

## MAPEAMENTO CROMOSSÔMICO DO ELEMENTO REPETITIVO MAZE/L1-LIKE EM ESPÉCIES DE MORCEGOS DA FAMÍLIA MOLOSSIDAE.

Gustavo Cavalcanti Vieira de Melo<sup>1</sup>; Neide Santos<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Estudante do Curso de ciências biológicas licenciatura-CCB– UFPE; E-mail: gustavo-melo@hotmail.com.br , <sup>2</sup>Docente/pesquisador do Departamento de Genética – CCB –UFPE. E-mail: santos\_neide@yahoo.com.br .

**Sumário:** A identificação e caracterização de elementos transponíveis têm sido muito importantes para o estudo genômico, uma vez que esses desempenham um papel estrutural e organizacional nos cromossomos. Com isso o trabalho teve como objetivo realizar o mapeamento físico cromossômico do retrotransposon MAZE/L1-Like nas espécies *Molossus molossus* e *Molossus rufus*, além de investigar se há associação entre essa sequência com a região de heterocromatina constitutiva (HC). Em seis coletas foram capturados 22 indivíduos da espécie *M.s molossus*. As preparações cromossômicas foram obtidas através de células da medula óssea, em seguida foram realizadas a análise convencional e o bandeamento C. Para a extração de DNA foi utilizado fragmentos de tecidos, e a técnica de PCR foi realizada para amplificação da sequência MAZE/L1-like e do fragmento ITS2. O bandeamento C em *M. molossus* revelou blocos HC na região pericentromérica de todos os cromossomos e o cromossomo Y foi quase totalmente heterocromático. Com o objetivo de mapear a sequência MAZE/L1-like nos cromossomos de *M. molossus* diversas tentativas foram feitas para a amplificação da sequência sem nenhum sucesso.

**Palavras-chave:** heterocromatina constitutiva; ITS2; Molossidae; *Molossus molossus*.

### INTRODUÇÃO

A ordem Chiroptera é composta pelos morcegos com cerca de 1150 espécies, que estão agrupadas nas subordens Yinpterochiroptera representada por seis famílias e Yangochiroptera representada por 14 famílias na qual nove delas ocorrem no Brasil: Emballonuridae, Furipteridae, Molossidae, Mormoopidae, Natalidae, Noctilionidae, Phyllostomidae, Thyropteridae, e Vespertilionida. No Brasil, a família Molossidae é representada por 7 gêneros e 26 espécies distribuídas por todo o território nacional (Fabian e Gregorin, 2007). Estes morcegos são caracterizados pela cauda livre que se projeta além da membrana interfemural e por glândulas odoríferas que provocam forte odor em suas colônias (Perachi et al., 2011). Análise citogenética convencional realizada por Warner et al. (1974) em 21 espécies da família Molossidae revelou números diploides com variação de  $2n=34$  (*Molossops greenhalli*, *M. abrasus*) a  $2n=48$  em 17 espécies dos gêneros *Tadarida*, *Eumops*, *Promops*, *Molossus*, *Otomops* e *Platymops* e números fundamentais (NF) variando de 54 a 64. Espécimes de *Eumops glaucinus* provenientes do México, Honduras e Costa Rica apresentaram um complemento cromossômico de  $2n=38$ , enquanto indivíduos provenientes da Colômbia apresentaram  $2n=40$ , representando a única variação cromossômica geográfica entre as espécies estudadas. A ampla variação de quantidade de DNA nos genomas animais tem sido atribuída a diferentes quantidades de DNAs repetitivos nos diversos genomas. As sequências repetitivas de DNA compreendem uma grande porção do genoma na maioria dos organismos, sendo classificados como codificantes e não-codificantes.

Os elementos transponíveis são divididos em dois grupos, os transposons e retrotransposons de acordo com o seu mecanismo de transposição. A identificação e caracterização dos elementos transponíveis têm sido muito importantes para o estudo genômico, uma vez que esses desempenham um papel estrutural e organizacional nos cromossomos, podendo induzir a formação de rearranjos cromossômicos ou atuando na prevenção de perdas teloméricas (Charlesworth et al., 2001). Cerca de 40% do genoma humano, 50% do genoma dos primatas, 40% do genoma de rato e camundongo e 34% do genoma de cachorro são constituídos por esses elementos (Böhne et al., 2008).

