View”, foi possível fazer uma análise preliminar sobre a localização nos cromossomas de *Mus musculus* de regiões de similaridade com as sequências de CCRL1, PERL1 e PTUL1 (cf. figuras 21a, 22a e 23a, regiões de similaridade evidenciados por setas). Utilizando a mesma ferramenta foi também possível localizar nos cromossomas de *Rattus norvegicus* regiões de similaridade com estas sequências (cf. figuras 21b, 22b e 23b). Este tipo de análise, embora de baixa resolução, permite retirar algumas conclusões, observando-se que as três sequências isoladas neste trabalho apresentam similaridade com sequências “interspersed” nos genomas das duas espécies índice. Para além disso, observou-se uma maior coincidência entre regiões de

similaridade com os genomas das duas espécies índice entre as sequências CCR L1 e PER L1. As sequências PER L1 e PTU L1 apresentam uma maior coincidência entre regiões de similaridade com os genomas das duas espécies índice, em comparação com as sequências CCR L1 e PTU L1.

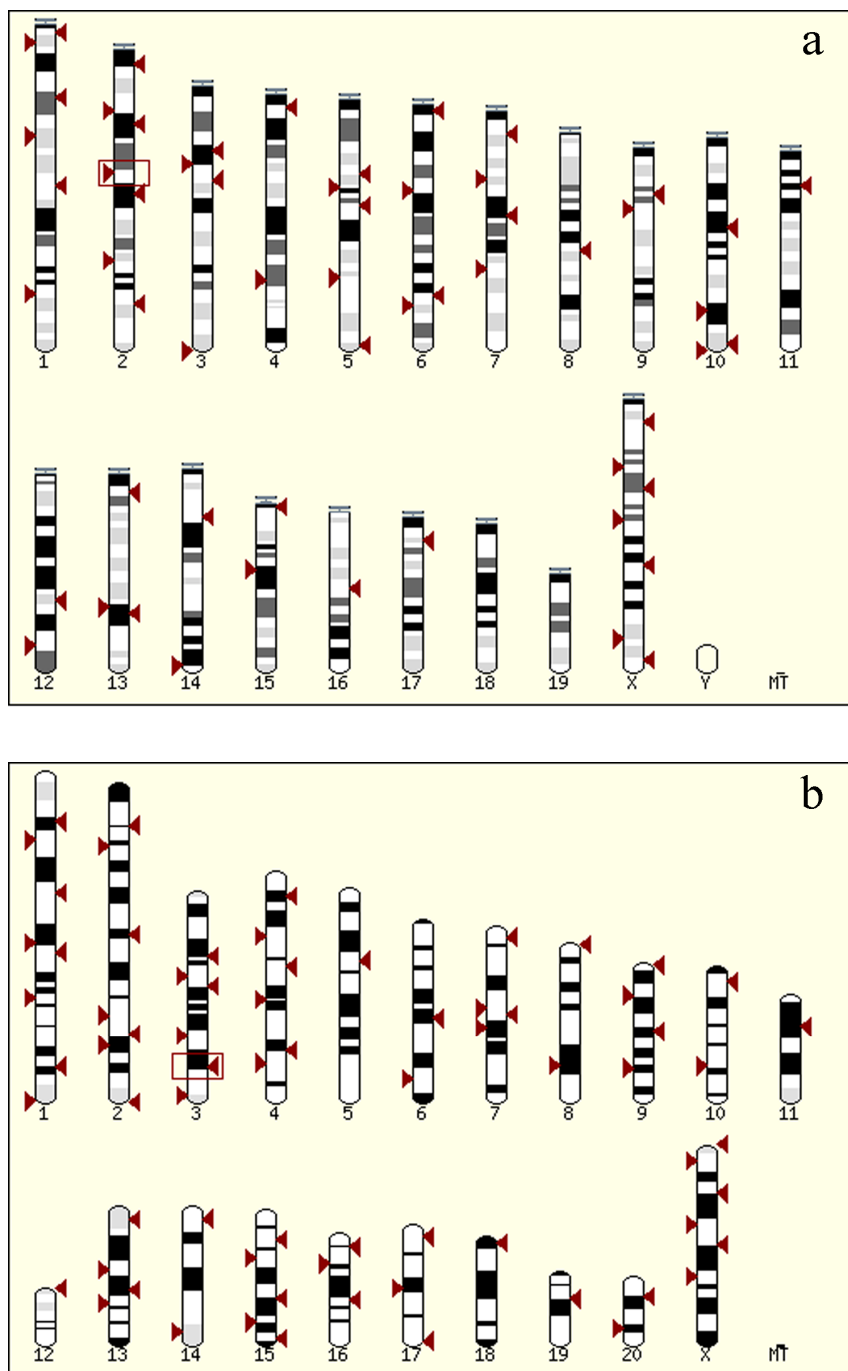


Figura 21 – Regiões similaridade entre a sequência LINE-1 de *C. cricetus* (CCR L1) com o genoma de *M. musculus* (a) e *R. norvegicus* (b) utilizando uma ferramenta bioinformática “Ensembl Multi Blast View” (regiões evidenciadas por setas). A região evidenciada com um quadrado corresponde à região que apresenta maior similaridade com a sequência CCR L1. MT- genoma mitocondrial

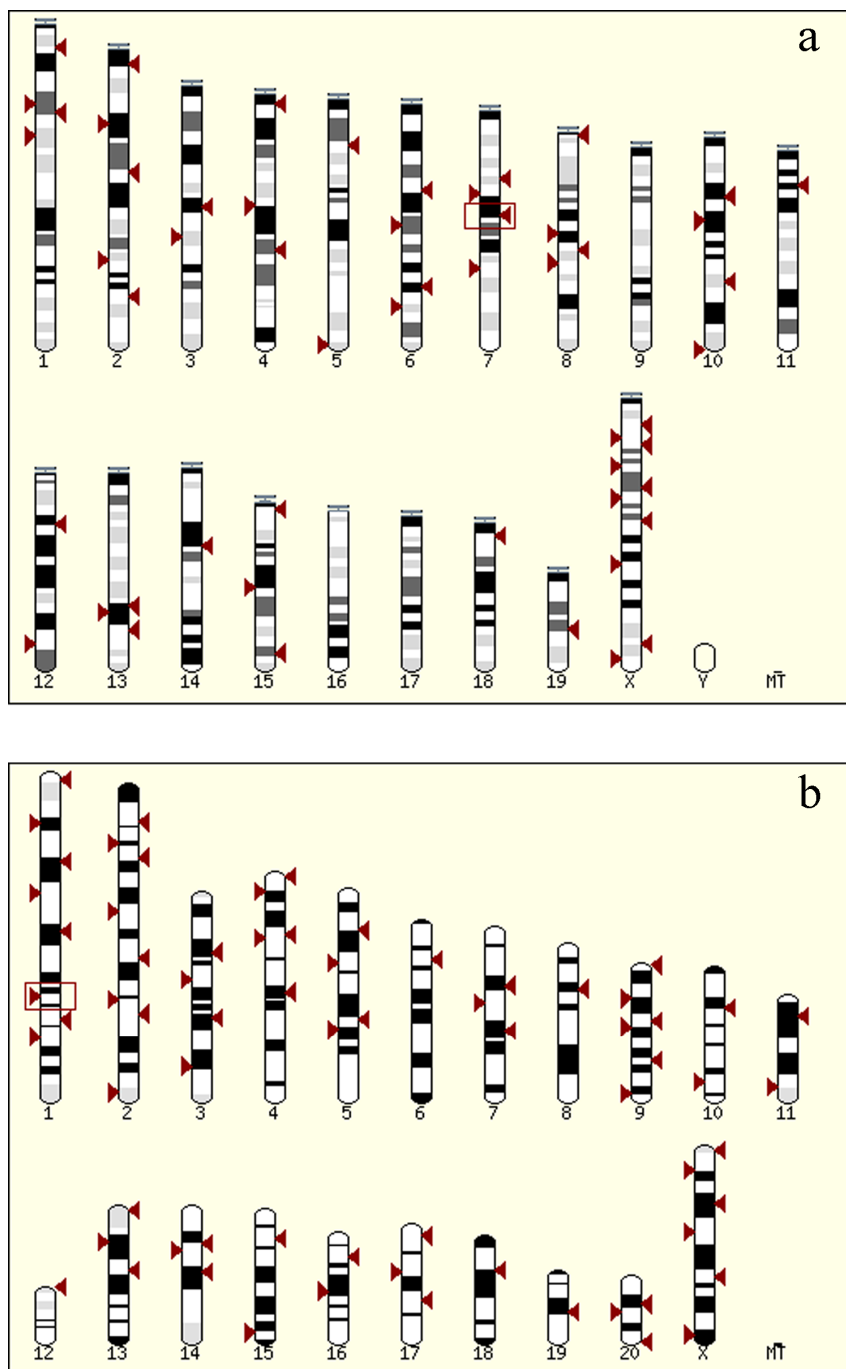


Figura 22 – Regiões similaridade entre a sequência LINE-1 de *P. eremicus* (PER L1) com o genoma de *M. musculus* (a) e *R. norvegicus* (b) utilizando uma ferramenta bioinformática “Ensembl Multi Blast View” (regiões evidenciadas por setas). A região evidenciada com um quadrado corresponde à região que apresenta maior similaridade com a sequência PER L1. MT- genoma mitocondrial

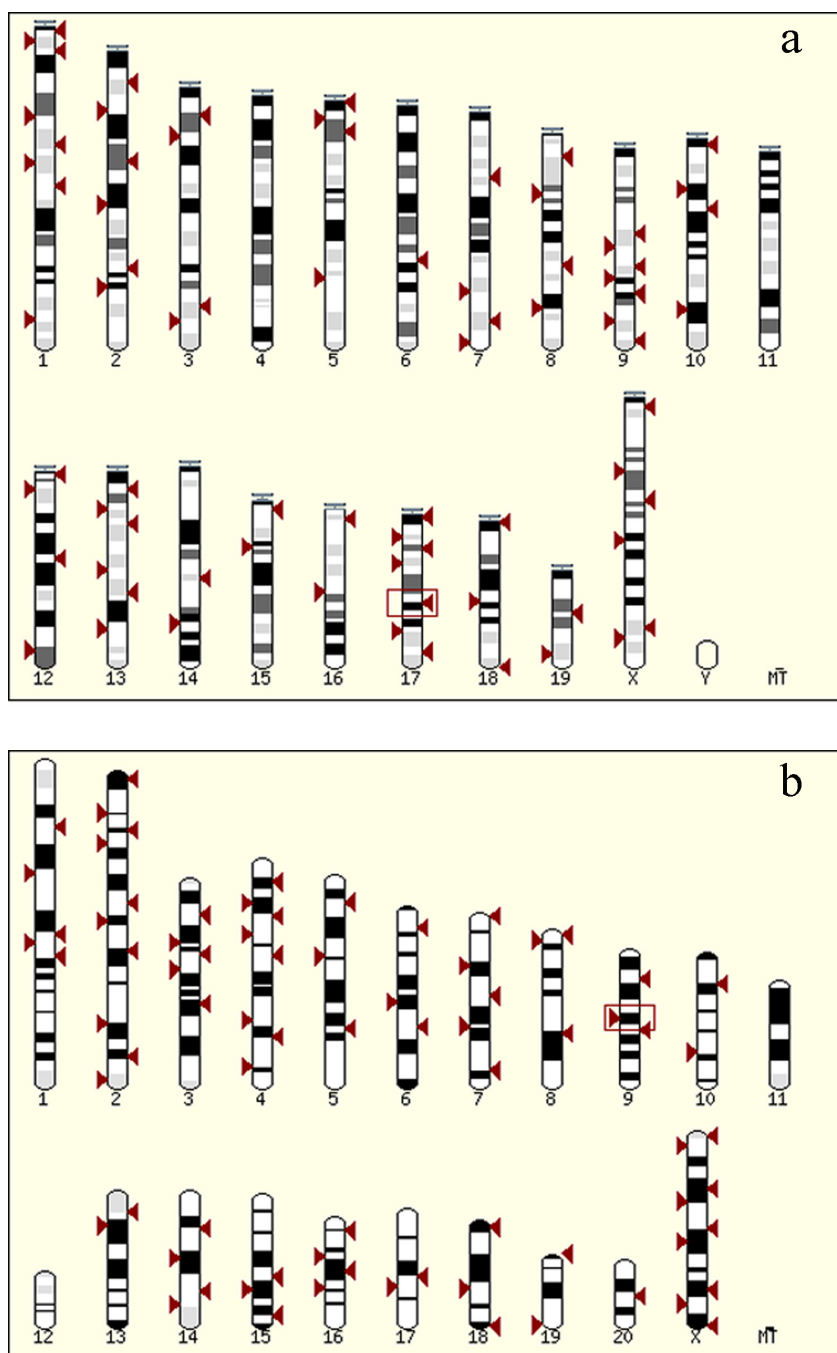


Figura 23 – Regiões similaridade entre a sequência LINE-1 de *P. tullbergi* (PTU L1) com o genoma de *M. musculus* (a) e *R. norvegicus* (b) utilizando uma ferramenta bioinformática “Ensembl Multi Blast View” (regiões evidenciadas por setas). A região evidenciada com um quadrado corresponde à região que apresenta maior similaridade com a sequência PTU L1. MT- genoma mitocondrial

Para uma análise mais precisa, compararam-se com maior detalhe as sequências isoladas neste trabalho (CCR L1, PER L1 e PTU L1) e as sequências LINE-1 das duas espécies índice, *M. musculus* e *R. norvegicus*, utilizando o software “Vector NTI Advance 10-AlignX” (Invitrogen Life Technologies). Este software permitiu realizar alinhamentos entre as três sequências isoladas neste trabalho, a sequência completa LINE-1 de *M. musculus* (MMU L1 completa- disponível no “NCBI Nucleotide” U15647) e a sequência completa da ORFII LINE-1 de *R. norvegicus* (RNO ORF II L1 -disponível no “NCBI Nucleotide” DQ100474). Os alinhamentos entre as sequências isoladas neste trabalho com as sequências MMU L1 completa e RNO ORFII L1 estão apresentados na figura 24.

		Section 1									
		(1)	1	10	20	30	40	51			
CCR L1	(1)	CCATGCTCATGGATTGGT	AGCAT	CAACAT	AGTAAAAATGGC	AC	TCTTACCA				
PER L1	(1)	CCATGCTCATGGATTGGC	CAGAACT	AACAT	AGTAAAAATGGC	AA	TCTTACCA				
PTU L1	(1)	CCATGCTCATGGATTGGC	CAGGATTAAT	TAT	AGTAAAAATGGC	CAT	TCTAATGA				
MMU L1 completa	(1)	CCATGCTCATGGATTGGC	CAGGACC	AACAT	TGTAAAAATGGC	TAT	TCTTGCCA				
RNO L1 ORF II	(1)	CCATGCTCATGGATTGGC	CAGGATTAAT	TAT	AGTAAAAATGGC	CAT	TCTTACCA				
		Section 2									
		(52)	52	60	70	80	90	102			
CCR L1	(52)	AAATCAATCTAT	AGATTCAAT	TGCAAT	ACCCAT	CAAAAT	GCCAA	CAAAATTT			
PER L1	(52)	AAACAATCTAC	AGATTCAAT	TGCAAT	CCCCAT	CAAAAT	ACCAAC	CAAAATTT			
PTU L1	(52)	AG-GCAATTTAC	AGATTCAAT	TGCAAT	CCCCAT	CAAAAT	TCCAAC	CAAAATTT			
MMU L1 completa	(52)	AAAGCAATCTAC	AGATTCAAT	TGCAAT	CCCCAT	TAAAAT	TCCAAC	CAAAATTT			
RNO L1 ORF II	(52)	AAAGCAATCTAC	AGATTCAAT	TGCAAT	CCCCAT	CAAAAT	ACCAAT	CAAAATTT			
		Section 3									
		(103)	103	110	120	130	140	153			
CCR L1	(103)	TTCAACAGCCCT	TGAAAGAA	CAATTT	CTGAAC	TTTAT	ATGGAGA	AACAAAA			
PER L1	(103)	TTCAACAGCCCT	TGAAAGAA	TAAAT	GCTCAAC	TTTAT	ATGGAGA	AACAAAA			
PTU L1	(102)	TTCAACAACCTT	AGAAAGAA	GCAATTT	TGAAAT	TTTAT	CTGGAGC	AACAAAA			
MMU L1 completa	(103)	TTCAACGAATT	AGAAAGAA	GCAATTT	TGCAAT	TTTAT	CTGGAGC	AACAAAA			
RNO L1 ORF II	(103)	TTCAACAGAGT	TAGACAG	AACAAAT	TTGCAAT	TTTAT	CTGGAGC	AACAAAA			
		Section 4									
		(154)	154	160	170	180	190	204			
CCR L1	(154)	CCAGGATAGC	CAAAACAT	GCCTTAT	ACAATAA	AGGAAC	TCTGGAG	GCATC			
PER L1	(154)	CCAGGATAGC	CAAAAGAT	CCGTGT	ACAATAA	CACAAC	TCTGGAG	GCATC			
PTU L1	(153)	CCAGGATAGC	CAAA-CT	ATTGTT	CAAAATAA	AGGAAC	TATGGT	GGAATC			
MMU L1 completa	(154)	CCAGGATAGC	CAAAACT	CTTCT	CAAGGATAA	AGGAAC	TCTGGT	GGAATC			
RNO L1 ORF II	(154)	CCAGGATAGC	TAAAGCT	ATCCT	CAACAATAA	AGGACT	TTCAGG	GGAATC			
		Section 5									
		(205)	205	210	220	230	240	255			
CCR L1	(205)	ACCATCCCTGACT	TCAAGCT	CTATT	TACCGAGC	TATAAT	ACTG	AAAACTG			
PER L1	(205)	ACCATCCCTGACT	TCAAGCT	CTACT	GTAAAGC	TACAT	AATA	AAAAAGCT			
PTU L1	(203)	ACCATCCCTGACT	TAAAGCT	GTACT	TACAGAGC	CAATT	TGAGAT	AAAAAGT			
MMU L1 completa	(205)	ACCATCCCTGACT	TAAAGCT	TTACT	TACAGAGC	CAATT	TGTGAT	AAAAAGT			
RNO L1 ORF II	(205)	ACTATCCCTGACT	TCAAGC	AGTAT	TACAGAGC	CAATAG	TGAT	AAAAAGT			
		Section 6									
		(256)	256	270	280	290	300				
CCR L1	(256)	TGGGAT	TGGCAC	AAAAAT	AACTGT	TAAACCAAT	GGAAT	AAAAAT			
PER L1	(256)	TGGTAC	TGGCAT	AAAAAC	CAGACAT	GTAGACCAAT	GGAAC	CAGAAAT			
PTU L1	(254)	TGATAT	TGGTAC	AGTGAC	CAGGCAGG	TAGACCAAT	GGAAC	CAGAAAT			
MMU L1 completa	(256)	TGGTAC	TGGTAT	AGAGAC	CAGACAGT	GGACCAAT	GGAAT	AGAAAT			
RNO L1 ORF II	(256)	TGGTAT	TGGTAC	AGAGAC	CAGACAGAT	AGACCAAT	GGAAT	AGAAAT			

