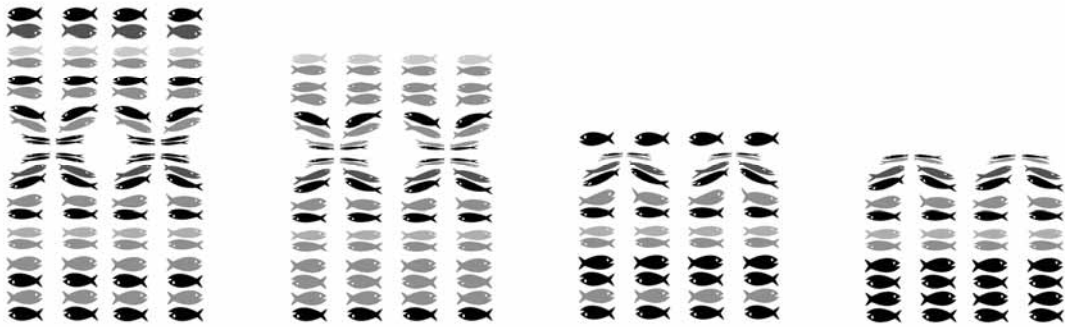


UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**BANDAMENTO EM CROMOSSOMOS DE PEIXES: DISCUSSÃO SOBRE O
CONCEITO DE COMPARTIMENTALIZAÇÃO CROMOSSÔMICA**

LUIZ RICARDO DE SOUZA PAIVA



Botucatu

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**BANDAMENTO EM CROMOSSOMOS DE PEIXES: DISCUSSÃO SOBRE O
CONCEITO DE COMPARTIMENTALIZAÇÃO CROMOSSÔMICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia) do Instituto de Biotecnologia de Botucatu, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor.

Luiz Ricardo de Souza Paiva

Orientador: Prof. Dr. Fausto Foresti

Co-orientadora: Profa. Dra. Marta Svartmanm

Tese de doutorado

Paiva, Luiz Ricardo de Souza

Bandamento em Cromossomos de Peixes: Discussão Sobre o Conceito de
Compartimentalização Cromossômica

Tese (doutorado) - Instituto de Biociências - Universidade Estadual Paulista
Júlio de Mesquita Filho

Orientador: Fausto Foresti

Capes: 20204000

1. Citogética de Peixes - Peixes Neotropicais - Cromossomos

Palavras-chave: Bandamento G , isocores, compartimentalização cromossômica

*Aos meus pais, meus irmãos e a Bheatriz
(minha afilhada), um agradecimento especial
por estarem presentes em minha vida, pela
força e apoio, nestes vários anos de dedicação
a minha formação.*

*A minha esposa Greicy Paiva que sem seus
conselhos, visão geral dos estudos
cromossômicos, paciência e abdição
de minha presença por vários
momentos, talvez eu não tivesse
conseguido.*

Obrigado pela dedicação e seu Amor.

A ignorância gera confiança com mais frequência do que o conhecimento: são aqueles que sabem pouco, e não aqueles que sabem muito, que tão positivamente afirmam que esse ou aquele problema jamais será resolvido pela ciência. - Charles Darwin.

Não me desencorajo, porque cada tentativa errada descartada é outro passo à frente. Thomas Edison

Agradecimentos

A minha família, trabalho e amigos.

Ao professor Fausto Foresti, pela orientação, pelo exemplo e pelo os momentos.

A professora Marta Svartmann pela orientação e auxílio no desenvolvimento, sugestões, correções deste trabalho.

Ao técnico Renato Devidé, por estar sempre disposto a ajudar nas coletas e emprestar seus conhecimentos práticos em preparações cromossômicas.

A todos os pesquisadores que de alguma forma em seus trabalhos me inspiraram e fortaleceram para continuar nesta caminhada.

Aos meus amigos Igor Paiva Ramos e José Carlos Pansonato Alves.

Ao amigo de laboratório Rodrigo Mezêncio Godinho por me ensinar a trabalhar com cultura celular.

Aos amigos de laboratório pelos auxílios em coletas, discussões a cerca de citogenética e momentos de maior descontração.

Aos funcionários do Departamento de Morfologia e da Seção de Pós-Graduação.

Ao Laboratório Hermes Pardini (Belo Horizonte – MG), pela oportunidade de integração citogenética humana e animal através de seus recursos humanos, e pela captura e análise dos cromossomos G bandados.