## MATERIAIS E MÉTODOS

Um total de seis coletas foram realizadas na Reserva Biológica de Saltinho (Rio Formoso, PE), onde foram capturados 22 indivíduos da espécie *Molossus molossus*, sendo 12 machos e 10 fêmeas, contudo não foi coletado indivíduos da espécie *Molossus rufus*. Após a coleta, alguns indivíduos foram pré-tratados com uma injeção subcutânea de fermento glicosado, para estimulação mitótica, durante 12 horas. Em seguida foi aplicado colchicina (inibidor mitótico) e após 45 minutos os indivíduos foram sacrificados para a retirada dos úmeros, para obtenção cromossômica a partir de células da medula óssea. O bandeamento C foi realizado segundo Sumner (1972). As lâminas foram pré-tratadas com uma solução de ácido clorídrico (HCl) por 30 minutos em temperatura ambiente, em seguida foram lavadas com H<sub>2</sub>O destilada e imersas numa solução básica de hidróxido de bário (BaOH) a 60 °C por um período de 30 a 45 segundos, em seguida lavadas com H<sub>2</sub>O destilada e imersas numa solução de 2 x SSC a 60 °C por 20 minutos. Posteriormente, as lâminas foram coradas com Giemsa a 5 % por 10 minutos. Para a extração de DNA foi utilizado fragmentos de tecidos (coração, fígado, asas) de diferentes indivíduos. A extração seguiu o protocolo padrão que consiste em submeter os tecidos a uma solução de extração (tampão de lise, proteinase K e SDS) aquecida e posterior purificação do extrato com etanol. O DNA foi mantido em suspensão em TE a -20 °C até ser utilizado na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Com a técnica de PCR foram realizadas várias tentativas de amplificar a sequência MAZE/L1-like. O volume final da reação foi de 25 µL contendo Green Master Mix /12,5µL, Nuclease free water /9,5 µL, DNA /1 µL e primers MAZE L1 LIKE /1 µL cada. A temperatura de anelamento foi testada em gradiente com variações entre 50° a 60° e 55° a 65°. A reação de amplificação para MAZE/L1-like teve como condições: desnaturação inicial a 94°C / 5 minutos seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94°C /30 segundos, anelamento a 59,9°C /40 segundos, extensão a 72°C / 1 minuto e extensão final a 72°C /5 minutos. Ocorrendo variação da temperatura de anelamento em gradiente, com temperaturas variando entre 50°C a 60°C e 55°C a 65°C. Os produtos da PCR obtidos foram analisados em gel de agarose a 1%. Considerando uma alternativa a análise do elemento MAZE/L1-like testamos a amplificação do fragmento ITS2 (espaçador transcrito interno 2 do gene DNAr 45S) como forma de analisar a estrutura desta região e possíveis variações individuais e populacionais dessa sequência. As condições da reação para amplificação da região de ITS2 foram desnaturação a 94°C / 5 minutos, 35 ciclos com desnaturação a 94°C /30 segundos, anelamento a 60°C /1 minuto, extensão de 72°C /2 minuto/ e extensão final a 72°C /7 minutos. Foi utilizado reagentes como Green Master Mix /12,5 µL, Nuclease free water /9,5 µL, DNA extraído /1 µ e os primers ITS2 R /1 µL e ITS2 F /1 µL. O produto da PCR foi purificado e enviado para sequenciamento.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O cariótipo de *M. molossus* compreende número diplóide de 48 cromossomos ( $2n=48$ ) e número fundamental igual a 64 ( $NF=64$ ), com sistema sexual simples do tipo XX nas fêmeas e XY nos machos. O cariotipo se caracteriza por possuir o par 1 submetacêntrico grande, oito pares de cromossomos meta-submetacêntricos (2-9), 14 pares de cromossomos acrocêntricos (10-23), o cromossomo X é submetacêntrico e o cromossomo Y é um pequeno subteloicêntrico (Figura 1). A família Molossidae tem sido caracterizada por possuir cariótipos com número diplóide variando de  $2n=34$  a 48 e número fundamental variando de  $NF=54$  a 64 (Warner et al., 1974; Morielle-Versute et al., 1996; Leite-Silva et al., 2003). O bandeamento C em *M. molossus* revelou blocos de HC na região pericentromérica de todos os cromossomos e o cromossomo Y foi quase totalmente heterocromático (Figura 1). A localização preferencial da HC na região pericentromérica em morcegos tem sido descrito para várias espécies da família Phyllostomidae (Santos e Souza, 1998; Barros et al., 2009; Lemos Pinto et al. 2012; Calixto et al., 2013) e da família Molossidae (Morielle-Versute et al., 1996; Leite-Silva et al., 2003). Contudo, variação na localização de HC foi observado na espécie *Molossops planirostris*, também da família Molossidae, que apresentou apenas pequenos blocos de HC na região pericentromérica dos pares 4, 5 e 8, os cromossomos 15 e 16 foram quase totalmente heterocromáticos, o cromossomo X apresentou HC no braço curto e ausência de HC foi observado no cromossomo Y (Leite-Silva et al., 2003). Esse padrão de HC em *M. planirostris* foi considerado um padrão incomum para morcegos como também para mamíferos.