Figura 24 – Alinhamentos entre as sequências LINE-1 de *C. cricetus* (CCR L1), *P. eremicus* (PER L1) e *P. tullbergi* (PTU L1) com as sequências MMU L1 completa e RNO ORFII L1.

Na tabela 16 estão resumidos os valores de similaridade obtidos após alinhamento entre as três sequências isoladas, apresentando-se também os valores de similaridade entre cada uma das sequências anteriores e as sequências MMU L1 completa e RNO ORF II L1. A similaridade entre a região das sequências MMU L1 completa e RNO ORF II L1 que alinha com as isoladas neste trabalho, também pode ser consultada nesta tabela.

Tabela 16 – Avaliação da percentagem de similaridade entre as sequências CCR L1, PER L1, PTU L1, MMU L1 completa e RNO ORFII L1

	CCR L1	PER L1	PTU L1	MMU L1 completa	RNO ORF II L1
CCR L1	100%	83%	75%	75%	78%
PER L1	83%	100%	78%	80%	81%
PTU L1	75%	78%	100%	85%	85%
MMU L1 completa	75%	80%	85%	100%	87%
RNO ORF II L1	78%	81%	85%	87%	100%

Todos os resultados apresentados nesta tabela foram obtidos utilizando o programa Vector NTI Advance 10-AlignX (Invitrogen Life Technologies).

Quando se avalia a similaridade entre cada uma das três sequências isoladas neste trabalho (CCR L1, PER L1 e PTU L1), verifica-se uma maior similaridade entre as sequências de *C. cricetus* e *P. eremicus*, pertencentes à mesma família (Cricetidae), como seria de esperar (cf. tabela 16). Das três sequências isoladas, a que apresenta maior similaridade com a sequência MMU L1 completa é a sequência de *P. tullbergi* (85%), pertencendo as duas espécies à mesma família e subfamília (Muridae e Murinae, respectivamente). A sequência de *C. cricetus* é a que apresenta menor similaridade (75%) com a sequência MMU L1 completa (cf. tabela 16). Obtiveram-se resultados semelhantes entre as três sequências isoladas neste trabalho e a sequência da RNO ORFII L1 (cf. tabela 16), no entanto, observa-se uma maior similaridade entre as diferentes sequências (excepção para a sequência de *P. tullbergi* que apresenta igual similaridade com as sequências MMU L1 completa e RNO ORFII L1).

Nas figuras 25 e 26 estão esquematizados todos os alinhamentos realizados neste trabalho, tendo como comparação a sequência MMU L1 completa ou a sequência RNO ORFII L1, respectivamente. Para além de estarem representados nestas figuras os alinhamentos entre três sequências isoladas neste trabalho e as sequências MMU L1 completa e RNO ORFII L1,

esquematizaram-se ainda os alinhamentos de sequências LINE-1 de 10 espécies de roedores da família Cricetidae, disponíveis na base de dados “NCBI Nucleotide”, com as sequências MMU L1 completa e RNO ORFII L1 (parte superior das figuras 25 e 26). Ao realizar estes alinhamentos observou-se que as sequências de *C. cricetus*, *P. eremicus* e *P. tullbergi*, correspondem a uma região da ORFII da sequência LINE-1 de *M. musculus* e *R. norvegicus* (cf. figuras 25 e 26, respectivamente), alinhando todas as sequências analisadas com a mesma região da ORFII L1 destas duas espécies índex.

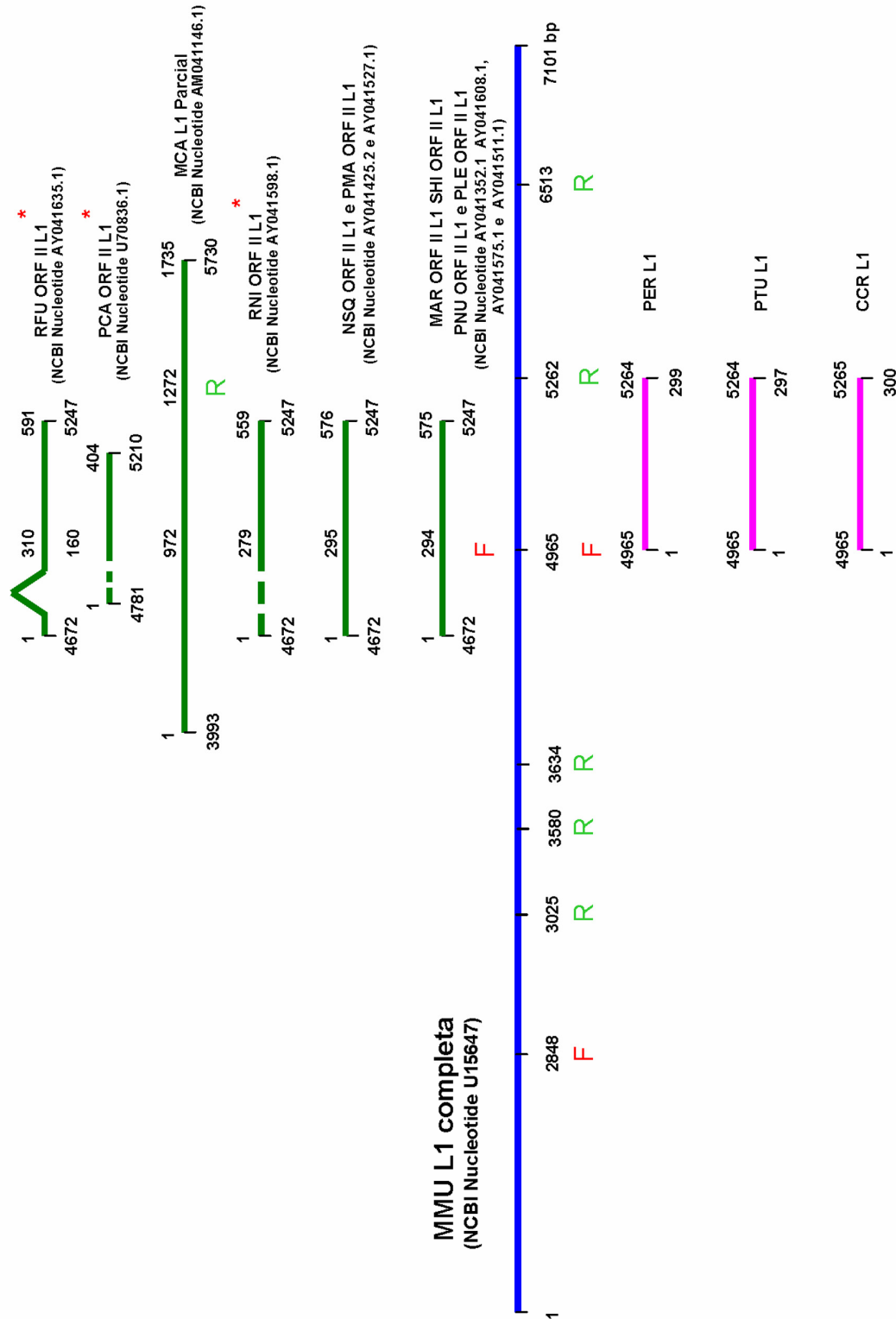


Figura 25 – Representação esquemática de todos os alinhamentos realizados tendo como comparação a sequência completa LINE-1 de *M. musculus* (MMU L1 completa). As sequências comparadas são: sequências parciais da ORFII L1 de *Cricetus cricetus* (CCR L1), *Peromyscus eremicus* (PER L1), *Praomys tullbergi* (PTU L1), *Microtus arvalis* (MAR ORFII L1), *Nectomys squamipes* (NSQ ORFII L1), *Rhipidomys nitela* (RNI ORFII L1), *Sigmodon hispidus* (SHI ORFII L1), *Peromyscus californicus* (PCA ORFII L1), *Peromyscus nudipes* (PNU ORFII L1), *Peromyscus maniculatus* (PMA ORFII L1), *Peromyscus leucopus* (PLE ORFII L1), *Reithrodontomys fulvescens* (RFU ORFII L1) e a sequência parcial LINE-1 de *Microtus cabrerai* (MCA Parcial). Após a realização destes alinhamentos foi possível observar a ocorrência de inserções/delecções na região de alinhamento de diferentes sequências LINE-1 (assinalado com *). (F) “primer” LINE-1 forward. (R) “primer” LINE-1 reverse.

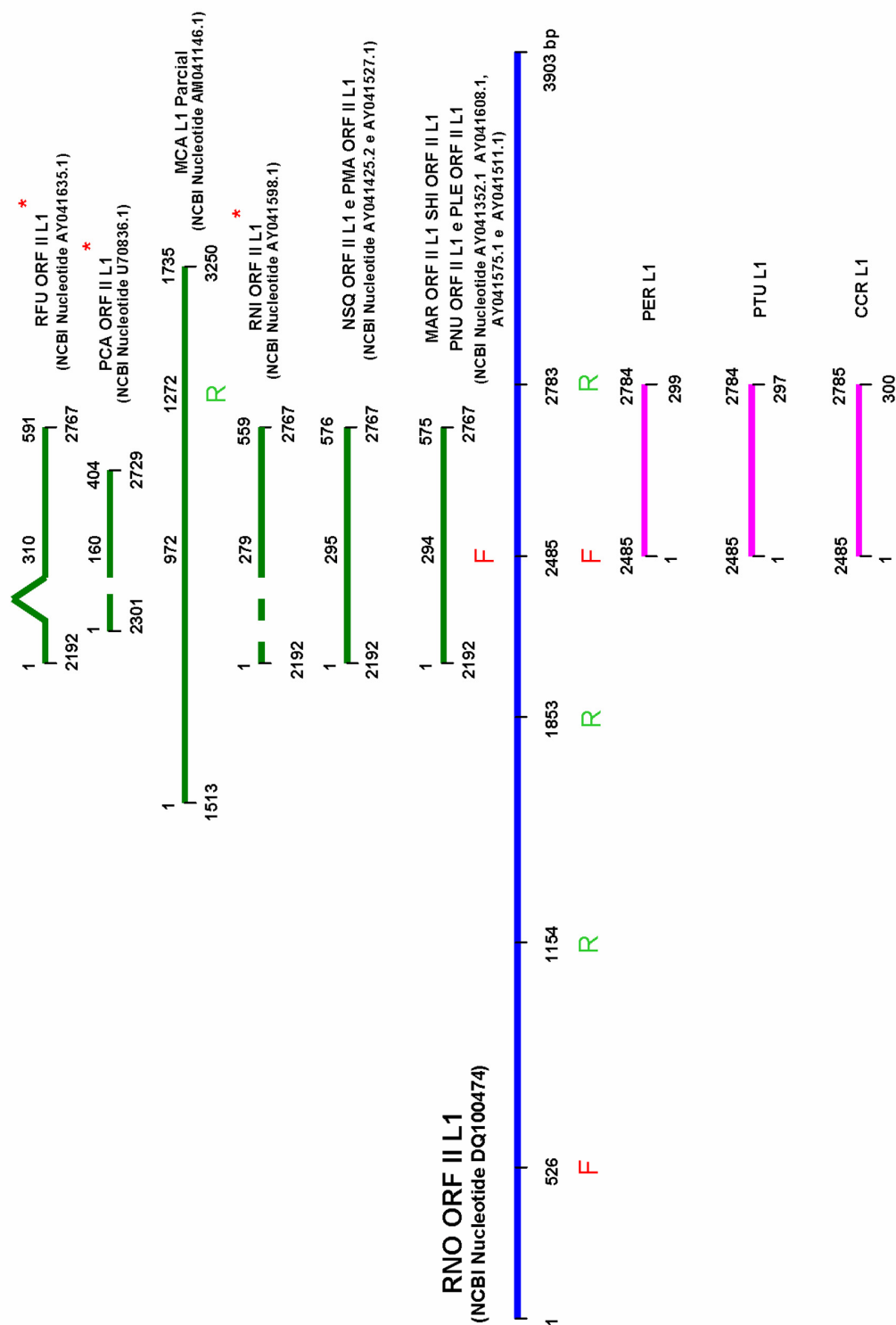


Figura 26 – Representação esquemática de todos os alinhamentos realizados tendo como comparação a sequência completa da ORFII L1 de *R. norvegicus* (RNO ORFII L1). As sequências comparadas são: sequências parciais da ORFII L1 de *Cricetus cricetus* (CCR L1), *Peromyscus eremicus* (PER L1), *Praomys tullbergi* (PTU L1), *Microtus arvalis* (MAR ORFII L1), *Nectomys squamipes* (NSQ ORFII L1), *Rhipidomys nitela* (RNI ORFII L1), *Sigmodon hispidus* (SHI ORFII L1), *Peromyscus californicus* (PCA ORFII L1), *Peromyscus nudipes* (PNU ORFII L1), *Peromyscus maniculatus* (PMA ORFII L1), *Peromyscus leucopus* (PLE ORFII L1), *Reithrodontomys fulvescens* (RFU ORFII L1) e a sequência parcial LINE-1 de *Microtus cabreræ* (MCA Parcial). Após a realização destes alinhamentos foi possível observar a ocorrência de deleções ou inserções de alguns de bases, na região de alinhamento de diferentes sequências LINE-1 (assinalado com *). (F) “primer” LINE-1 forward. (R) “primer” LINE-1 reverse.

Para obtermos uma análise mais detalhada sobre a região de alinhamento entre as três sequências isoladas neste trabalho (CCR L1, PER L1 e PTU L1) e a sequência MMU L1 Completa, foram efectuados “Dotplots” entre as diferentes sequências, sendo estes apresentados na figura 27. Resultados semelhantes são apresentados na figura 28, analisando-se a região de alinhamento entre as sequências isoladas neste trabalho e a sequência RNO ORFII L1. A análise dos “Dotplots” permite observar duplicações (linhas paralelas) e deleções (“gaps” horizontais) na região de alinhamento entre as diferentes sequências.