Resumo

O estudo da organização estrutural dos cromossomos é extremamente complexo e envolve a intrínseca relação entre as sequências de DNA e sua composição, proteínas histônicas e não histônicas, bem como processos extra-cromossomais. Em citogenética de peixes são utilizadas de forma sistemática técnicas clássicas (bandas C e NOR) e citomoleculares, com uso de sondas de DNAr. A análises para identificação de todos os cromossomos homólogos do complemento foi descrita para algumas espécies com a utilização da técnica de incorporação de análogos de base (BrdU) e alguns outros por bandas G. Porém, a aplicação desta metodologia não é realizada de modo rotineiro devido às dificuldades para obtenção do padrão de bandas de forma repetitiva. O padrão de bandas observado nos cromossomos é correlacionado à distribuição do conteúdo de sequências ricas em bases GC, identificados como isocores e reportado por alguns autores, de modo que quanto maior o conteúdo de bases G e C, maior a compartimentalização do genoma, enquanto o menor conteúdo destas bases seria determinante de menor grau de compartimentalização. O presente trabalho descreve a padronização de técnicas de obtenção cromossômica visando a aplicação de metodologias promotoras de bandamento cromossômico e a análise de um estudo de caso de obtenção de bandas G em Tilápia (*Oreochromis niloticus*).

Abstract

The study of the structural organization of chromosomes is extremely complex and involves the intrinsic relationship between sequences of DNA and its composition, histone and non-histone proteins as well as extra-chromosomal processes. Classical techniques as C-banding and Ag-NOR, and molecular techniques using fluorochromes and repetitive DNA probes are frequently used in fish cytogenetics. The technique of base analogues (BrdU) incorporation and G-bands has been used in the identification of all chromosomes of the complement in some species of this group of organisms. However, such techniques are not routinely performed due to difficulties in the obtention of good and repetitive banding patterns. The banding pattern of chromosomes is correlated to the distribution of GC-rich segments (isochores) reported by some authors, and higher content of GC-rich sites characterize a large degree of compartmentalization, while a less content in GC segments is identified as bas-degree of compartmentalization of the genome. This paper describes the standardization of techniques for the obtention of chromosome preparations looking for better conditions to the employment of G-banding technique in fish chromosomes and the analysis of a case study for the obtention of G-bands in tilapia (*Oreochromis niloticus*) chromosomes.

Sumário

Introdução Geral.....	1
Materiais e Métodos	5
Resultados	9
Capítulo 1	9
Melhoramento técnico em preparações citogenéticas diretas para peixes de água doce.....	9
Capítulo 2.....	10
Cultura celular de sangue periférico para obtenção de cromossomos metafásicos em peixes ósseos neotropicais e aplicação de bandamento G.....	10
Capítulo 3.....	10
Bandamento G em Cromossomos de Peixes.....	10
Capítulo 4.....	11
Caracterização Cromossômica de <i>Pterodoras granulosus</i> (Valenciennes, 1821), (Pisces, Siluriforme, Doradidae) e Bandamento G-11 Primeira Descrição Para Peixes	11
Capítulo 1 - Melhoramento técnico de preparações citogenéticas diretas de peixes de água doce.....	12
Introdução	13
Materiais e Métodos	16
Resultados e Discussão	19
Referências	24
Capítulo 2 - Cultura celular de sangue periférico para obtenção de cromossomos metafásicos de peixes ósseos neotropicais com aplicação de bandamento G.....	27
Introdução	28
Materiais e Métodos	30
Resultados	33
Discussão.....	37
Referências	40
Capítulo 3 - Bandamento G em Cromossomos de Peixes	43
Introdução	44
Materiais e Métodos	53
Resultados	54
Discussão.....	60
Referências	67

Capítulo 4 - Chromosomal heteromorphism characterization by G-11 and R-HSS bands in <i>Pterodoras granulosus</i> (Siluriformes) with discussion about the karyotypic evolution in Doradidae family.....	73
Introduction	75
Material and Methods.....	77
Results	78
Discussion	84
References	88
Considerações Finais.....	90
Referências Gerais	97

Introdução Geral

A ictiofauna Neotropical de água doce é uma das mais ricas e diversificadas do mundo, sendo que aproximadamente 24% da diversidade mundial de peixes é representada por peixes continentais da América do Sul (Vari e Malabarba, 1998). Desta revisão constam 71 famílias e 4.475 espécies de peixes neotropicais, com cerca de 2.587 espécies já descritas no Brasil (Buckup *et al*, 2007).