Figura1. Metáfase mitótica de *M. molossus* com bandeamento C.

Com o objetivo de mapear a sequência MAZE/L1-like nos cromossomos de *M. molossus* diversas tentativas foram feitas para a amplificação da sequência sem nenhum sucesso. Para atingir o esperado foi utilizado DNA extraído da espécie *M. molossus* capturados durante as coletas, e da espécie *M.s rufus* DNA extraído de material antigo armazenado no laboratório, como descrito em metodologia. Contudo, esse objetivo não foi alcançado, mesmo usando como controle espécies que haviam sido investigadas anteriormente.

Em seguida decidimos investigar a região ITS2 que tem um papel importante no processamento do DNAr. Com o DNA extraído das mesmas espécies foi feito a técnica de PCR utilizando *primers* para a região de ITS2 na qual também não obtivemos sucesso. Um teste realizado com indivíduo anteriormente estudado confirmou a

eficiência do *primer*, com isso a espécie de estudo foi modificada para *Carollia perspicillata*. Utilizando a nova espécie obteve-se resultados em ITS2 amplificando uma sequência que contem em torno de 150 pb. Com suspeitas deste resultado ser dímeros de *primers* foi feito uma nova PCR sem o DNA confirmando que o resultado não era dímero e sim a sequência amplificada. Com esse resultado foi realizado uma técnica de purificação do material para poder ser sequenciado, porém com diversas tentativas não foi possível obter o sequenciamento do material.

### CONCLUSÕES

Mediante os fatos expostos o cariótipo de *M. molossus* condiz com o que foi descrito na família Molossidae, além de sua região de heterocromatina constitutiva ser pericentromérica, local de preferência para representantes das famílias Molossidae e Phyllostomidae. Não foi possível mapear a sequência MAZE/L1-like nos cromossomos de *M. molossus* e também não foi possível analisar a espécie *M. rufus* porque nas coletas realizadas não houve captura da espécie.

### AGRADECIMENTOS

A Profa Vilma Loreto pela orientação no trabalho. Ao PIBIC/CNPq/UFPE pelo apoio financeiro. A profa Merilane Calixto e ao MSc Izaquiel Andrade pela ajuda na identificação das espécies e ensinamento das técnicas.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barros HMDR, Sotero-Caio CG, Santos N, Souza MJ. (2009) Comparative cytogenetic analysis between *Lonchorhina aurita* and *Trachops cirrhosus* (Chiroptera: Phyllostomidae). *Genetics and Molecular Biology* 32: 748–752.
- Calixto MS, Andrade IS, Cabral-de-Mello DC, Santos N, Martins C, Loreto V, Souza MJ. (2013) Patterns of rDNA and telomeric sequences diversification: contribution to repetitive DNA organization in Phyllostomidae bats. *Genetica*,
- Leite-Silva C, Santos N, Fagundes V, Yonenaga-Yassuda Y, Souza MJ. (2003). Karyotypic characterization of the bat species *Molossus ater*, *M. molossus* and *Molossops planirostris* (Chiroptera, Molossidae) using FISH and banding techniques. *Hereditas* 138: 94-100.
- Lemos Pinto MMP, Calixto MS, Souza MJ, Araújo APT, Langguth A, Santos N. (2012) Cytotaxonomy of the subgenus *Artibeus* (Phyllostomidae, Chiroptera) by characterization of species-specific markers. *Comp Cytogen* 6: 17–28.
- Morielle-Versute E, Varella-Garcia M, Taddei VA. (1996). Karyotypic patterns of seven species of molossid bats (Molossidae, Chiroptera). *Cytogenet. Cell Genet.* 72: 26–33.
- Santos N, Souza MJ. (1998) Use of fluorochromes chromomycin A3 and DAPI to study constitutive heterochromatin and NORs in four species of bats (Phyllostomidae). *Caryologia* 51: 265–278.
- Sumner AT. (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research* 75: 304–306.
- Warner JW, Patton JL, Gardner AL, Baker RJ. (1974) Karyotypic analysis of twenty-one species of molossid bats (Molossidae: Chiroptera). *Can. J. Genet. Cytol.* 16: 165-176.