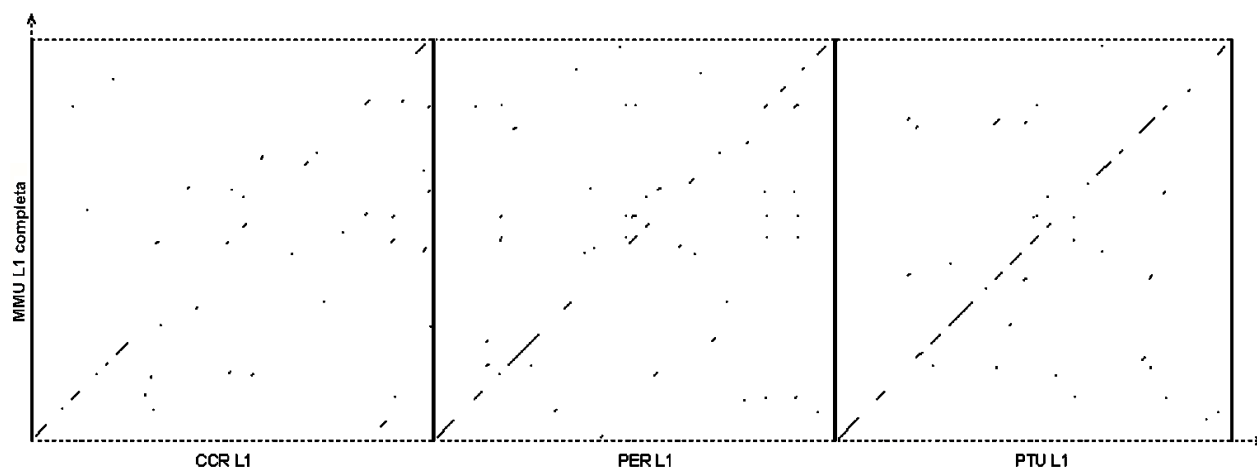


Figura 27 – “Dotplot” onde se comparam as sequências de um fragmento da ORFII LINE-1 de *C. cricetus* (CCR L1), *P. eremicus* (PER L1) e *P. tullbergi* (PTU L1) com a sequência completa LINE-1 de *M. musculus* (MMU L1 completa).

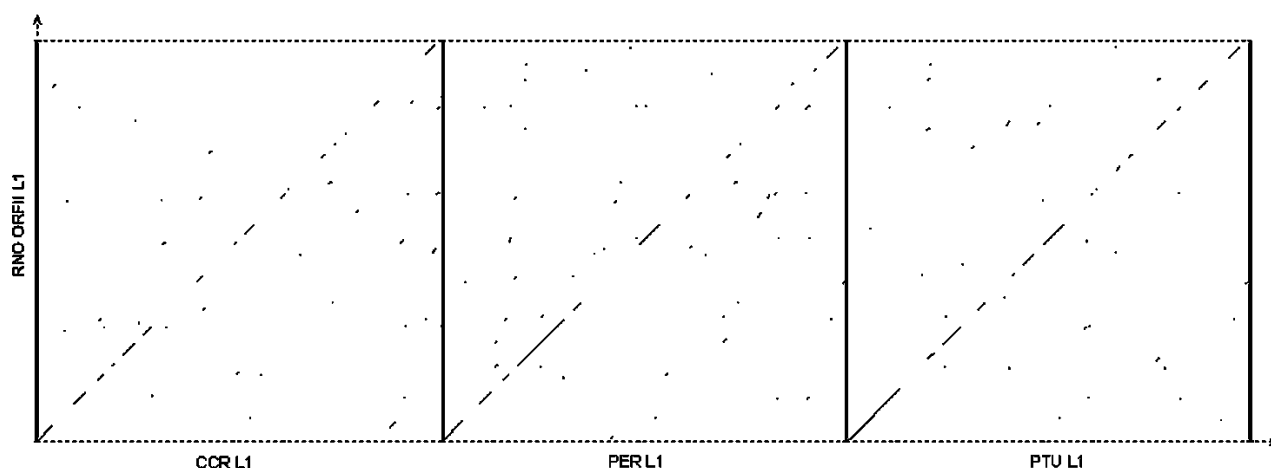


Figura 28- “Dotplot” onde se comparam as sequências de um fragmento da ORFII LINE-1 de *C. cricetus* (CCR L1), *P. eremicus* (PER L1) e *P. tullbergi* (PTU L1) com a sequência completa da ORFII LINE-1 de *R. norvegicus* (RNO ORFII L1).

A análise das sequências isoladas (CCR L1, PER L1 e PTU L1) e a sua comparação com sequências LINE-1 de *M. musculus*, *R. norvegicus* (famílias Muridae) e de 10 espécies pertencentes à família Cricetidae, depositadas na base “NCBI Nucleotide”, permitiu construir um dendograma que relaciona filogeneticamente todas as espécies analisadas (cf. figura 29).

Neste dendograma observa-se uma maior proximidade filogenética entre as espécies pertencentes à família Muridae (*P. tullbergi*, *M. musculus* e *R. norvegicus*), acontecendo o mesmo entre espécies pertencentes à família Cricetidae. É ainda possível observar uma maior proximidade filogenética entre as espécies pertencentes à mesma subfamília e ao mesmo género. Observa-se assim uma maior proximidade filogenética entre as duas espécies pertencentes ao género *Microtus* e subfamília Arvicolinae (*Microtus arvalis* e *Microtus cabreriae*), as três espécies pertencentes à subfamília Sigmodontinae (*Nectomys squamipes*, *Rhipidomys nitela* e *Sigmodon hispidus*), as seis espécies pertencentes à subfamília Neotominae (*Reithrodontomys fulvescens*, *Peromyscus leucopus*, *Peromyscus californicus*, *Peromyscus eremicus*, *Peromyscus maniculatus* e *Peromyscus nudipes*) e as cinco espécies pertencentes ao género *Peromyscus* e subfamília Neotominae.

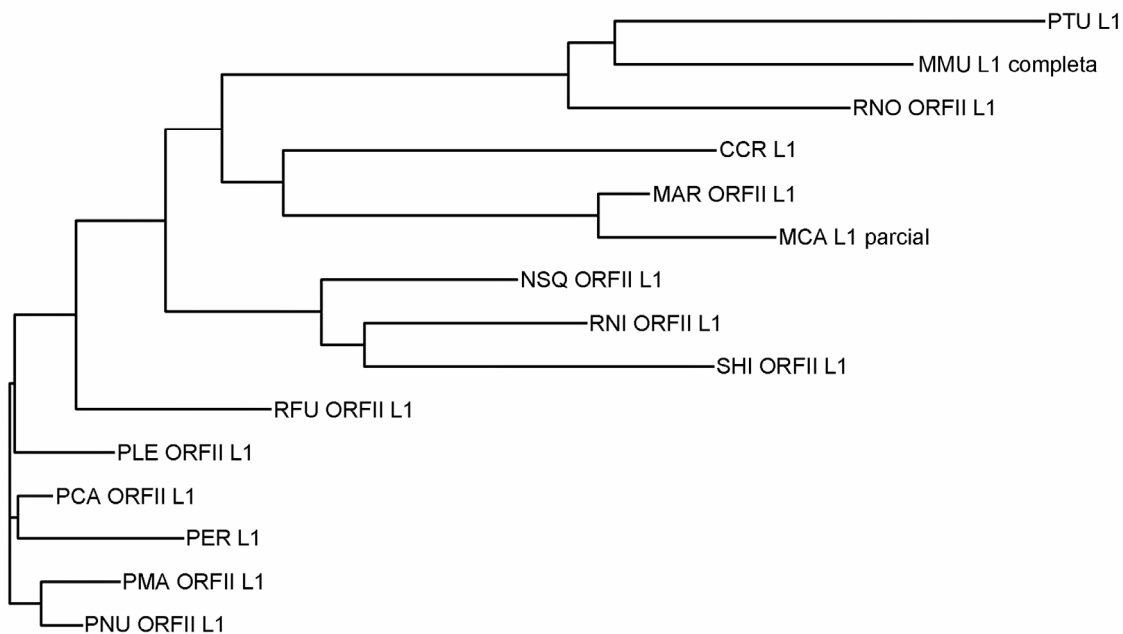


Figura 29 – Dendograma que apresenta as relações filogenéticas entre diferentes espécies de roedores (Cricetidae e Muridae). Este dendograma foi construído de acordo com a percentagem de similaridade entre sequências LINE-1.

IV. 1.3.2- Análise citogenética das sequências LINE-1 de *Cricetus cricetus*, *Peromyscus eremicus* e *Praomys tullbergi*

O mapeamento físico das sequências LINE-1 clonadas de *C. cricetus*, *P. eremicus* e *P. tullbergi*, feito por hibridação *in situ* fluorescente nas respectivas preparações cromossómicas, demonstrou que estas sequências se encontram “interspersed” ao longo de todos os

cromossomas de cada uma das espécies, não se verificando uma localização preferencial destas sequências no cromossoma X, em comparação com os autossomas (c.f figura 30).

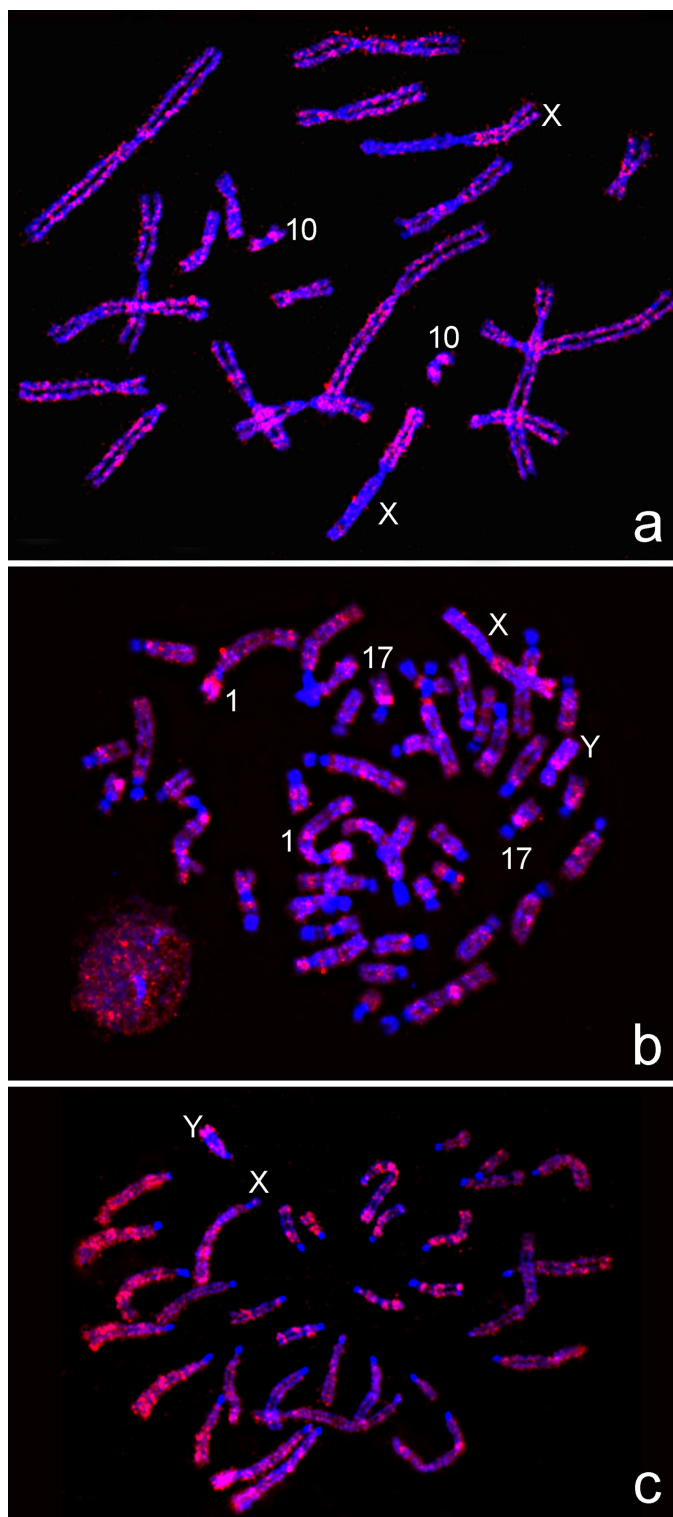


Figura 30 – Mapeamento físico de sequências LINE-1 de *C. cricetus* (a), *P. eremicus* (b) e *P. tullbergi* (c) nos respectivos cromossomas. Este mapeamento foi feito por hibridação *in situ* fluorescente utilizando como sonda as sequências LINE-1 de *C. cricetus* (CCR L1), *P. eremicus* (PER L1) e *P. tullbergi* (PTU L1), marcadas indirectamente com digoxigenina-11-dUTP e detectadas com 5TAMRA (sinal vermelho). Cromossomas contrastados com DAPI (sinal azul).

Nos cromossomas de *C. cricetus* e *P. eremicus*, o resultado da hibridação das sequências CCR L1 e PER L1 (respectivamente), não demonstrou bandeamento longitudinal específico de determinadas regiões cromossômicas. No entanto, pode observar-se uma localização preferencial da sequência CCR L1 no cromossoma 10 de *C. cricetus* (cf. figura 30a), e da sequência PER L1 no braço curto do cromossoma 1 e na região proximal do braço longo do cromossoma 17 de *P. eremicus* (figura 30b). A sequência PTU L1 nos cromossomas de *P. tullbergi* parece apenas apresentar sinal de hibridação em regiões eucromáticas (c.f figura 30c), observando-se um padrão de diferenciação longitudinal semelhante a um bandeamento longitudinal cromossômico, com uma localização preferencial em regiões ricas em AT (bandas evidenciadas pelo DAPI). A sequência PTU L1 isolada neste trabalho localiza-se preferencialmente na região telomérica do cromossoma Y de *P. tullbergi*.

IV. 1.4- Análise cromossômica comparativa dos cromossomas X de *Cricetus cricetus*, *Peromyscus eremicus* e *Praomys tullbergi*

Com o objectivo de caracterizar o cromossoma X das três espécies de roedores estudadas neste trabalho, hibridou-se uma sonda de “painting” representativa do cromossoma X de *Rattus norvegicus* (RNOX), em preparações cromossômicas de *C. cricetus*, *P. eremicus* e *P. tullbergi*. Ao utilizar esta sonda, para além de ser possível identificar com exactidão o cromossoma X de cada uma das três espécies estudadas, foi ainda possível identificar regiões conservadas entre estes cromossomas (segmentos sinténicos). Na figura 31 é possível observar que a sonda RNOX revelou três segmentos sinténicos num dos braços do cromossoma X de *C. cricetus* e oito segmentos sinténicos no cromossoma X de *P. eremicus*, sendo três deles muito pequenos (evidenciados por setas na figura 31). No braço longo do cromossoma X de *P. tullbergi* foram detectados seis segmentos sinténicos.

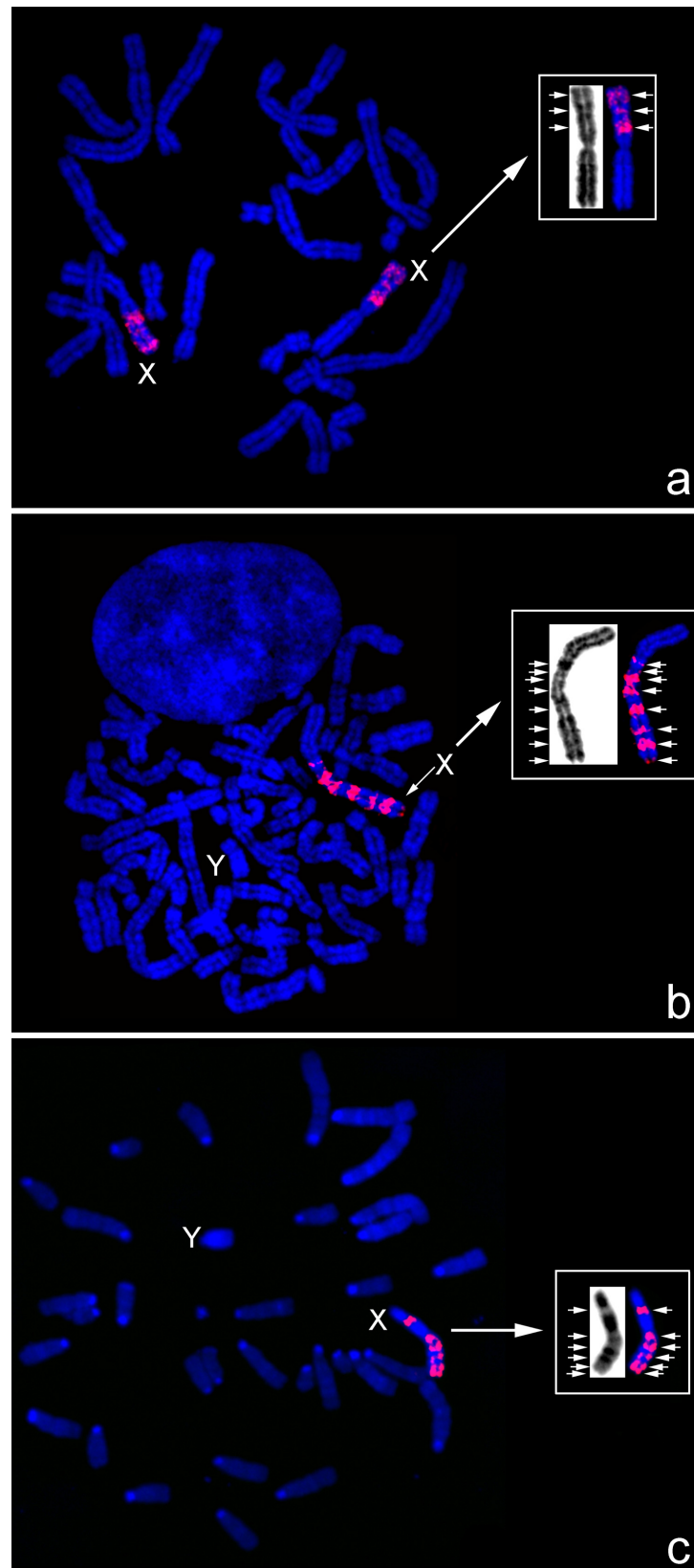


Figura 31 – Hibridação *in situ* fluorescente (FISH) de uma sonda de “painting” do cromossoma X de *R. norvegicus* em cromossomas de *C. cricetus* (a), *P. eremicus* (b) e *P. tullbergi* (c). Dentro dos quadrados brancos está evidenciado o padrão de bandeamento GTD e o sinal de hibridação com sonda de “painting”, no cromossoma X de cada uma das espécies. Os segmentos sinténicos estão evidenciados por setas. A sonda utilizada (RNOX) foi marcada indirectamente com digoxigenina-11-dUTP e detectada com 5TAMRA (sinal vermelho). Cromossomas contrastados com DAPI (sinal azul).