O uso das técnicas de bandamento cromossômico clássico em peixes é centralizado em algumas técnicas, apesar dos estudos citogenéticos no grupo terem tido um grande impulso a partir da década de 70, principalmente após a publicação do trabalho de Mcphail e Jones (1966), formulando a técnica de suspensão celular para obtenção de cromossomos mitóticos em peixes. Stewart e Levin (1968) descreveram que a aplicação da técnica proposta apresentava algumas desvantagens, com referência a visualização dos cromossomos (possível somente sob observação em contraste-de-fase) e à conservação do material, o qual deveria ser mantido em baixas temperaturas. Dessa forma propuseram que o material deveria ser fixado em etanol/ácido acético e corado com Giemsa. Kligerman e Bloom (1976) descreveram um método para obtenção de cromossomos mitóticos discordando dos autores anteriores e empregando pela primeira vez com eficiência a solução hipotônica (KCl), possibilitando maior dispersão dos cromossomos e, em consequência, obtendo definição mais precisa do cariótipo.

No Brasil, entre as décadas de 60 e 70, os estudos genéticos em peixes iniciaram-se com o pesquisador Silvio de Almeida Toledo Filho no Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (Foresti, 2008), que teve um papel fundamental na introdução e desenvolvimento dos estudos nesta área. Mais tarde, outros autores como Bertollo *et al*.

(1978) e Foresti *et al.* (1981; 1993) adaptaram e descreveram metodologias para obtenção de cromossomos mitóticos para este grupo de organismos, que foram incorporadas aos protocolos usados nos laboratórios de citogenética. Os bons resultados obtidos e a melhora na qualidade das preparações cromossômicas determinaram a crescente expansão nos estudos nesta área, sendo empregadas como rotina até o presente momento. Estes pesquisadores impulsionaram a realização de muitos trabalhos de citotaxonomia em peixes neotropicais (Foresti, 2008).

Vários autores relatam que são conhecidos os números diplóides e/ou haplóides em cerca de 706 espécies de peixes, distribuídas em 207 gêneros e 38 famílias, o que representa aproximadamente 22% das espécies da região Neotropical (Almeida-Toledo *et al.*, 2000; Nirchio e Oliveira *et al.*, 2006, 2007). Segundo Almeida-Toledo *et al.* (2000), a variabilidade em peixes neotropicais é extraordinária quanto ao número e fórmula cromossômica, sendo encontrados números diplóides de 20 cromossomos em *Pterolebias longipinnis* a 134 cromossomos em *Corydoras aeneus*, presença de cromossomos supranumerários. Dentro desta diversidade, pode ser constatada a ocorrência de grupos com pouca variação no número diplóide, sendo por isso denominados conservados, como os Parodontidae, Prochilodontidae, Chilodontidae, que possuem o número diplóide modal de 54 cromossomos, do mesmo modo que outros como os Characidae, que apresentam extensa variação de números diplóides e de fórmulas carioptípicas. Outras variações envolvem a ocorrência formas poliplóides ou derivadas de poliploidia (*Corydoras* cf. *simulatus*), híbridos naturais, misturando características cromossômicas (*Eigenmannia*) e polimorfismos de diferentes tipos, sendo o mais comum aqueles relacionados ao tamanho e número das regiões organizadoras de nucléolos nos cromossomos. Neste grupo animal, no qual a os estudos citogenéticos efetuados de forma estruturada no país tiveram início à cerca de apenas 40 anos (Foresti, 2008), são ainda

escassos os trabalhos com bandamentos cromossômicos que possibilitam caracterizar de forma inequívoca os pares de cromossomos homólogos (Bertollo *et al.*, 1997; Maistro *et al.*, 1999; Maistro *et al.*, 2000; Almeida-Toledo *et al.*, 2000; Vicente *et al.*, 2003 e Carvalho e Dias, 2005), ao contrário do que ocorre para a maioria dos grupos de vertebrados, principalmente mamíferos e aves, onde diferentes técnicas como bandamentos G, R, Q, T e RE têm sido aplicadas (Verma e Babu, 1995).

A incorporação de BrdU nos cromossomos de duas espécies de *Astyanax* realizada por Daniel-Silva e Almeida-Toledo (2005), possibilitou o estabelecimento de um marco divisório na citogenética de peixes, permitindo a avaliação das relações cromossômicas entre espécies, a partir da aplicação desta metodologia de bandamento. Outros trabalhos com a utilização de incorporação por análogos de base em vertebrados de sangue frio reportam a aplicabilidade desta técnica, que permite um padrão de banda mais resolutivo quando comparado, por exemplo, à clássica banda C (Venere *et al.*, 1995, Luo, 1998, Maistro *et al.*, 1999, Maistro *et al.*, 2000, Silva *et al.*, 2006; Salvadori *et al.*, 2003; Daniel-Silva e Almeida-Toledo, 2005; Fugiwara *et al.*, 2007; Portela-Castro *et al.*, 2008, Kasahara, 2009).

Além de bandamento por incorporação de análogo de base há também o bandamento por digestão enzimática, técnica conhecida por banda G descrita por Seabright (1972). Esta técnica determinou expressivas modificações e avanços na citogenética, sendo responsável pelo desenvolvimento dos estudos citoevolutivos em vertebrados de sangue quente, bem como o entendimento de aberrações cromossômicas identificadas nos cromossomos humanos. Para os vertebrados de sangue frio, grupo no qual estão incluídos os peixes, a técnica de banda G por digestão enzimática foi pouco utilizada (Gold *et al.*, 1990; Bertollo e Mestriner, 1998; Bertollo *et al.*, 1997; Medrano *et al.*, 1998, Maistro *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2004; Zhuang *et al.*, 2006; Swarça *et al.*, 2006; Portela-Castro *et al.*,

2008). Justificando esta lacuna de informações relacionadas à aplicação desta técnica, Medrano et al (1998) apontam que, pelo fato do bandamento G ser dependente da existência de segmentos cromossômicos de conteúdo rico em bases GC e também da dispersão destas sequências, genomas menos compartimentalizados (GC pobres) como os de vertebrados de sangue frio não possibilitariam bandamento mais resolutivo, diferentemente de vertebrados de sangue quente, que apresentaria seriam ricos em sequências contendo estas bases. Esta hipótese foi sustentada mais fortemente com o trabalho de Bernadi (2005), que relaciona o conteúdo de bases G e C no genoma. Assim, em vertebrados ectotérmicos de mesma ordem, porém presentes em regiões com diferentes temperaturas, diferentes composições de conteúdo GC foram constatadas. Esta hipótese foi chamada então de “hipótese da estabilidade termodinâmica”.

O presente trabalho traz como proposta a discussão sobre a organização cromossômica em peixes Neotropicais, com a aplicação dos protocolos de bandamento G em diferentes espécies, com cariótipos distintos em forma e tamanho. Para tal, foram recuperados protocolos de técnicas de obtenção de preparações cromossômica que pudessem auxiliar na obtenção de melhores células metafásicas para a aplicação da técnica de bandamento. De modo direcionado, foi realizado um estudo de caso utilizando preparações obtidas de machos de tilápia (*Oreochromis niloticus* – linhagem chitralada) utilizando o bandamento G para avaliação de um heteromorfismo cromossômico no par 1, com implicações na discussão do estabelecimento de heteromorfismo dos cromossomos sexuais do tipo XY.

Materiais e Métodos

Na realização das preparações cromossômicas visando a aplicação dos protocolos de bandamento cromossômico, foram utilizados exemplares de 28 espécies de peixes pertencentes a seis diferentes ordens, sendo elas *Astyanax altiparane*, *A. bockmani*, *A. fasciatus*, *A. paranae*, *Characidium gomesi*, *C. zebra*, *Hoplias malabaricus*, *Piaractus mesopotamicus*, *Serrapinnus notomelas*, *Rhamdia* sp, *Pimelodela* sp, *Cetorpsorhamdia* sp, *Imparfinis* sp, *Hypostomus* sp, *Gymnotus carapo*, *G. sylvius*, *G. inaequilabeatus*, *G. pantherhinus*, *Eigeinmania virescens*, *Eigeimamnia* sp, *Brachyopomus caudimaculatus*, *Crenicichla* sp, *Tilapia rendalli*, *Oreochromis niloticus*, *Cichlasoma* sp, *Synbranchus marmoratus*, *Rivulus* sp e *Poecilia* sp.

Na análise citogenética convencional realizada por métodos diretos e indiretos, foram utilizados procedimentos de estimulação da taxa de mitoses conforme proposto por Oliveira et al, 1988. O protocolo utilizado consiste em preparar uma solução de fermento biológico, diluindo 0,5 g de fermento e 0,5 g de açúcar em 15 ml de água destilada; incubar a solução em uma estufa (37°C) por cerca de 10 minutos e proceder à injeção de alíquota na região dorso-lateral dos exemplares, na proporção de 1 ml por 100 g de peso do animal, que é, então, mantido em aquário em condições normais por cerca de 48 horas.