Após análise do sinal de hibridação da sonda RNOX no cromossoma X de *P. eremicus*, foi possível detectar a ocorrência de uma inversão pericêntrica (c.f figura 32). Nesta figura é possível observar dois segmentos sinténicos a flanquear o centrómero deste cromossoma, revelados pela sonda de “painting” RNOX.

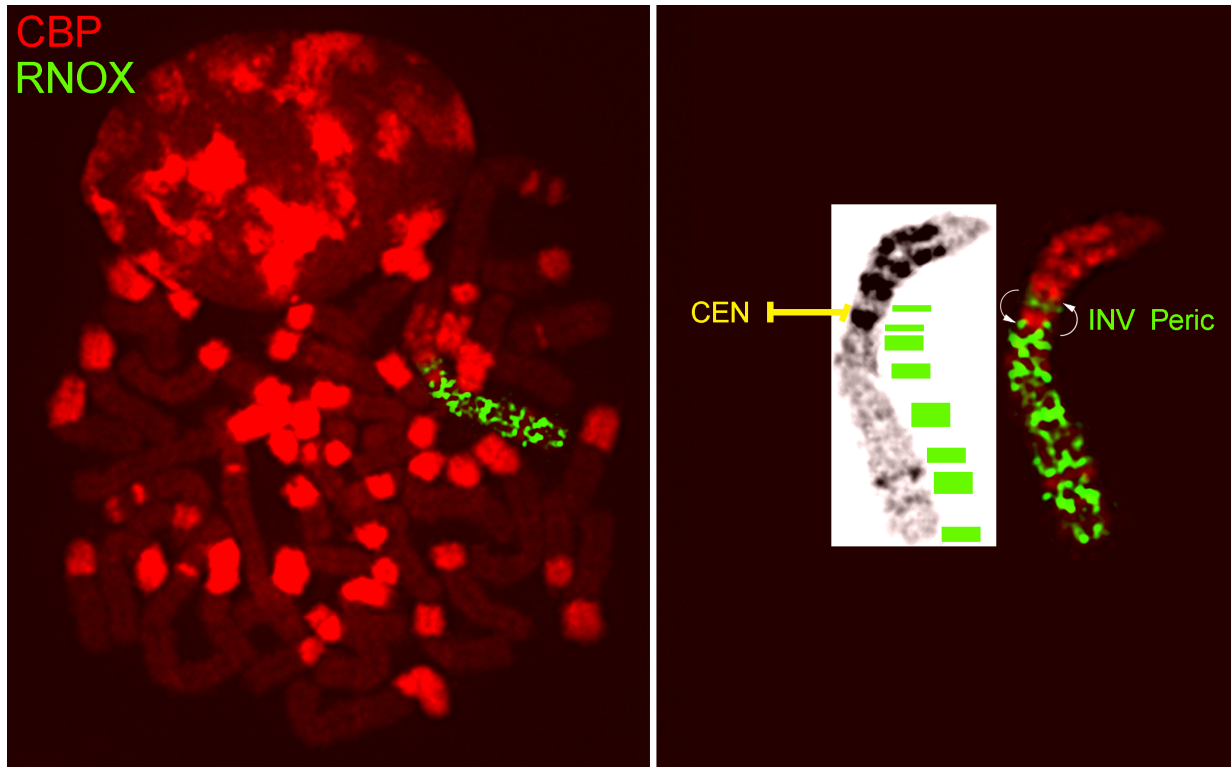


Figura 32 – Hibridação *in situ* fluorescente (FISH) de uma sonda de “painting” do cromossoma X de *R. norvegicus* (RNOX) em cromossomas de *P. eremicus* e bandeamento-C sequencial. No lado direito da figura está evidenciada a ocorrência de uma inversão pericêntrica (INV Peric). O centrómero (CEN) corresponde a uma forte banda-C revelada por bandeamento CBP. A sonda utilizada foi marcada indirectamente com digoxigenina-11-dUTP e foi detectada com 5TAMRA (sinal vermelho apresentando-se no entanto a cor falsa verde).

Na figura 33 estão representados ideogramas do cromossoma X das três espécies de roedores estudadas, que resumem os padrões de bandeamento-G e bandeamento-C, apresentando-se também os resultados de hibridação das sondas CCR L1, PER L1, PTU L1 e RNOX neste cromossoma.

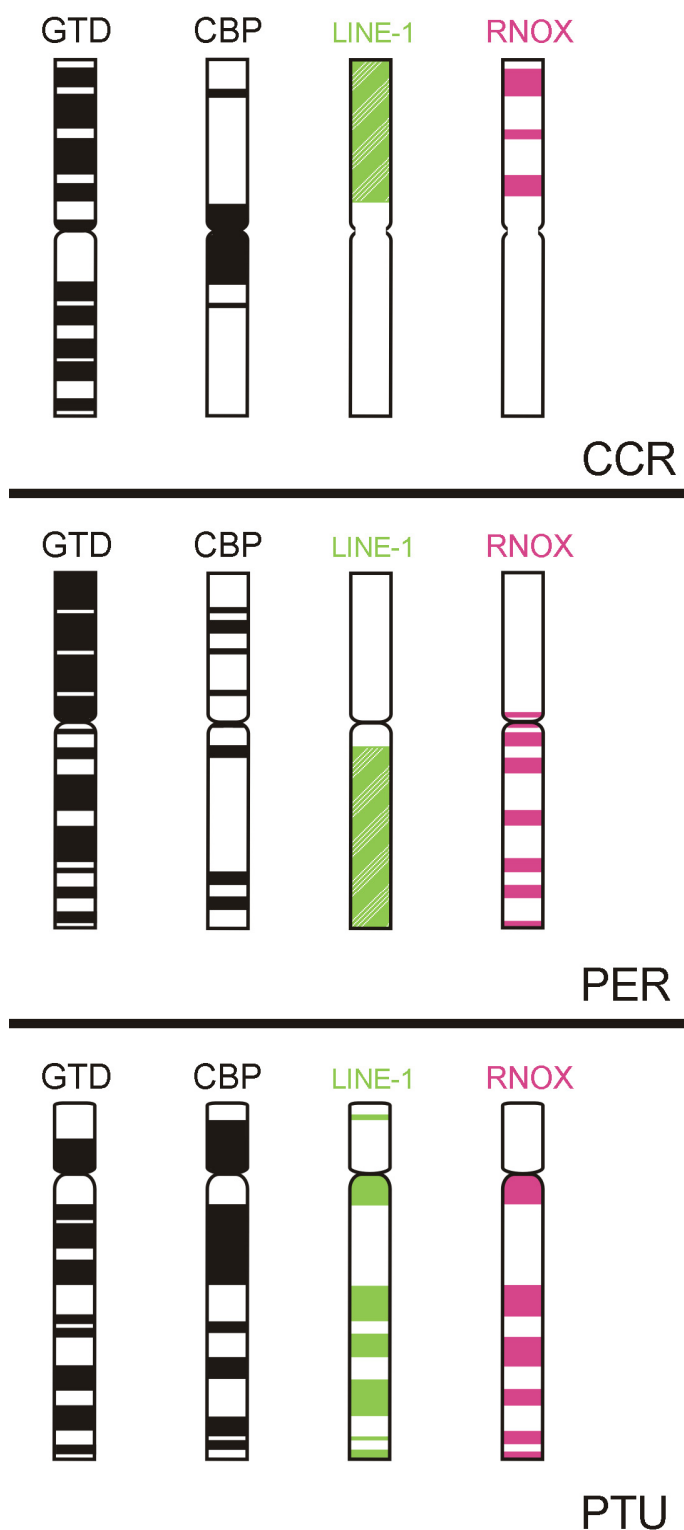


Figura 33 – Ideogramas dos cromossomas X de *C. cricetus* (CCR), *P. eremicus* (PER) e *P. tullbergi* (PTU) apresentando diferentes padrões de bandeamento e hibridação realizados neste trabalho. O tamanho relativo entre os cromossomas X de cada uma das espécies não foi considerado. As bandas-C apresentadas no cromossoma X de *P. eremicus* foram obtidas por bandeamento-C sequencial a bandeamento-G, no entanto, a primeira banda-C que se encontra abaixo do centrômero, foi evidenciada por bandeamento-C sequencial a restrição *in situ* pelas endonucleases AluI+C, PstI+C e RsaI+C. As bandas-C apresentadas no cromossoma X nas outras duas espécies foram obtidas apenas por bandeamento-C sequencial a bandeamento-G.

IV. 1.5- Distribuição de sequências repetitivas em tandem no cromossoma X de *Mus musculus* e sua correlação com a localização de regiões de “breakpoints” evolutivos

As regiões do genoma de *Mus musculus*, que estiveram implicadas em processos de evolução cromossômica, têm vindo a ser identificadas utilizando a técnica de “Comparative Chromosome Painting” (Froenicke *et al.* 2005). A comparação da sequência completa (a partir dos projectos de sequenciação de genomas) de cromossomas entre diferentes espécies permite a identificação de regiões de “breakpoints” evolutivos, correspondendo estas ao intervalo entre segmentos sinténicos (Murphy *et al.* 2005). A caracterização molecular de regiões de “breakpoints” evolutivos nos genomas de Homem, outros primatas e rato, mostram que grandes reorganizações cromossômicas tendem a ocorrer em, ou próximo a, regiões ricas em algum tipo de sequências repetitivas em tandem (e.g. dinucleótidos [TA]_n) (Kehrer-Sawatzky *et al.* 2005, Fan *et al.* 2002, Locke *et al.* 2003).

Neste trabalho foi realizada uma análise *in silico* sobre a distribuição de sequências repetitivas em tandem no cromossoma X de *M. musculus*, cuja sequência completa pode ser consultada na base de dados “NCBI Genome”, e simultaneamente a localização de regiões de “breakpoints” evolutivos, que pode ser consultada na base de dados “Ensembl Mouse SyntenicView” (sintenia entre cromossomas de *M. musculus*, *R. norvegicus* e *H. sapiens*). Com esta análise, foi possível observar que as regiões que apresentavam uma grande densidade de sequências repetitivas em tandem correspondem a regiões de “breakpoints” evolutivos (cf. figura 34). Na figura 34 está esquematizada a densidade e distribuição de sequências repetitivas em tandem ao longo do cromossoma X de *M. musculus*, determinadas utilizando o software “Tandem Repeats Finder” (Benson 1999) e a sua colocalização com regiões de “breakpoints” evolutivos.

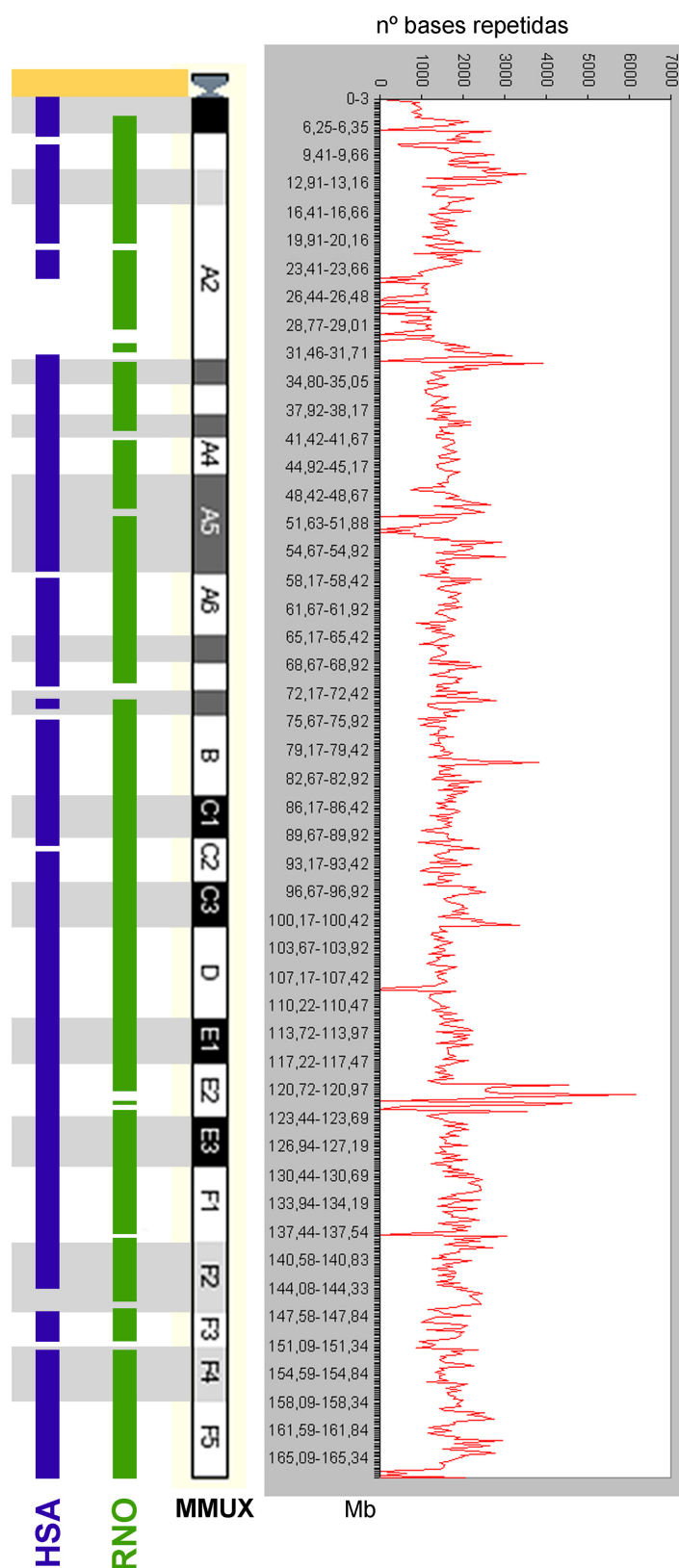


Figura 34 – Distribuição de seqüências repetitivas em tandem ao longo do cromossoma X de *M. musculus* (MMUX) e sua colocação com regiões de “breakpoints” evolutivos relativamente à sintonia com o cromossoma X de *H. sapiens* (HSA) e *R. norvegicus* (RNO). As barras azuis representam regiões de homologia entre o cromossoma X de *M. musculus* e *H. sapiens*. As barras verdes representam regiões de homologia entre o cromossoma X de *M. musculus* e *R. norvegicus*. A distribuição das seqüências repetitivas em tandem ao longo do cromossoma X de *M. musculus* está representada no lado direito da figura. A região centromérica do cromossoma X de *M. musculus* está representada a amarelo e corresponde a um “gap” de seqüênciação. Aos “gaps” de seqüênciação foi atribuído o valor de 0 bases repetidas.

IV. 2 – Discussão de Resultados

IV. 2.1- Análise da heterocromatina constitutiva dos cromossomas de *Cricetus cricetus*, *Peromyscus eremicus* e *Praomys tullbergi*

Embora a heterocromatina constitutiva (HC) dos cromossomas de *C. cricetus* e *P. eremicus* tenha sido anteriormente caracterizada por procedimentos de bandeamento-C após bandeamento-G (Fonchtsch 1973, Pathak *et al.* 1973, Gamperl *et al.* 1976, Vistorin *et al.* 1976, Deaven *et al.* 1977, Gamperl *et al.* 1978, Robbins *et al.* 1981, Gamperl *et al.* 1984, Hale *et al.* 1991), a sua caracterização detalhada e a documentação da sua heterogeneidade foi realizada pela primeira vez neste trabalho. A heterogeneidade da HC dos cromossomas de *P. tullbergi* foi já anteriormente referida por Meles *et al.* (2007), ao analisar os resultados do bandeamento dos cromossomas desta espécie por fluorocromos, com afinidade para sequências AT (DAPI) e GC (Cromomicina - CMA3), e bandeamento-C sequencial. Esta metodologia permitiu identificar pelo menos 5 subclasses de HC nos autossomas e 3 subclasses no cromossoma X, de acordo com o maior enriquecimento das sequências de HC em AT, GC ou AT+GC.