A técnica utilizada para obtenção direta de cromossomos metafásicos seguiu as descrições propostas por Bertollo et al, 1979 e Foresti et al. (1981). Essa metodologia envolve basicamente a inibição da polimerização dos microtúbulos pela colchicina, a hipotonização das células em suspensão e a fixação celular pela mistura de metanol/ácido acético. Consiste em injetar na região intra-abdominal dos animais, solução aquosa de colchicina (0,01%) 1 ml / 100 g de peso do animal, que deve ser mantido em aquário

aerado por um período de 30 minutos. Para iniciar o procedimento de coleta de tecidos, os exemplares foram anestesiados em solução de benzocaína (metilmetanosulfonato) 0,01 % (Gontijo et al, 2003) até a cessação de movimentos operculares. Após a dissecação, fragmentos de tecido da porção anterior do rim são transferidos para uma placa de Petri contendo 6 ml de solução hipotônica de KCl (0,075M) e dissociados com o auxílio de pinças de dissecação até a obtenção de uma solução homogênea. Transferir a suspensão obtida para um tubo de centrífuga de fundo cônico e manter em estufa a 37°C por 21 min. Para fixação das células, adicionar 10 gotas de fixador (metanol e ácido acético/ 3:1) mantido à temperatura ambiente e homogeneizar com pipeta Pasteur. Deixar descansar por 5 minutos e em seguida completar com fixador para o volume de 15ml, homogeneizar novamente e centrifugar por 10 min a 900 rpm. Descartar o sobrenadante, ressuspender o precipitado em 10 ml de fixador, centrifugar novamente por 10 minutos a 900 rpm, descartar o sobrenadante e ressuspender em 1ml de fixador, para obtenção da suspensão final. Proceder ao preparo das lâminas.

Para a obtenção de preparações cromossômicas pelo método indireto, foram utilizados os procedimentos propostos por Foresti et al (1993) e Noletto et al (2007), que consistem em anestésiar os exemplares em solução de benzocaína (metilmetanosulfonato) 0,01 % (Gontijo et al, 2003) até a cessação de movimentos operculares, dissecar o animal e transferir os fragmentos de tecidos da porção anterior do rim para uma placa de Petri contendo 10 ml de meio de cultura (RPMI 1640 ou 199 Earle). Adicionar 40µl de solução de colchicina 0,01%, dissociar o tecido e homogeneizar a solução com auxílio de pinças e seringa de vidro de 10ml, transferir para um tubo de centrífuga de fundo cônico de 15ml. Manter em estufa a 37°C por 35 minutos, centrifugar a 900rpm por 10 minutos, descartar o sobrenadante e adicionar 10ml de solução KCl (0,075M) e manter em estufa a 37°C por 21 minutos. Para fixação adicionar 10 gotas de fixador (metanol e ácido acético/ 3:1) mantido

à temperatura ambiente e homogeneizar com pipeta Pasteur. Deixar descansar por 5 minutos e, em seguida completar com fixador para o volume de 15ml; homogeneizar novamente e centrifugar por 10 min a 900 rpm. Descartar o sobrenadante e ressuspender o precipitado em 10 ml de fixador, centrifugar novamente por 10 minutos a 900 rpm, descartar o sobrenadante e ressuspender em 1ml de fixador, para obtenção da suspensão final. Proceder ao preparo das lâminas.

A obtenção de cultura celular de linfócitos foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Fenocchio et al (1991) e Fugiwara et al, (2001). Nenhum exemplar foi sacrificado. Para proceder à coleta de sangue, os exemplares foram previamente anestesiados em benzocaína (metilmetanosulfato – MMS), segundo Gontijo et al. (2003). Foram utilizadas seringas heparinizadas (heparina sódica de 5000 U.I/ml – Blausiegel) de 5 ml (BD , Injex e SR) e agulhas 25X0,7 mm para punção cardíaca. O sangue coletado pode ser mantido refrigerado à temperatura de 4^oC a 8^oC por até três dias. Os meios de cultura utilizados continham 5ml de meio 199 Early com L-glutamina, 1ml de soro fetal bovino, 200µl de fitohemaglutinina e 20µl de antibiótico/antimicótico. Foram mantidos em estufa B.O.D. (Demanda Bioquímica de Oxigênio) por 96 horas a 27^oC. Após este período, adicionar 40µl de solução de colchicina 0,01% e homogeneizar a solução com auxílio de pipeta Pasteur, mantendo em estufa B.O.D. a 27^oC por 35 minutos. Em seguida, centrifugar a 900rpm por 10minutos, descartar o sobrenadante, adicionar 10ml de solução KCl (0,075M) e manter em estufa a 27^oC por 35 minutos. Para fixação, adicionar 10 gotas de fixador (metanol e ácido acético/ 3:1) mantido à temperatura ambiente e homogeneizar com uma Pasteur. Deixar descansar por 5 minutos e, em seguida completar com fixador para o volume de 15ml, homogeneizar novamente e centrifugar por 10 min a 900 rpm. Descartar o sobrenadante e ressuspender o precipitado em 10 ml de fixador, centrifugar

novamente por 10 minutos a 900 rpm, descartar o sobrenadante e ressuspender em 1ml de fixador. Proceder ao preparo das lâminas.

As preparações cromossômicas convencionais foram analisadas em fotomicroscópio óptico (Olympus BX61) e as melhores metáfases foram capturadas com software Image Pro Plus, 6.0 (MediaCybernetics). Para as correções de captura das imagens e montagem dos cariótipos foi utilizado o software BandView –Applied Spectral Imagim. Os cromossomos foram recortados usando o software Adobe Photoshop versão 11.0 - Adobe System e organizados em pares de homólogos, sendo classificados em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a), com base no trabalho de Nirchio e Oliveira (2006) e organizados em classes, em ordem decrescente de tamanho para a montagem dos cariótipos.

Resultados Gerais

O presente trabalho foi realizado visando a um melhor entendimento da composição e organização estrutural do material genômico em cromossomos de peixes ósseos neotropicais, com o desenvolvimento e aplicação de técnicas resolutivas para a obtenção de cromossomos mitóticos e de bandamento G.

O item Resultados foi organizado em cinco capítulos, redigidos na forma de manuscritos de trabalhos, contendo resumo, introdução atualizada referente ao assunto específico, materiais e métodos utilizados, relacionando possíveis modificações realizadas nas técnicas, resultados sumarizados e discussão abrangente, compreendendo o assunto abordado, propostas e análises, bem como a apresentação de hipóteses sobre o estudo, em peixes e demais vertebrados.

Capítulo 1 - Melhoramento técnico em preparações citogenéticas diretas para peixes de água doce

Apresenta como proposta associar conhecimentos já descritos na literatura para obtenção de cromossomos mitóticos, comparados aos protocolos utilizados no nosso laboratório, visando à melhoria das preparações citogenéticas. Um dos objetivos buscado foi o de possibilitar a utilização de menos exemplares nas análises e, ao mesmo tempo, procurando obter melhor qualidade nas preparações.

Capítulo 2 - Cultura celular de sangue periférico para obtenção de cromossomos metafásicos em peixes ósseos neotropicais e aplicação de bandamento G

Tem sido verificado que a obtenção de preparações cromossômicas para análises citogenéticas a partir de culturas de células tem resultado em boa quantidade de metáfases de boa qualidade, com os cromossomos geralmente distendidos e homogêneos. Dessa forma, o trabalho buscou identificar fatores envolvidos na obtenção de boas preparações cromossômicas por cultura celular de sangue periférico. O trabalho aborda também a utilização dos exemplares sem necessidade de seu sacrifício, uma vez que é possível a coleta do sangue por diferentes modos, seja por punção cardíaca ou da artéria caudal, de modo a minimizar os efeitos de manipulação dos exemplares. A obtenção de amostras utilizando tais critérios resultou em preparações adequadas à aplicação do bandamento G de forma repetitiva.

Capítulo 3 - Bandamento G em Cromossomos de Peixes

A obtenção de bandamento G em cromossomos de peixes é ainda constitui objeto de discussão, principalmente quanto à possibilidade efetiva de bandamento G em cromossomos de vertebrados de sangue-frio e se a reprodução dos resultados pode ser realizada de forma consistente. Neste sentido, foram aplicados protocolos de bandamento G em preparações cromossômicas de espécies de peixes Neotropicais pertencentes a quatro ordens, Characiformes, Siluriformes, Perciformes e Gymnotiformes, buscando resultados relacionados ao padrão das bandas e sua repetitividade com os tratamentos. Os resultados obtidos permitiram o reconhecimento específico dos cromossomos nos cariótipos, podendo ser aplicada também na identificação de rearranjos cromossômicos ocorridos.