O presente trabalho demonstra que a restrição *in situ* com bandeamento-C sequencial, pode ser uma ferramenta alternativa para o estudo da HC dos cromossomas de roedores, especialmente quando não estão disponíveis outras técnicas como a hibridação *in situ* fluorescente (devido ainda à indisponibilidade de sondas referentes a sequências repetitivas obtidas a partir do genoma das espécies em análise). Quando os cromossomas de *C. cricetus*, *P. eremicus* e *P. tullbergi* foram submetidos a restrição *in situ* com bandeamento-C sequencial (cf. figuras 18, 19 e 20), foi possível observar a heterogeneidade das sequências de HC, como já foi referido. Esta heterogeneidade foi detectada a dois níveis, intra bandas e inter bandas. A heterogeneidade intra bandas foi verificada na HC (peri)centromérica dos cromossomas 7 e 10 de *C. cricetus*, e na HC do braço curto do cromossoma 2 de *P. eremicus*, observando-se que uma banda-C do cromossoma controlo parece dividir-se em duas bandas de menor tamanho (cf. figuras 18 e 19 bandas assinaladas com um asterisco), após a acção de diferentes endonucleases de restrição seguida de bandeamento-C. A heterogeneidade inter bandas refere-se à diferente natureza molecular observada entre diferentes bandas-C (subclassas), revelada pelo diferente padrão de restrição que apresentam quando submetidas à acção das mesmas endonucleases de restrição (REs). Neste trabalho foi possível identificar, pelo menos 26 subclasses de HC nos autossomas de *C. cricetus* e *P. eremicus* (cf. tabela 13 e 14), e 45

subclasses nos autossomas de *P. tullbergi* (cf. tabela 15). Sendo também identificadas três subclasses de HC no cromossoma X de *C. cricetus* e *P. eremicus*, 4 subclasses no cromossoma X de *P. tullbergi*, duas subclasses no cromossoma Y de *P. eremicus* e 3 subclasses no cromossoma Y de *P. tullbergi* (c.f tabelas 13, 14 e 15).

A observação de bandas crípticas (cf. figuras 18, 19 e 20), bandas de heterocromatina apenas reveladas após acção de REs, pode ser explicada pela possibilidade da actuação das endonucleases poder causar modificações ao nível das sequências de HC, o que pode favorecer a ligação do corante ou contrastante (neste trabalho iodeto de propídeo) a regiões específicas dos cromossomas (Gosálvez *et al.* 1997, Nieddu *et al.* 1999, Chaves *et al.* 2004, Adega *et al.* 2005). A identificação deste tipo de bandas é de especial interesse, visto que a partir de vários trabalhos realizados em diferentes espécies, se observou que bandas crípticas de HC correspondem a “breakpoints” clínicos (em *Sus scrofa*, Adega *et al.* 2005) ou evolutivos (em Tayassuidae, Adega *et al.* 2007). Assim, e de acordo com vários autores, as sequências de HC parecem ser “hotspots” para a ocorrência de rearranjos cromossómicos (Yunis e Yasmineh 1971, Peacock *et al.* 1982, Jonh 1988, Chaves *et al.* 2004). A maior parte das bandas crípticas identificadas neste trabalho, nos cromossomas de *P. tullbergi*, localizam-se em regiões de “breakpoints” evolutivos que foram identificadas por “Comparative Chromosome Painting” (Chaves *et al.* 2007 *in prep*), hibridando-se sondas de panting representativas de todos os cromossomas de *M. musculus* e *R. norvegicus* em cromossomas de *P. tullbergi*.

IV. 2.1.1- Comparação da quantidade, localização e natureza molecular de sequências de heterocromatina constitutiva entre as três espécies estudadas

A comparação geral da quantidade, localização e natureza molecular da heterocromatina constitutiva, entre as três espécies de roedores analisadas, evidencia diferenças significativas entre os três cariótipos. A utilização de um painel de sete endonucleases de restrição não permite apenas caracterizar detalhadamente a HC e o reconhecimento da sua heterogeneidade molecular (cf. figuras 18, 19, 20 e tabelas 13, 14 e 15), mas também permite inferir os diferentes percursos evolutivos envolvidos na origem destes cariótipos. Na espécie *C. cricetus*, que apresenta um cariótipo quase totalmente meta/submetacêntrico, a HC parece estar preferencialmente localizada em regiões (peri)centroméricas, apresentando a maioria dos autossomas dois blocos de HC (c.f figura 18), o que indica a ocorrência de, pelo menos, translocações Robertsonianas durante a evolução deste cariótipo. A espécie *P. eremicus*, com

um cariótipo constituído apenas por cromossomas submetacêntricos, apresenta também grandes quantidades de HC essencialmente localizada nas regiões (peri)centroméricas, sendo inclusivamente o braço curto da maioria cromossomas completamente heterocromático (c.f. figura 19). A HC destes braços revela uma grande heterogeneidade (cf. tabela 14), o que implica uma diferente natureza molecular, o que certamente é indicativo da coexistência de diferentes famílias de DNA satélite, ou variantes, nestes braços dos cromossomas. Trabalhos que envolveram a utilização da técnica de “Comparative Chromosome Painting” (Dawson *et al.* 1999, Yang *et al.* 2000, Svetlana *et al.* 2006, Svetlana *et al.* 2007), referem uma grande variação nos cariótipos entre as diferentes espécies Cricetidae (número de cromossomas, morfologia dos cromossomas e localização de sequências de HC), o que está de acordo com a grande variação observada nos cariótipos e nas sequências de HC das espécies *C. cricetus* e *P. eremicus*. A espécie *P. tullbergi*, com um complemento autossómico acrocêntrico, é das três espécies estudadas aquela cujos cromossomas exibem menos HC centromérica, quando submetidos a bandeamento-C sequencial a bandeamento-G. Em alguns cromossomas, a heterocromatina intersticial é quase tão abundante quanto a centromérica, contrariamente ao observado para a maioria dos cromossomas das outras duas espécies analisadas (cf. figura 20). Esta distribuição e o elevado número de subclasses de HC identificado nos cromossomas desta espécie [52 subclasses (c.f. tabela 16)], sugere este cariótipo como sendo o mais derivativo dos analisados neste trabalho, tendo sido originado pela ocorrência de um elevado número de complexos rearranjos cromossómicos. Esta hipótese baseia-se sobretudo nos trabalhos de Yunis e Yasmineh (1971), Peacock *et al.* (1982), John (1988) e Chaves *et al.* (2004), que consideram as regiões ricas em heterocromatina como “hotspots” para a ocorrência de rearranjos cromossómicos. A sugestão de que o cariótipo de *P. tullbergi* foi originado pela ocorrência de um elevado número de complexos rearranjos cromossómicos, é ainda suportada pelo trabalho de Meles *et al.* (2007) ao detectar sequências teloméricas intersticiais em vários braços cromossómicos desta espécie, podendo a localização destas sequências ser o resultado de fusões em tandem. Para além disso esta hipótese tem vindo a ser confirmada por “Comparative Chromosome Painting” (Chaves *et al.* 2007 *in prep.*).

De uma forma geral, a elevada heterogeneidade das sequências de HC identificada nos três genomas analisados (c.f. tabelas 13, 14 e 15) sugere a coexistência de diferentes famílias de DNA satélite, ou variantes destas famílias nestes genomas.

IV. 2.2- Análise das relações filogenéticas de Cricetidae e Muridae inferidas pela análise de sequências LINE-1

As sequências LINE-1 (“Long Interspersed Elements-1”) permitem estabelecer relações filogenéticas entre espécies, já que são caracteres não homoplásicos (caracteres que não se assemelham por convergência, tendo tido antes origem num ancestral comum) (Verneau *et al.* 1998, Waters *et al.* 2007). A comparação entre as sequências LINE-1 de *C. cricetus* (CCR L1), *P. eremicus* (PER L1) e *P. tullbergi* (PTU L1), isoladas pela primeira vez neste trabalho, com sequências LINE-1 de *M. musculus*, *R. norvegicus* (famílias Muridae) e de 10 espécies pertencentes à família Cricetidae, disponíveis na base de dados “NCBI Nucleotide”, demonstrou que todas as sequências correspondem a uma determinada região da ORFII da sequência LINE-1 das espécies índice *M. musculus* e *R. norvegicus* (cf. figuras 25 e 26, respectivamente). Sugere-se assim que esta região da sequência se encontra conservada nas várias espécies de roedores, observando-se valores de similaridade entre sequências acima dos 75%. A análise de “Dotplots” onde se comparam as sequências LINE-1 isoladas neste trabalho e sequências LINE-1 de *M. musculus* e *R. norvegicus*, permite observar duplicações e deleções na região de alinhamento entre estas sequências.

O alinhamento das sequências LINE-1 de *C. cricetus*, *P. eremicus*, *P. tullbergi*, *M. musculus*, *R. norvegicus* e de 10 espécies pertencentes à família Cricetidae, permitiu construir um dendograma que relaciona filogeneticamente todas as espécies analisadas (cf. figura 29), comprovando-se uma maior proximidade filogenética entre os roedores pertencentes à mesma família. O alinhamento entre as três sequências isoladas neste trabalho, revelou uma maior similaridade entre as sequências de *C. cricetus* e *P. eremicus*, pertencentes à família Cricetidae, em comparação com a sequência de *P. tullbergi*, que pertence à família Muridae. Esta última sequência apresenta uma maior similaridade com as sequências LINE-1 de *M. musculus* e *R. norvegicus*, pertencendo as três espécies à mesma família e subfamília (Murinae). Quando se aumentou o número de sequências em análise, foi possível observar uma maior similaridade entre sequência de espécies pertencentes à mesma família, subfamília e género (cf. figura 29). Existe assim uma maior proximidade filogenética entre as espécies *Microtus arvalis* e *Microtus cabreræ* (Cricetidae, Arvicolinae, *Microtus*), as espécies *Nectomys squamipes*, *Rhipidomys nitela* e *Sigmodon hispidus* (Cricetidae, Sigmodontinae) e as espécies *Reithrodontomys fulvescens*, *Peromyscus leucopus*, *Peromyscus californicus*, *Peromyscus eremicus*, *Peromyscus maniculatus* e *Peromyscus nudipes* (Cricetidae, Neotominae) (cf. figura 29). As relações filogenéticas determinadas pela análise comparativa de sequências LINE-1 está assim de

acordo com a classificação taxonômica disponível nas bases de dados “NCBI Taxonomy” e “Tree of Life Web Project” (referidas no capítulo II).

IV. 2.3- Considerações sobre a evolução do cromossoma X de *Cricetus cricetus*, *Peromyscus eremicus* e *Praomys tullbergi*

Em 1983, Gartler e Riggs sugeriram que a propagação da inativação do cromossoma X pode ser facilitada por elementos “booster”, sequências envolvidas na amplificação e propagação do sinal de inativação ao longo de todo o cromossoma. Lyon (1998) propôs pela primeira vez as sequências LINE-1 como candidatos a estes elementos, baseando a sua hipótese na observação de uma localização preferencial destas sequências nos cromossomas X de Homem e rato.

Ao realizar-se o mapeamento físico das sequências LINE-1 de *C. cricetus*, *P. eremicus* e *P. tullbergi*, por hibridação *in situ* fluorescente nos respectivos cromossomas, demonstrou-se que estas sequências se encontram “interspersed” ao longo de todos os cromossomas de cada uma das espécies, não se verificando uma localização preferencial destas sequências no cromossoma X, em comparação com os restantes cromossomas do complemento (c.f. figura 30). Estes resultados não permitem assim, suportar a hipótese de Lyon (1998) porém, resultados semelhantes aos nossos têm vindo a ser apresentados em outras espécies de roedores (Casavant *et al.* 2000, Deuve *et al.* 2006). Duas hipóteses podem ser formuladas para justificar os resultados obtidos. Pode ter ocorrido perda de sequências LINE-1 nos cromossomas X das três espécies no decorrer da evolução, sendo que este acontecimento foi anteriormente sugerido para outras espécies de roedores (Casavant *et al.* 2000), embora neste último caso relativo a todo o complemento cromossômico. Outro cenário possível é a existência de diferentes mecanismos de inativação do cromossoma X (pelo menos nestes roedores) sem que haja participação de sequências LINE-1, e neste caso, o genoma não precisaria de conservar estas sequências maioritariamente localizados no cromossoma X, observando-se alternativamente uma distribuição indiferenciada por todo o complemento cromossômico.

A localização “interspersed” das sequências CCR L1, PER L1 e PTU L1 nos genomas de *C. cricetus*, *P. eremicus* e *P. tullbergi* (cf. figura 30), respectivamente, e nos cromossomas das duas espécies índice, *M. musculus* e *R. norvegicus* (cf. figuras 21, 22 e 23), está de acordo com o sugerido na literatura, visto que as sequências LINE-1 são consideradas o principal componente do conjunto de sequências “interspersed” no genoma de mamíferos (Deininger e Batzer 2002).

A análise dos resultados de hibridação da sequência PTU L1 nos cromossomas de *P. tullbergi*, permitiu observar um padrão de diferenciação longitudinal semelhante a um bandeamento longitudinal cromossômico (c.f figura 30c), com localização preferencial em regiões ricas em AT, o que foi já anteriormente referido por Meles *et al.* (2007). Resultados semelhantes, utilizando o mesmo tipo de sonda, foram observados em cromossomas de rato (Boyle *et al.* 1990), roedores do género *Taterillus* (Muridae) (Dobigny 2002), roedores do género *Cryptomys* (Bathyergidae) (Deuve *et al.* 2006), coelho (Waters *et al.* 2004) e Homem (Korenberg e Rykowski 1988). Nos cromossomas de *C. cricetus* e *P. eremicus*, o resultado da hibridação das sequências CCR L1 e PER L1 (respectivamente), não demonstrou bandeamento longitudinal específico de determinadas regiões cromossômicas (c.f figura 30a e figura 30b).

A realização de “Comparative Chromosome Painting” com uma sonda representativa do cromossoma X de *R. norvegicus* (RNOX) em preparações cromossômicas das três espécies de roedores em estudo neste trabalho (c.f figura 31), permitiu caracterizar o cromossoma X de *C. cricetus*, *P. eremicus* e *P. tullbergi*. A sonda de “painting” RNOX revelou três segmentos sinténicos num dos braços do cromossoma X de *C. cricetus* (c.f figura 31a), oito segmentos sinténicos no cromossoma X de *P. eremicus* (c.f figura 31b) e seis segmentos sinténicos no braço longo do cromossoma X de *P. tullbergi* (c.f figura 31c). Esta análise revelou ainda a ocorrência de uma inversão pericêntrica durante a evolução do cromossoma X de *P. eremicus* (c.f figura 32). A hibridação *in situ* da sonda RNOX nos cromossomas X de *C. cricetus* e *P. eremicus*, mostrou que apenas um dos braços destes cromossomas apresenta homologia com o cromossoma X de RNO (observou-se apenas um pequeno segmento sinténico no braço curto do cromossoma X de *P. eremicus*, cf. figuras 31a, 31b, 32 e 33). Em 1969, Ohno considerava que a ocorrência de translocações entre autossomas e cromossomas sexuais, acompanhava a evolução de mamíferos, existindo já nesta altura o conhecimento da ocorrência deste tipo de translocações em roedores (e.g. na espécie *Gerbillus gerbillus* – Muridae). Desde então, vários têm sido os trabalhos que referem a ocorrência de translocações entre autossomas e o cromossoma X em roedores (Viegas- Pequignot *et al.* 1982, Kasahara e Dutrillaux 1983, wahrman *et al.* 1983, Ratomponirina *et al.* 1986, Dobigny. *et al.* 2002, Veyrunes *et al.* 2004, Deuve *et al.* 2006, Veyrunes *et al.* 2007). Também os nossos resultados sugerem a ocorrência deste tipo de rearranjo durante a evolução do cromossoma X de *C. cricetus* e *P. eremicus*. Em relação à análise do cromossoma X de *P. tullbergi*, o número de segmentos sinténicos detectados é superior àquele observado por Chaves *et al.* (2007 *in prep*), ao realizar “Comparative Chromosome Painting” com sondas de “painting” de *M. musculus* e *R.*

norvegicus nesta espécie. Esta discrepância pode ser explicada pela maior condensação dos cromossomas X de *P. tullbergi* com que estes autores trabalharam.