Capítulo 5 - Caracterização Cromossômica de *Pterodoras granulosus* (Valenciennes, 1821), (Pisces, Siluriforme, Doradidae) e Bandamento G-11 Primeira Descrição Para Peixes

A aplicação das técnicas de bandamento cromossômico pode proporcionar uma visão mais realista da estrutura e composição destes compartimentos genômicos, facilitando a interpretação das suas particularidades cariotípicas e o entendimento dos processos evolutivos envolvidos nas modificações morfológicas e numéricas destes elementos, que ocorrem nos organismos. Com o objetivo de identificar precisamente as regiões heteromórficas aparentes existentes nos pares 14 e 16 de cromossomos de *Pterodoras granulosus*, foi utilizada a técnica de bandamento G-11, específica para identificação de regiões ricas em heterocromatina. Os resultados obtidos permitiram evidenciar as alterações nestes cromossomos.

Capítulo 1 - Melhoramento técnico de preparações citogenéticas diretas de peixes de água doce

Resumo

A obtenção de preparações cromossômicas numerosas e de boa qualidade são elementos essenciais nos trabalhos em citogenética, que devem possibilitar tanto a identificação morfológica e composição dos segmentos cromossômicos, como a aplicação de diferentes técnicas de bandamento, que permitam a identificação da sua estrutura e das alterações decorrentes de processos fisiológicos ou evolutivos. A proposição inicial das mudanças de metodologia para obtenção de grande número de células metafásicas, com boa individualização dos cromossomos em peixes teve inicialmente por base a utilização de suspensões celulares, embora ainda sem aplicação da hipotonização celular. Esta modificação metodológica foi acrescentada posteriormente, associada a processos de fixação adequada do material, proporcionando melhor qualidade para as metafases obtidas, constituindo a base da metodologia atualmente empregada.

A aplicação da técnica de obtenção de cromossomos mitóticos *in vivo* em peixes Neotropicais proporcionou o grande desenvolvimento da citogenética por possibilitarem a obtenção de metafases com formas cromossômicas preservadas e facilmente distinguíveis. Além disso, constantes modificações nos protocolos atuaram de modo a identificar material tissular adequado, a adequar a concentração do inibidor mitótico, a proceder adequada hipotonização das células e a fixar o material citogenético obtido. A dinâmica do processo investigativo nesta área levou também a utilizar células do tecido sanguíneo, proceder preparações *in vitro* de modo indireto, e até em condições de coleta de tecido “post mortem” utilizando meio RPMI 1640 ou solução salina balanceada de Hank's, como base para aplicação e manutenção da colchicina.

O presente trabalho teve como objetivo identificar as implementações ocorridas nos protocolos das técnicas utilizadas em citogenética desenvolvidas nos últimos 40 anos, principalmente relacionadas aos peixes, visando estabelecer uma relação da metodologia de obtenção de preparações cromossômicas com vistas à aplicação de técnicas de bandamentos mais resolutivos, como o bandamento G. Assim, o trabalho buscou relacionar informações sobre a qualidade dos cromossomos e à quantidade de células mitóticas disponíveis nas preparações.

Introdução

O uso das técnicas de bandamento cromossômico em cromossomos de peixes é ainda restrito e frequentemente não fornece resultados que permitem uma distinção efetiva de todos os cromossomos do cariótipo. Um grande salto de qualidade para o estudo cromossômico nos componentes deste grupo foi dado a partir da década de 60, principalmente após a publicação do trabalho de Mcphail e Jones (1966) que desenvolveram a técnica de suspensão celular para obtenção de cromossomos mitóticos em peixes. Stewart e Levin (1968) afirmaram que a aplicação da técnica proposta apresentava algumas desvantagens, como a difícil visualização dos cromossomos, possível somente em contraste-de-fase, e à conservação do material, que deveria ser mantido armazenado em baixas temperaturas. Assim, foi proposto que o material deveria ser fixado em metanol/ácido acético e corado com Giemsa. Kligerman e Bloom (1976) descreveram um método para a obtenção de cromossomos mitóticos diferente dos propostos anteriormente, empregando pela primeira vez com eficiência a solução hipotônica (KCl) para melhorar a dispersão dos cromossomos.

No Brasil, Bertollo *et al.* (1978) e Foresti *et al.* (1981, 1993) adaptaram protocolos existentes e propuseram metodologias para obtenção de cromossomos mitóticos em peixes que, por resultarem na apresentação de melhores resultados são empregadas rotineiramente até o presente. A utilização das técnicas descritas por estes autores permitiram a realização de numerosos trabalhos de citotaxonomia em peixes neotropicais.