A caracterização da heterocromatina constitutiva realizada durante este trabalho revelou a existência de bandas-C a flanquear alguns segmentos sinténicos discriminados pelo “paint” RNOX no cromossoma X das três espécies de roedores (cf. figura 33), sugerindo a participação destas sequências na ocorrência dos rearranjos cromossómicos que originaram estes cromossomas. No cromossoma X de *P. eremicus* foi possível observar uma banda-C críptica, revelada após a acção das endonucleases AluI, PstI e RsaI, a flanquear dois segmentos sinténicos (c.f figura 33), o que sugere a importância da identificação deste tipo de bandas-C. A utilização de um maior número de endonucleases de restrição e bandeamento-C sequencial, poderá vir a identificar mais bandas-C crípticas, que podem encontrar-se a flanquear segmentos sinténicos identificados pela sonda de “painting” RNOX, no cromossoma X das espécies de roedores estudadas.

Para se comprovar a hipótese de que as sequências de heterocromatina correspondem a regiões de “breakpoints” evolutivos, foi analisada *in silico*, a distribuição cromossómica de sequências repetitivas em tandem e simultaneamente a localização de regiões de “breakpoints” evolutivos no cromossoma X da espécie índice *M. musculus*. Nesta análise recorreu-se às sintenias entre cromossomas do *M. musculus*, *R. norvegicus* e *H. sapiens*, para a identificação de regiões de “breakpoints” evolutivos no cromossoma X de *M. musculus*, e de ferramentas bioinformáticas que permitiram a avaliação da densidade de sequências repetitivas em tandem neste cromossoma. Resultados preliminares desta análise demonstram que as regiões que apresentam maior densidade de sequências repetitivas em tandem (c.f figura 34), correspondem de facto, a regiões de “breakpoints” evolutivos, o que vem comprovar o importante papel destas sequências na reorganização da arquitectura dos genomas ao longo da evolução. No Homem foi já constatada uma notável correlação entre a localização de regiões de “breakpoints” evolutivos e a distribuição de sequências repetitivas em tandem para todos os autossomas (Ruiz-Herrera *et al.* 2006).

Em forma de resumo, demonstrou-se que as sequências LINE-1 de *C. cricetus*, *P. eremicus* e *P. tullbergi* se encontram “interspersed” ao longo de todos os cromossomas de cada uma das espécies, não se verificando uma localização preferencial destas sequências no cromossoma X, em comparação com os restantes cromossomas do complemento (c.f figura 30). Estes resultados não permitem suportar a hipótese de Lyon (1998), que relaciona a distribuição preferencial destas sequências no cromossoma X com a propagação do sinal de

inativação neste cromossoma. Quando se compararam os cromossomas X de *C. cricetus*, *P. eremicus* e *P. tullbergi*, observaram-se diferenças ao nível da sua morfologia, e da quantidade, localização e natureza molecular da sua heterocromatina, sugerindo que se originaram através da ocorrência de rearranjos cromossómicos como inversões, transposições centroméricas, adições/eliminações de heterocromatina e translocações Robertsonianas, como é o caso do cromossoma X de *C. cricetus* (c.f figura 18), que apresenta dois blocos de heterocromatina constitutiva na região (peri)centromérica. A identificação dos segmentos sinténicos entre os cromossomas X de *P. eremicus* e *R. norvegicus*, por “Comparative Chromosome Painting”, permitiu ainda detectar a ocorrência de uma inversão pericêntrica durante a evolução do cromossoma X de *P. eremicus*. O maior número de subclasses de heterocromatina constitutiva identificado no cromossoma X de *P. tullbergi* (c.f tabela 15), comparativamente às diferentes espécies em análise (c.f tabela 13 e 14), sugere que o cromossoma X desta espécie é o mais rearranjado. No entanto, a análise dos segmentos sinténicos no cromossoma X das três espécies de roedores, com a sonda de “painting” RNOX, sugere o cromossoma X de *P. eremicus* como sendo o mais rearranjado. Esta aparente discordância deve-se provavelmente às diferentes análises efectuadas, nomeadamente, identificação de subclasses de heterocromatina e de segmentos sinténicos entre cromossomas de diferentes espécies, sendo indispensável uma investigação mais detalhada, de modo a clarificar efectivamente os mecanismos subjacentes à evolução destes cromossomas.

Capítulo V

Conclusões e Perspectivas Futuras

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

No presente trabalho caracterizou-se detalhadamente a heterocromatina constitutiva (HC) dos cromossomas de três espécies de roedores, *C. cricetus*, *P. eremicus* (Família Cricetidae) e *P. tullbergi* (Família Muridae), recorrendo-se à metodologia de restrição *in situ* e bandeamento-C sequencial. Esta metodologia permitiu detectar uma elevada heterogeneidade molecular das sequências de HC nos três genomas, provando ser uma ferramenta útil no estudo destas sequências. A comparação geral da quantidade, localização e natureza molecular da heterocromatina constitutiva, entre as três espécies de roedores analisadas, sugere a ocorrência de diferentes percursos evolutivos envolvidos na origem destes cariótipos. Considera-se assim que, a localização preferencial das sequências de HC em regiões (peri)centroméricas dos cromossomas de *C. cricetus*, apresentando a maioria dos cromossomas dois blocos de HC com esta localização, sugere a ocorrência de, pelo menos, translocações Robertsonianas durante a evolução deste cariótipo. Na espécie *P. eremicus*, a elevada heterogeneidade das sequências de HC revelada na maioria dos braços curtos dos seus cromossomas, é indicativa da coexistência de diferentes famílias de DNA satélite, ou variantes, nestas regiões. A forma de distribuição e o elevado número de subclasses de HC identificado nos cromossomas de *P. tullbergi*, sugere que este cariótipo é o mais derivativo dos analisados neste trabalho, tendo sido originado pela ocorrência de um elevado número de complexos rearranjos cromossómicos.

A comparação entre as sequências LINE-1 de *C. cricetus*, *P. eremicus*, *P. tullbergi*, (isoladas pela primeira vez neste trabalho) *M. musculus*, *R. norvegicus* e de 10 espécies pertencentes à família Cricetidae (disponíveis na base de dados “NCBI Nucleotide”), demonstrou que todas as sequências correspondem a uma determinada região da ORFII da sequência LINE-1 de *M. musculus* e *R. norvegicus*. Sugere-se assim que esta região da sequência está conservada nas várias espécies de roedores. O alinhamento de todas as sequências permitiu construir um dendograma que relaciona filogeneticamente todas as espécies analisadas, comprovando-se uma maior proximidade filogenética entre os roedores pertencentes à mesma família, como seria de esperar.

O mapeamento físico das sequências LINE-1 de *C. cricetus*, *P. eremicus* e *P. tullbergi*, nos respectivos cromossomas, não evidenciou uma localização preferencial destas sequências no cromossoma X em relação aos autossomas, não sendo assim possível suportar a hipótese de Lyon (1998), que relaciona a grande “acumulação” destas sequências no cromossoma X com a propagação do sinal de inactivação neste cromossoma.

Quando se compararam os cromossomas X de *C. cricetus*, *P. eremicus* e *P. tullbergi*, observaram-se diferenças ao nível da sua morfologia, e na quantidade, localização e natureza molecular da sua heterocromatina, sugerindo que se originaram através da ocorrência de rearranjos cromossómicos como inversões, transposições centroméricas, adições/eliminações de heterocromatina e translocações Robertsonianas.

A caracterização da HC realizada durante este trabalho revelou a existência de bandas-C a flanquear alguns segmentos sinténicos discriminados pelo “paint” RNOX, no cromossoma X das três espécies estudadas, o que parece sugerir a participação destas sequências na ocorrência dos rearranjos cromossómicos que originaram estes cromossomas. Resultados preliminares, da análise *in silico* (realizada neste trabalho), sobre a distribuição cromossómica de sequências repetidas em tandem e a localização de regiões de “breakpoints” evolutivos no cromossoma X da espécie índice *M. musculus*, demonstraram que as regiões que apresentam maior densidade de sequências repetidas em tandem correspondem a regiões de “breakpoints” evolutivos, o que vem comprovar o importante papel destas sequências na reorganização da arquitectura dos genomas ao longo da evolução.

Futuros trabalhos que visem o estudo e caracterização de sequências de heterocromatina constitutiva, nomeadamente sequências de DNA satélite isoladas, por exemplo por microdissecção de regiões centroméricas de cromossomas, e a construção de mapas comparativos para diferentes espécies de roedores, irão certamente contribuir para um melhor entendimento dos processos evolutivos que moldaram estes genomas e das relações filogenéticas entre espécies.

Capítulo VI

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adega F, Chaves R e Guedes-Pinto H (2007) Constitutive heterochromatin characterization of White-lipped and Collared peccaries (Tayassuidae). *Journal of Genetics* **86**:19-26.
- Adega F, Chaves R e Guedes-Pinto H (2005) Chromosome Restriction Enzyme Digestion in Domestic Pig (*Sus scrofa*) Constitutive heterochromatin arrangement. *Genes Genet. Syst.* **80**: 49-56.
- Adkins RM, Walton AH e Honeycutt RL (2003) Higher-level systematics of rodents and divergence time estimates based on two congruent nuclear genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **26**: 409-420.
- Ananiev EV, Phillips RL e Rines HW (1998) Complex structure of knob DNA on maize chromosome 9. Retrotransposon invasion into heterochromatin. *Genetics* **149**: 2025-2037.
- Anopriyenko OA e Zakian SM (2004) Evolution of Mammalian Sex Chromosomes cooperation of Genetics and Epigenetic Factors. *Russian Journal of Genetics* **40(8)**: 825-842.
- Arakawa Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Sutou S e Suzuki H (2002) X-chromosomal localization of mammalian Y-linked genes in two XO species of the Ryukyu spiny rat. *Cytogenet Genome Res* **99**: 303-309.
- Ayling LJ e Griffin D K (2002) The evolution of the sex chromosomes. *Cytogenet Genome Res* **99**:125-140.
- Babu A e Verma RS (1986) Characterization of human chromosomal constitutive heterochromatin. *Can J Genet Cytol* **28**: 631-645.
- Bailey JA, Carrel L, Chakravarti A e Eivhler EE (2000) Molecular evidence for a relationship between LINE-1 elements and X chromosome inactivation: the Lyon repeat hypothesis. *PNAS* **97(12)**: 6634-6639.
- Baker RJ e Kass DH (1994) Comparison of chromosomal distribution of a retroposon (LINE) and a retrovirus-like element mys in *Peromyscus maniculatus* and *P. leucopus*. *Chromosome Research* **2(3)**: 185-9.
- Baskin JA (1989) The initial origin and diversification of the Neotropical Sigmodontinae (Rodentia: Muridae) – a perspective from the North American fossil record. pp. 263-264 in Abstracts of papers and posters. Fifth International Theriological Congress, Rome.

- Belov K, Hellman L e Cooper DW (2002) Characterization of echidna IgM provides insights into the time of divergence of extant mammals. *Dev Comp Immunol* **26**: 831-839.
- Benton MJ (1999) Early Origins of modern birds and mammals: molecules vs. morphology. *BioEssays* **21**: 1043-1051.
- Benton MJ (1997) Vertebrate Palaeontology. Second Edition. Chapman & Hall, London. 288-362 pp.
- Benson G (1999) Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences *Nucleic Acid Research* **27**: 573-580.
- Bernard P e Couturier M (1992) Cell Killing by the F plasmid CcdB Protein Involves Poisoning of DNA- Topoisomerase II Complexes. *J. Mol. Biol.* **226**: 735-745.
- Bernard P, Gabant P, Bahassi EM e Couturier M (1994) Positive Selection Vectors Using the F Plasmid ccdB Killer Gene. *Gene* **148**: 71-74.
- Bianchi MS, Bianchi OL, Pantelias GE e Wolff S (1985) The mechanism and pattern of banding induced by restriction endonuclease in human chromosomes. *Chromosoma* **91**:18-25.
- Boyle AL, Ballard SG e Ward DC (1990) Differential distribution of long and short interspersed element sequences in the mouse genome: chromosome karyotyping by fluorescence in situ hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**: 7757-7761.
- Brun ME, Ruault M, Ventura M, Roizés G e De Sario A (2003) Juxtacentromeric region of human chromosome 21: a boundary between centromeric heterochromatin and euchromatic chromosome arms. *Gene* **312**: 41–50.
- Burkholder GD (1989) Morphological and biochemical effects of nucleases on isolated mammalian chromosomes “in vitro”. *Chromosoma* **97**: 347-355.
- Cao Y, Fujiwara M, Nikaido M, Okada N e Hasegawa M (2000) Interordinal relationships and timescale of eutherian evolution as inferred from mitochondrial genome data. *Gene* **259**:149-158.
- Capanna E, Codjia JTC, Chrysostome C e Civitelli MV (1996) Les chromosomes des Rongeurs du Bénin (Afrique de l’Ouest): 3 Murinae. Atti della Accademia dei lincei classe di scienze fisiche matematiche e naturali rendiconti lincei scienze fisiche e naturali **8 (9)**: 25–37.
- Casavant NC, Scott L, Cantrell MA, Wiggins LE, Baker RJ e Wichman HA (2000) The end of the LINE?: lack of recent L1 activity in a group of South American rodents. *Genetics Society of America* **154**: 1809-1817.

- Caspersson T, Lomakka G e Zech L (1971) The 24 fluorescence patterns of human chromosomes – distinguishing characters and variability. *Hereditas* **67**:89-102.
- Charlesworth B (1996) The evolution of chromosomal sex determination and dosage compensation. *Curr Bio* **6**: 149-162.
- Charlesworth B e Charlesworth D (1997) Rapid fixation of deleterious alleles can be caused by Muller's ratchet. *Genet. Res. Camb.* **70**: 63-73.
- Charlesworth B e Dempsey ND (2001) A model of the evolution of the unusual sex chromosome system of *Microtus oregoni*. *Heredity* **86**: 387-394.
- Chaves R, Adegá F, Meles S, Guedes-Pinto H and Wienberg J (2007) *Praomys tullbergi* genome architecture decoded by the related genomes *Mus* and *Rattus* *Chromosome Research (em preparação para publicação)*.
- Chaves R, Adegá F, Santos S, Guedes-Pinto H. e Heslop-Harrison JS (2002) In situ hybridization and chromosome banding in mammalian species. *Cytogenet Genome Res* **96**: 113-116.
- Chaves R, Santos S e Guedes-Pinto H (2004) Comparative analysis (Hippotragini versus caprini, Bovidae) of X-chromosome's constitutive heterochromatin by *in situ* restriction endonuclease digestion: X-chromosome constitutive heterochromatin evolution. *Genetica* **121**: 315-325.
- Chaves R (2002) Organização e evolução do genoma da família Bovidae. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. Vila Real.
- Chow JC, Yen Z, Ziesche MS e Brown CJ (2005) Silencing of the Mammalian X Chromosome. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **6**: 69 – 92.
- Clark MS e Wall WJ (1996) Speciation in ancient mammalian group, pp. 246-254 in *Chromosomes – The complex Code*. Chapman and Hall, London.
- Committee for standartization of chromosomes of *Peromyscus* (1977) Standard karyotype of the deer mice, *Peromyscus* (Rodentia). *Cytogenet. Cell Genet.* **19**: 38-43.
- Corradini N, Rossi F, Giordano E, Caizzi R, Vern F e Dimitri P (2007) *Drosophila melanogaster* as a model for studying protein-encoding genes that are resident in constitutive heterochromatin. *Heredity* **98**: 3-12.
- Davidow LS, Breen M, Duke SE, Samollow PB e McCarrey JR (2007) The search for a marsupial XIC reveals a break with vertebrate syteny. *Chromosome Research* **15**: 137-146.

- Dawson WD, Young SR, Wang Z e Liu LW (1999) Greenbaum I.F., Davis L.M., Hall B.K., *Mus* and *Peromyscus* chromosome homology established by FISH with three mouse paint probes. *Mammalian Genome* **10**: 730–733.
- Deaven LL, Vidal-Rioja L, Jett JH, e Hsu TC (1977) Chromosomes of *Peromyscus* (Rodentia, Cricetidae). VI. The genomic size. *Cytogenet Cell Genet.* **19(5)**:241-9.
- Deininger PL e Batzer MA (2002) Mammalian Retroelements. *Genome Research* **12**: 1455-1465.
- Denys C e Jaeger JJ (1986) A biostratigraphic problem: The case of the East African Plio-Pleistocene rodent faunas. *Modern. Geol.* **10**: 215–233.
- Denys C, Lecompte E, Granjon L, Baylac M, Cordeiro P, Cornette R, Dobigny G, Calvet EF, Hugot JP, Meslage C, Millien-Parra V, Petrillo P, Volobouev V e Welz M (2003) Integrative systematics: the importance of combining techniques for increasing knowledge of African Murinae. *In: Rats, mice and people: rodent biology and management.* ACIAR Monograph No. 96, 564p.
- De La Maza LM e Sawyer JR (1976) The G and Q banding pattern of *Ellobius lutescens*. A unique case of sex determination in mammals. *Can J Genet Cytol* **18**: 497-502.
- D’Erchia AM, Gissi C, Pesole G, Saccone C e Arnason U (1996) The guinea-pig is not a rodent. *Nature* **381**:597–600.
- Deuve JL, Bennett NC e O’Brien PCM, Ferguson-Smith MA, Faulkes CG, Britton-Davidian J e Robinson TJ (2006) Complex evolution of X and Y autosomal translocations in the giant mole-rat, *Cryptomys mehowi* (Bathyergidae). *Chromosome Research* **14**: 681–691.
- Dillon N (2004) Heterochromatin structure and function. *Biology of the Cell* **96**: 631-637.
- Dimitri P, Corradini N, Rossi F e Verní F (2004) The paradoxo of functional heterocromatin. *BioEssays* **27**: 28-41.
- Dobigny G, Aniskin V e Volobouev V (2002) Explosive chromosome evolution and speciation in the gerbil genus *Taterillus* (Rodentia, *Gerbillinae*): a case of two new cryptic species. *Cytogenet Genome Res* **96**: 117-124.
- Dobigny G, Ozouf-Costaz C e Bonillo C (2004) Viability of X- autosome translocations in mammals: an epigenomic hypothesis from a rodent case-study. *Chromosoma* **113**: 34-41.
- Dover GA (1986) Molecular drive in multigene families: How biological novelties arise, spread and are assimilated. *Trends in Genetics* **2**:159-165.

- Ducroz JF, Volobouev V e Granjon L (2001) An Assessment of the Systematics of Arvicanthine Rodents Using Mitochondrial DNA sequences: Evolution and Biogeographical Implications. *Journal of Mammalian Evolution*. **8(3)**: 173-206.
- Elder JF e Turner BJ (1995) Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eukaryotes. *The Quarterly Review of Biology* **70**:297-320.
- Elisaphenko EA, Nesterova TB e Duthie SM (1998) Repetitive DNA sequences in the common vole: cloning, characterization and chromosome localization of two novel complex repeats MS3 and MS4 from the genome of the East European vole *Microtus rossiaemeridionalis*. *Chromosome Res* **6**: 351-360.
- Engel SR, Hogan KM, Taylor JF e Davis SK (1998) Molecular Systematics and Paleobiogeography of the South American Sigmodontine Rodents. *Mol. Biol. Evol.* **15(1)**: 35-49.
- Fan Y, Linardopoulou E, Friedman C, Williams E e Trask BJ (2002) Genomic structure and evolution of the ancestral chromosome fusion site in 2q13-2q14.1 and paralogous regions on other human chromosomes. *Genome Res* **12**: 1651-1662.
- Feldhamer GA, Drickamer LC, Vessey SH e Merritt JF (2003) Mammalogy. Adaptation, Diversity, and Ecology. Second Edition. Mc Graw Hill, Boston. 280-299.
- Fonatsch C (1973) Banding patterns of European hamster chromosomes (*Cricetus cricetus*, 2n=22). *Mammal. Chrom. Newsl.* **14**: 23-25.
- Fredga K (1972) Comparative chromosome studies in mongooses (Carnivora, Voverridae). I. Idiograms of 12 species and karyotype evolution in Herpestinae. *Hereditas* **71**: 1-74.
- Froenicke F (2005) Origins of primate chromosomes - as delineated by Zoo-FISH and alignments of human and mouse draft genome sequences. *Cytogenet Genome Res* **108**: 122-138.
- Frönicke L, Müller-Navia J, Romanakis K e Scherthan H (1997) Chromosomal homeologies between human, harbor seal (*Phoca vitulina*) and the putative ancestral carnivore karyotype revealed by Zoo-FISH. *Chromosoma* **106**:108–113.
- García L, Ponsá M, Egozcue J e Garcia M (2000) Comparative chromosomal analysis and phylogeny in four *Ctenomys* species (Rodentia, Octodontidae). *Biological Journal of the Linnean Society* **69**: 103-120.
- Gartler SM e Riggs AD (1983) Mammalian X-chromosome inactivation. *Ann Rev Genet* **17**: 155–190.
- Gould DC, Callan HG e Thomas CA (1976) The action of restriction endonucleases on lampbrush chromosomes. *J Cell Sci* **21**: 303-313.

- Gamperl R, Vistorin G e Rosenkranz W (1978) Comparison of chromosome banding patterns in five members of Cricetinae with comments on possible relationships. *Caryologia* **31**: 343-353.
- Gamperl R, Vistorin G e Rosenkranz W (1976) A comparative analysis of the karyotypes of *Cricetus cricetus* and *Cricetulus griseus*. *Chromosoma* **55**: 259-265.
- Gamperl R (1984) Karyological studies on European rats. *Genetica* **53**: 87-92
- Gosálvez J, López-Fernandéz C, Goyanes V e Mezzanote R (1997) Chromosomes differentiation using nucleases: na overview in chromosomes Today. N. Henriques-Gil, JS Parker, MJ. Puertas (eds). Chapman & Hall **2**: 23-49.
- Gaur D, Hide WA e Li W-H (1991) Is the guinea-pig a rodent? *Nature* **351**:649–652.
- Graves JAM (1995) The origin and function of the mammalian Y chromosome and Y-borne genes- an evolving understanding. *Bioessays* **17**: 311–320.
- Graves JAM, Wakefield M.J e Toder R (1998) The Origin and evolution of the pseudoautosomal regions of human sex chromosomes. *Human Molecular Genetics* **7(13)**: 1991-1996.
- Graves JAM e Shetty S (2000) Comparative Genomics of Vertebrates and the evolution of Sex Chromosomes. In: *Comparative Genomics* Melody Clark ed. Kluwer Academic Publishers, Massachusetts.
- Graves JAM, Gécz J e Hameister H (2002) Evolution of the human X- a smart and sexy chromosome that controls speciation and development. *Cytogenet Genome Res* **99**: 141- 145.
- Graves JAM (2005) Recycling the Y Chromosome. *Science* **307**: 50-51.
- Graves JAM (2006) Sex Chromosomes Specialization and Degeneration in Mammals. *Cell* **124**: 901-914.
- Griffin D, Harvey SC, Campos-Ramos R, Ayling LJ, Bromage NR, Masabanda JS e Penman DJ (2002) Early origins of the X and Y chromosomes: lessons from tilapia. *Cytogenet Genome Res* **99**: 157-163.
- Grunau C, Buard J, Brun ME e De Sario A (2006) Mapping of the juxtacentromeric heterochromatin-euchromatin frontier of human chromosome 21. *Genome Research* **16**:1198–1207.
- Hale DW, Hedin MC, Smith SA, Sudman PD and Greenbaum IF (1991) The effect of heterochromatin on synapsis of the sex chromosomes of *Peromyscus* (Rodentia, Cricetidae). *Cytogenet Cell Genet.* **56(1)**:48-56.

- Hamilton MJ, Honeycutt RL e Baker RJ (1990) Intragenomic movement, sequence amplification and concerted evolution in satellite DNA in harvest mice, *Reithrodontomys*: evidence from in situ hybridization. *Chromosoma* **99**: 321-329.
- Hartenberger JL (1998) Description de la radiation des Rodentia (Mammalia) du Paléocène supérieur au Miocène; incidences phylogénétiques. *C. R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la terre et des planètes* **326**: 439–444.
- Hayle C (1995) Chromosome painting with human chromosome-specific DNA libraries reveals the extent and distribution of conserved segments in bovine chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* **71**: 168-174.
- Henikoff S, Ahmad K e Malik HS (2001) The centromere paradox: stable inheritance with rapidly evolving DNA. *Science* **293**:1098–1102.
- Hervé P (1997) Rodent Monophyly: pitfalls of Molecular Phylogenies. *J Mol Evol* **45**: 712-715.
- Hore TA, Koina E, Wakefield MJ e Graves JAM (2007) The region homologous to the X-chromosome inactivation centre has been disrupted in marsupial and monotreme mammals. *Chromosome Research* **15**:147–161.
- Huchon D, Madsen O, Sibbald MJJB, Ament K, Stanhope MJ, Catzeflis F, Jong WW e Douzery EJP (2002) Rodent phylogeny and Timescale for evolution of glires: Evidences from an Extensive Taxon Sampling Using Three Nuclear Genes. *Mol. Bio. Evol.* **19(7)**: 1053-1065.
- Hsu TC e Arrighi FE (1966) Chromosomal evolution in the genus *Peromyscus* (Cricetidae,Rodentia). *Cytogenetics* **5**: 355-359.
- Jabbari K e Bernardi G (1998) CpG doublets, CpG islands and Alu repeats in long human DNA sequences from different isochore families. *Gene* **224**: 123-127.
- Jacobs LL (1978) Fossil rodents (Rhizomyidae and Muridae) from Neogene Siwalik deposits, Pakistan. *Mus. North Arizona Press Bull.* **52**: 1–104.
- Janke A, Xu X e Arnason U (1997) The complete mitochondrial genome of the wallaroo (*Macropus robustus*) and the phylogenetic relationship among Monotremata, Marsupialia and Eutheria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 1276-1281.
- Jansa SA e Weksler M (2004) Phylogeny of muroid rodents: relationships within and among major lineages as determined by IRBP gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **31**: 256-276.
- Ji Q, Luo Z, Yuan C, Wible JR, Zhang J e Georgi JA (2002) The earliest known eutherian mammal. *Nature* **416**: 816-822.

- Jobse C, Buntjer JB, Haagsma N, Breukelman HJ, Beintema JJ e Lenstra JA (1995) Evolution and recombination of Bovine DNA repeats. *J Mol Evol* **41**: 277-283.
- John B (1988) The biology of heterochromatin. In: Heterochromatin (Verma, R.S., ed.). Cambridge, Cambridge University Press.
- Jones KW (1977) Repetitive DNA and primate evolution. In: *Molecular Structure of Human chromosomes* Yunis JJ ed. Academic Press, New York.
- Just W, Rau W e Vogel W (1995) Absence of Sry in species of the vole *Ellobius*. *Nature Genet* **11**: 117-118.
- Kalscheuer V, Singh AP, Nanda I, Sperling K e Neitzel H (1996) Evolution of the gonosomal heterochromatin of *Microtus agrestis*: rapid amplification of a large, multimeric, repeat unit containing a 3.0-kb (GATA)₁₁-positive, middle repetitive element. *Cytogenet Cell Genet* **73**: 171-178.
- Kasahara S e Dutrillaux B (1983) Chromosome banding patterns of four species of bats, with special reference to a case of X-autosome translocation. *Ann Genet* **26**:197–201.
- Kehrer-Sawatzki H, Schreiner B, Tanzer S, Platzer M, Muller S e Hameister H (2005) Molecular characterization of the pericentric inversion that causes differences between chimpanzee chromosome 19 and human chromosome 17. *Am J Hum Genet* **71**: 375-388.
- Khil PP e Camerini-Otero RD (2005) Molecular Features and Functional Constraints in the Evolution of the Mammalian X Chromosome. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **40**: 313-330.
- Kobayashi T, Yamada F, Hashimoto T, Abe S, Matsuda Y e Kuroiwa A (2007) Exceptional minute sex-specific region in the X0 mammal, Ryukyu spiny rat. *Chromosome Research* **15**: 175-187.
- Korenberg JR e Rykowski MC (1988) Human genome organization: Alu, lines, and the molecular structure of metaphase chromosome bands. *Cell* **53**:391–400.
- Kozlova SV, Mazurok NA, Vershinin AV e Zakian SM (2003) Various organizations of the complex repeats in vole sex chromosome heterochromatin. *Chromosome Res* **11**: 759-769.
- Kumar S e Hedges SB (1998) A molecular timescale for vertebrate evolution. *Nature* **392**: 917-920.
- Kuroiwa A, Tsuchiya K, Watanabe T, Hishigaki H, Takahashi E, Namikawa T e Matsuda Y (2001) Conservation of the rat X chromosome gene order in rodent species. *Chromosome Research* **9**: 61-67.

- Kuroiwa A, Watanabe T, Hishigaki H, Takahashi E, Namikawa T e Matsuda Y (1998) Comparative FISH map-ping of mouse and rat homologues of twenty-one human X-linked genes. *Cytogenet Cell Genet* **81**: 208-212.
- Larsson J e Meller VH (2006) Dosage compensation, the origin and the afterlife of sex chromosomes. *Chromosome Research* **14**: 417-431.
- Lecompte E, Granjon L e Denys C (2002) The phylogeny of the Praomys complex (Rodentia: Muridae) and its phylogeographic implications. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* **40**: 8-25.
- Lecompte E, Denys C e Granjon L (2005) Confrontation of morphological and molecular data: The Praomys group (Rodentia, Muridae) as a case of adaptative convergences and morphological stasis. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **37**: 899-919.
- Leitão A, Chaves R, Santos S, Guedes-Pinto H e Boudry P (2004) Restriction enzyme digestion chromosome banding in Crassostrea and Ostrea species: comparative karyological analysis withing ostreidae. *Genome* **47 (5)**: 781-788.
- Levinson G e Gutman GA (1987) Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol Biol Evol* **4**: 203-221.
- Locke DP, Archidiacono N, Miscio D, Cardone MF, Deschamps S, Roe B, Rocchi M e Eichler EE (2003) Refinement of a chimpanzee pericentric inversion breakpoint to a segmental duplication cluster. *Genome Biol* **4**: R50.
- Lyon MF (2006) Do LINEs Have a Role in X-chromosome Inactivation?. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. Volume 2006, Article ID 59746: 1-6.
- Lyon MF (1998) X-Chromosome Inactivation Spreads Itself: Effects in Autosomes. *Am. J. Hum. Genet.* **63**:17–19.
- Lyon MF (1961) Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature* **190**:372–373.
- Marchal JA, Acosta MJ, Bullejos M, Puerma E, Díaz de la Guardia R e Sánchez A (2006) Distribution of L1-retrotransposons on giant sex chromosomes of *Microtus cabreræ* (Arvicolidae, Rodentia): functional and evolutionary implications. *Chromosome Research* **14**: 177-186.
- Marchal JA, Acosta MJ, Nietzel H, Sperling K, Bullejos M, Díaz de la Guardia R e Sánchez A (2004) X chromosome painting in Microtus: Origin and evolution of the giant sex chromosomes. *Chromosome Research* **12**: 767–776
- Maryorov VI (1999) Characterization of several LINE-1 elements in *Microtus kirgisorum*. *Mammalian Genome* **10**: 724-729.

- Martin Y, Gerlach G, Schlötterer C e Meyer A (2000) Molecular Phylogeny of European Muroid Rodents Based on Complete Cytochrome b Sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. **16(1)**: 37-47.
- Matthey R (1958) Les chromosomes et la position systématique de quelques Murinae africains (Mammalia–Rodentia). *Acta Tropica* **15**: 97–117.
- Matthey R (1952) Chromosomes des Muridae (Microtinae et Cricetinae). *Chromosoma* **5**: 113-138.
- Mayorov VI, Adkison LR e Vorobyeva NV (1996) Organization and chromosomal localization of a B1-like containing repeat of *Microtus subarvalis*. *Mamm Genome* **7**: 593-597.
- McKenna MC e Bell SK (1997) Classification of Mammals above the Species Level. *Columbia University Press*, New York.
- Meles S, Adegas F, Guedes-Pinto H, Chaves R (2007) The karyotype of *Praomys tullbergi* (Muridae, Rodentia): a detailed characterization. *Micron* (publicado online) doi:10.1016/j.micron.2007.07.002.
- Mezzanotte R, Bianchi U, Vanni R e Ferrucci L (1983a) Chromatin organization and restriction nuclease activity on human metaphase chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* **36**: 562-566.
- Mezzanotte R, Ferrucci L e Vanni R (1983b) Selective digestion of human metaphase chromosomes by Alu I restriction endonucleases. *J Hist Cyt* **31**: 553-556
- Michaux J e Catzefflis F (2000) The bushlike radiation of muroid rodents is exemplified by the molecular phylogeny of the LCAT nuclear gene *Mol. Phylogenet. Evol* **17**: 280-293.
- Michaux J, Reyes A e Catzefflis F (2001) Evolutionary History of the Most Speciose Mammals: molecular Phylogeny of Muroid Rodents. *Mol. Biol. Evol.* **18(11)**: 2017-2031.
- Miller DA, Gosden JR e Hastie ND (1984) Mechanism of endonuclease banding chromosomes. *Exp. Cell. Res.* **155**: 294-298.
- Miller DA e Choi Y-C (1983) Chromosome localization of highly repetitive human DNA's and amplified ribosomal DNA with restriction enzymes. *Science* **219**: 395-397.
- Morais A (2004) Padrões de Bandeamento Por Restrição *in situ* e “Bar Codes” para cromossomas humanos. Aplicações a casos de citogenética clínica. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. Vila Real.
- Muller HJ (1964) The relation of recombination to mutation-al advance. *Mutat Res* **1**:2-9.

- Mullis KB (1990) The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am* **July**: 56-65.
- Murphy WJ, Larkin DM, Everts-Van der Wind A, Bourque G, Tesler G, Auvil L, Beever JE, Chowdhary BP, Galibert F e Gatzke L (2005) Dynamics of mammalian chromosome evolution inferred from multispecies comparative maps. *Science* **309**: 613-617.
- Musser G e Carleton M (2005) Superfamily Muroidea. D. E. Wilson, D. M. Reeder, eds. *Mammal Species of the World*. Washington, DC: Smithsonian Institution Press.
- Nagl W e Schmitt HP (1985) Transcription of repetitive DNA in condensed plant chromatin. *Molecular Biology Reports* **10**: 143-146.
- Nanda I, Haaf T, Scharl M, Schmid M e Burt DW (2002) Comparative mapping of Z-orthologous genes in vertebrates: implications for the evolution of avian sex chromosomes. *Cytogenet Genome Res* **99**: 178-184.
- Nechay G (2000) Status of Hamsters *Cricetus cricetus*, *Cricetus migratorius*, *Mesocricetus newtoni* and other hamster species in Europe. *Nature and Environment* Series, No. 106.
- Neitzel H, Kalscheuer V, Henschel S, Digweed M e Sperling K (1998) Beta-heterochromatin in mammals: evidence from studies in *Microtus agrestis* based on the extensive accumulation of L1 and non-L1 retroposons in the heterochromatin. *Cytogenet Cell Genet* **80**: 165-172.
- Neumann K, Michaux J, Lebedev V, Yigit N, Colak E, Ivanova N, Poltoraus A, Surov A, Markov G, Maak S, Neumann S e Gattermann R (2006) Molecular phylogeny of the Cricetinae subfamily based on the mitochondrial cytochrome b and 12S rRNA genes and the nuclear vWF gene. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **39**: 135–148.
- Nicolas V, Verheyen E, Verheyen W, Hulselmans J, Dillens M, Akpatou B, Dudu A, Wendelen W e Colyn M (2005) Systematics of African lowland rainforest Praomys (Rodentia, Muridae) based on molecular and craniometrical data. *Zoological Journal of the Linnean society* **145**: 539-553.
- Nieddu M, Rossino R, Pichiri G, Rocchi M, Setzu MD e Mezzanotte R (1999) The efficiency of in situ hybridization on human chromosomes with alphoid DNAs is enhanced by previous digestion with *AluI* and *TaqI*. *Chromosome Res.* **7**: 593–602.
- Nijman IJ e Lenstra JA (2001) Mutation and recombination in cattle satellite DNA: a feedback model for the evolution of satellite DNA repeats. *J. Mol Evol* **52**: 361-371.
- Nowak RN (1991) Walker's Mammals of the World. The Johns Hopkins University Press: Baltimore, MD. 1629 pp.
- Ohno S (1967) Sex Chromosomes and sex linkage genes. Springer Verlag, Berlin.

- Pack SD, Borodin PM, Serov OL e Searle JB (1993) The Xautosome translocation in the common shrew (*Sorex araneus* L.): late replication in female somatic cells and pairing in male meiosis. *Chromosoma* **102**: 355-360.
- Pathak S, Hsu TC e Arrighi FE (1973) Chromosomes of *Peromyscus* (Rodentia, Cricetidae). IV. The role of heterochromatin in karyotypic evolution. *Cytogenet. Cell Genet.* **12**:315-326.
- Peacock WJ, Dennis ES e Gerlach WL (1982) DNA sequence changes and speciation. *Prog Clin Biol Res* **96**: 123-142.
- Puttagunta R, Gordon LA, Meyer GE, Kapfhamer D, Lamerdin JE, Kantheti P, Portman KM, Chung WK, Jenne DE, Olsen AS e Burmeister M (2000) Comparative maps of human 19p13.3 and mouse chromosome 10 allow identification of sequences at evolutionary breakpoints. *Genome Res* **10**:1369-1380.
- Qumsiyeh MB, King SW, Arroyo-Cabrales J, Aggundey IR, Schlitter DA, Baker RJ e Morrow KJ (1990) Chromosomal and protein evolution in morphologically similar species of *Praomys* sensu lato (Rodentia, Muridae). *J. Hered.* **81**: 58-65.
- Ratomponirina C, Viegas-Pequignot E, Dutrillaux B, Petter F e Rumpler Y (1986) Synaptonemal complexes in Gerbillidae: probable role of intercalated heterochromatin in gonosomeY autosome translocations. *Cytogenet Cell Genet* **43**: 161-167.
- Reig OA, Massarini AL, Ortells MO, Barros MA, Tiranti SI e Dyzenchauz FJ (1992) New karyotypes and C-banding of subterranean rodents of the genus *Ctenomys* (Caviomorpha, Octodontidae) from Argentina. *Mammalia* **56**: 603-623.
- Rice WR (1987) The accumulation of sexually antagonistic genes as selective agent promoting the evolution of reduced recombination between primitive sex chromosomes. *Evolution Int. J. Org. Evolution* **41**: 911-914.
- Riddle BR, Hafner DJ e Alexander LF (2000) Phylogeography and Systematics of the *Peromyscus eremicus* Species Group and Historical Biogeography of North American Warm Regional Deserts. *Molecular Phylogenetics and Evolution.* **17**(2): 145-160.
- Robbins LW e Baker RJ (1981) An assessment of the nature of chromosomal rearrangements in 18 species of *Peromyscus* (Rodentia: Cricetidae). *Cytogenet Cell Genet.* **31**(4):194-202.

- Robinson M, Catzeflis F, Briolay J e Mouchiroud D (1997) Molecular phylogeny of rodents, with special emphasis on murids: Evidence from nuclear gene LCAT. *Mol. Phylogenet. Evol.* **8**: 423-434.
- Romanenko SA, Volobouev VT, Perelman PL, Lebedev VS, Serdukova NA, Trifonov VA, Biltueva LS, Nie W, O'Brien PCM, Bulatova NS, Ferguson-Smith MA, Yang F e Graphodatsky AS (2007) Karyotype evolution and phylogenetic relationships of hamsters (Cricetidae, Muroidea, Rodentia) inferred from chromosomal painting and banding comparison. *Chromosome Research* **15**: 283-297.
- Rossi F, Moschetti R, Caizzi R, Corradini N e Dimitri P (2007) Cytogenetic and Molecular Characterization of Heterochromatin Gene Models in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **175**: 595–607.
- Rubtsov NB, Rubtsova NV, Anopriyenko OV, Karamysheva TV, Shevchenko AI, Mazurok NA, Nesterova TB e Zakian SM (2002) Reorganization of the X chromosome in voles of the genus *Microtus*. *Cytogenet Genome Res.* **99**: 323-329.
- Ruiz-Herrera A, Castresana J e Robinson TJ (2006) Is mammalian chromosomal evolution driven by regions of genome fragility? *Genome Biology* **7**: R115
- Sambrook J, Fritsch EF e Maniatis T (1989) Molecular Cloning: a Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor*, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schwarzacher T e Heslop – Harrison JS (2000) Practical “*in situ*” Hybridization. *BIOS*, Oxford. 203 pp.
- Shevchenko A, Zakharova IS, Elisaphenko EA, Kolesnikov NN, Whitehead S, Bird C, Ross M, Weidman JR, Jirtle RL, Karamysheva TV, Rubtsov NB, Vandeberg JL, Mazurok NA, Nesterova TB, Brockdorff N e Zakian SM (2007) Genes Flanking Xist in mouse and human are separated on the X chromosome in American marsupials. *Chromosome Research* **15**: 127 – 136.
- Schluter D, Price T, Mooers A e Ludwig D (1997) Likelihood of ancestor states in adaptive radiation. *Evolution* **51**: 1699-1711.
- Singer MF (1982) Highly repeated sequences in mammalian genomes. *Int Rev Cytol* **76**:67-112.
- Singleton GR, Hinds LA, Krebs CJ e Spratt DM (2003) Rats, mice and people: rodent biology and management. ACIAR Monograph No. 96, 564p.
- Slamovits CH e Rossi MS (2002) Satellite DNA: Agent of Chromosomal Evolution in Mammals. A review. *Mastozoologia Neotropical / J. Neotrop. Mammal* **9(2)**: 297-308.

- Slamovits CH, Cook JA, Lessa EP e Rossi MS (2001) Recurrent bamplifications and deletions of satellite DNA accompanied chromosomal diversification in South American tucos-tucos (genus *Ctenomys*, Rodentia: Octodontidae): a phylogenetic approach: *Mol Biol Evol* **18**: 1708-1719.
- Smith GP (1976) Evolution of repeated DNA sequences by unequal crossover. *Science* **191**: 528-535.
- Soullier S, Hanni C, Catzefflis F, Berta P e Laudet V (1998) Male sex determination in the spiny rat *Tokudaia osimensis* (Rodentia: Muridae) is not Sry dependent. *Mammal Genome* **9**: 590-592.
- Steinemann S e Steinemann M (2005) Retroelements: tools for sex chromosome evolution. *Cytogenet Genome Res* **110**: 134-143.
- Steppan SJ, Adkins RM e Anderson J (2004) Phylogeny and Divergence-Date Estimates of Rapid Radiations in Muroid Rodents Based on Multiple Nuclear Genes. *Syst. Biol.* **53**(4): 533-553.
- Steppan SJ, Adkins RM, Spinks PQ e Hale C (2005) Multigene phylogeny of the World mice, Murinae, reveals distinct geographic lineages and the declining utility of mitochondrial genes compared to nuclear genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **37**: 370-388.
- Strachan T e Read AP (2004) *Human Molecular Genetics* 3. Garland Science, 3ª Edição, London. p. 352 - 392.
- Sumner AT (2003) Chromosomes Organization and Function. *Blackwell Publishing Company*. United Kingdom. pp 287.
- Sumner AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell Res.* **75**: 304-306.
- Summer AT, Evans HJ e Buckland RA (1971) New technique for distinguishing between human chromosomes. *Nature* **232**:31-32.
- Sutou S, Mitsui Y e Tsuchiya K (2001) Sex determination without the Y chromosome in two Japanese rodents *Tokudaia osimensis osimensis* and *Tokudaia osimensis* spp. *Mammal Genome* **12**: 17-21.
- Svetlana AR, Volobouev VT, Perelman PL, Lebedev VS, Serdukova NA, Trifonov VA, Biltueva LS, Nie W, O'Brien PCM, Bulatova NS, Ferguson-Smith MA, Yang F e Graphodatsky AS (2007) Karyotype evolution and phylogenetic relationships of hamsters (Cricetidae, Muroidea, Rodentia) inferred from chromosomal painting and banding comparison. *Chromosome Research* **15**:283-297.

- Svetlana AR, Perelman PL, Serdukova NA, Trifonov VA, Biltueva LS, Wang J, Li T, Nie W, O'Brien PCM, Volobouev VT, Stanyon R, Ferguson-Smith MA, Yang F e Graphodatsky AS (2006) Reciprocal chromosome painting between three laboratory rodent Species. *Mammalian Genome* **17**: 1183-1192.
- Telenius H, Palmear AH, Tunnacliffe A, Carter NP, Behmel A, Ferguson-Smith MA, Nordenskjold M, Pfragner R e Ponder BAJ (1992) Cytogenetic analysis by chromosome painting using DOP-PCR amplified flow-sorted chromosomes. *Genes chrom Cancer* **4**: 257-263.
- Toder R, Wienberg J, Voullaire L, O'Brien PCM e Maccarone P (1997) Shared DNA sequences between the X and Y chromosomes in the tammar wallaby – evidence for independent additions to eutheria and marsupial sex chromosomes. *Chromosma* **106**: 94-98.
- Van Den Bussche RA, Honeycutt RL e Baker RJ (1993) Restriction endonuclease digestion patterns of harvest mice (Reithrodontomys) chromosomes: a comparison to G-bands, C-bandas, and in situ hybridization. *Genetica* **87**:141-9.
- Varley JM, Macgregor HC, Nardi I, Andrews C e Erba HP (1980) Cytological evidence of transcription of highly repeated DNA sequences during the lampbrush stage in *Triturus cristatus carnifex*. *Chromosoma* **80**: 289-307.
- Vassart M, Seguela A e Hayes H (1995) Chromosomal evolution in gazelles. *J Hered* **86**: 158-167.
- Verma RS e Babu A (1995) Human chromosomes – Principles and Tecniques. 2ª edição. *McGraw-Hills Book Company*, New York.
- Verneau O, Catzeflis F e Furano AV (1998) Determining and dating recent rodent speciation events by using L1 (LINE-1) retrotransposons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**:11284-11289.
- Veyrunes F, Catalan J e Sicard B (2004) Autosome and sex chromosome diversity among the African pygmy mice, subgenus *Nannomys* (*Murinae*; *Mus*). *Chromosome Res* **12**: 369-382.
- Veyrunes F, Watson J, Robinson TJ e Britton-Davidian J (2007) Accumulation of rare sex chromosome rearrangements in the in the African pygmy mouse, *Mus* (*Nannomys*) *minutoides*: a whole-arm reciprocal translocation (WART) involving an X-autosome fusion. *Chromosome Research* **15**: 223-230.
- Viegas-Pequignot E, Benazzou T, Dutrillaux B e Petter F (1982) Complex evolution of sex chromosomes in Gerbillidae (Rodentia). *Cytogenet Cell Genet* **34**: 158-167.

- Vistorin G, Gamperl R e Rosencranz W (1976) Analysis of mitotic and meiotic chromosomes of the European hamster *Cricetus cricetus* (L.). *Z. Saugetierk.* **41**: 342-348.
- Vogel W, Jainta S e Rau W (1998) Sex determination in *Ellobius lutescens*: the story of na enigma. *Cytogenet Cell Genet* **80**: 214-221.
- Wahrman J, Richler C, Neufeld E e Friedmann A (1983) The origin of multiple sex chromosomes in the gerbil *Gerbillus gerbillus* (Rodentia: Gerbillinae). *Cytogenet Cell Genet.* **35 (3)**:161-80.
- Walsh JB (1987) Persistence of tandem arrays: implications for satellite and simple-sequence DNAs. *Genetics* **115**: 553-567.
- Waters PD, Dobigny G, Pardini AT e Robinson TJ (2004) LINE-1 distribution in Afrotheria and Xenarthra: implications for understanding the evolution of LINE-1 in eutherian genomes. *Chromosoma* **113**: 137–144.
- Waters PD, Dobigny G, Waddell PJ e Robinson TJ (2007) Evolutionary History of LINE-1 in the Major Clades of Placental Mammals. *PLoS ONE* **2(1)**: 1-7.
- Watson JM, Spencer JA, Riggs AD e Graves JAM (1991) Sex chromosome evolution: Platypus gene mapping suggests that part of the human X chromosome Was originally autosomal. *Proc. Natl. Acad. Sci* Vol.88: 11256-11260.
- Wienberg J, Fröncke L e Stanyon R (2000) Insights into mammalian genome organization and evolution by molecular Cytogenetics. *In: Comparative Genomics* Melody Clark ed. *Kluwer Academic Publishers*, United States of América.
- Wienberg J, Stanyon R, Nash WG, O'Brien PCM, Yang F, O'Brien S J e Ferguson-Smith M A (1997) Conservation of human vs. feline genome organization revealed by reciprocal chromosome painting. *Cytogenet Cell Genet* **77**: 211-217.
- Woodburne MO, Rich TH e Springer MS (2003) The evolution of tribospheny and the antiquity of mammalian clades. *Mol Phylogenet Evol* **28**: 360-385.
- Yang F, O'Brien PCM, Wienberg J e Ferguson-Smith MA (1997) A reappraisal of the tandem fusion theory of karyotype evolution in the Indian muntjac using chromosome painting. *Chromosome Research* **5**: 109-117.
- Yang F, O'Brien PCM e Ferguson-Smith MA (2000) Comparative chromosome map of the laboratory mouse and Chinese hamster defined by reciprocal chromosome painting. *Chromosome research* **8**: 219-227.

Yunis JJ e Yasmineh WG (1971) Heterochromatin, satellite DNA, and cell function. Structural DNA of eucaryotes may support and protect genes and aid in speciation. *Science* **174**: 1200-1209.

Zhimulev IF e Belyaeva ES (2003) Heterochromatin Position Effect, and Genetics Silencing. *Russian Journal of Genetics*. **39(2)**: 133-146.

ENDEREÇOS ELETRÔNICOS

<http://www.ensembl.org/Multi/blastview> (“Ensembl Multi Blast View”)

<http://www.ensembl.org/Mus-musculus/contigview> (“Ensembl Mouse ContigView”)

http://www.ensembl.org/Mus_musculus/syntenicview (“Ensembl SyntenicView”)

<http://www.ncbi.nlm.gov/Blast/> [“NCBI BLAST Basic Local Alignment Search Tool NCBI” (“NCBI blast”)]

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez> (“NCBI Genome”, “NCBI Nucleotide” e “NCBI Taxonomy”)

<http://www.tolweb.org/tree/> (“Tree of Life Web Project”)