Atualmente, são conhecidos os números diplóides e/ou haplóides de 706 espécies distribuídas em 207 gêneros e 38 famílias, o que representa aproximadamente 22% das espécies identificadas para a região Neotropical (Almeida-Toledo *et al.*, 2000, Oliveira *et al.*, 2002, Nirchio e Oliveira, 2006). Segundo Almeida-Toledo *et al.* (2000), esta região se caracteriza por uma extraordinária variabilidade quanto ao número e fórmula cromossômica em peixes. Há grupos com grande variação nos números diplóides, que apresentam valores extremos de $2n=20$ cromossomos em *Pterolebias longipinnis* a $2n=134$ em *Corydoras aeneus*, além da presença de cromossomos supranumerários em muitas espécies de peixes. Há também grupos com pouca variação no número diplóide, denominados como conservados devido a este fato, que incluem representantes das famílias Parodontidae, Prochilodontidae, Chilodontidae, além de alguns Characidae, todos com 54 cromossomos. Outras variações envolvem a ocorrência de poliploidia (*Rhamdia quelen* – Tsuda *et al.*, 2010), híbridos naturais (*Colossoma* – Almeida-Toledo *et al.*, 1987) e polimorfismos extensivos nos segmentos das regiões organizadoras de nucléolos (Foresti *et al.*, 1981). Entretanto, após cerca de 40 anos desde o início dos estudos sistematizados de citogenética de peixes, ainda há poucas referências expondo bandamentos cromossômicos resolutivos em espécies deste grupo, podendo ser citados os trabalhos de Bertollo *et al.*, 1997; Maistro *et al.*, 1999; Maistro *et al.*, 2000; Almeida-Toledo *et al.*, 2000; Vicente *et al.*, 2003 e Carvalho e Dias, 2005, Portela-Castro *et al.*, 2007). Tais resultados se tornam explicativos principalmente quando submetidos à

comparação com aqueles existente para mamíferos em que rotineiramente se utilizam bandamentos dos tipos G e R (Verma e Babu, 1995).

A técnica mais empregada para obtenção de preparações cromossômicas em peixe Neotropicais tem sido a preparação direta, que tem por base a injeção prévia de solução de colchicina nos exemplares vivos e utiliza os tecidos da porção anterior do rim para peixes ósseos e de baço para peixes cartilagosos. Vários trabalhos demonstraram também a possibilidade de obtenção de preparações cromossômicas de peixes a partir de culturas de linfócitos (Fenocchio and Bertolo, 1978; Fujiwara et al, 2001), de sangue periférico total (Ojima, 1978), e de fibroblastos (Amemiya and Gold, 1984). Entretanto, dois fatores principais restringem a utilização destas metodologias na rotina laboratorial: 1) as técnicas de obtenção cromossômica a partir de linfoblastos, seja sangue periférico total ou linfócitos, exigem uma quantidade significativa de sangue, o que inviabiliza sua utilização em exemplares de peixes de menor porte; 2) é necessário um ambiente estéril e isolado para a rotina de implantação de cultura celular, com a finalidade de reduzir as chances de contaminação.

Para a análise do resultado das preparações cromossômicas são realizadas a cariotipagem e aplicadas as técnicas de bandamento, que incluem bandamento C, marcação das regiões organizadoras nucleolares pelo nitrato de Prata (Ag-RON), coloração com cromomicina A₃ (CMA₃) e, mais recentemente, o mapeamento cromossômico de segmentos genômicos específicos como DNAr 45S, 5S e histonas (Alves et al, 2010; Teruel et al, 2010). Nas preparações cromossômicas, a qualidade e quantidade das metáfases nas lâminas são de extrema importância para as análises citogenéticas. A melhoria nas preparações cromossômicas obtidas diminui a necessidade de coletas subsequentes e sacrifício excessivo de exemplares. Mas estas melhorias técnicas só foram possíveis graças a trabalhos desenvolvidos com o objetivo de melhorar as preparações

citogenéticas, como o de Kligerman e Bloom (1977), Bertollo et al. (1979), Foresti et al. (1981, 1993), Oliveira et al. (1988) e Neto et al. (2007), entre outros. No presente trabalho, buscou-se utilizar as informações disponíveis e testar sua aplicabilidade para melhorar a qualidade das preparações citogenéticas em peixes de água doce.

Materiais e Métodos

Foram utilizados exemplares pertencentes a seis ordens de peixes ósseos Neotropicais, coletados em diferentes expedições realizadas ao longo de um ano (Tabela 1). Os exemplares variaram em tamanho de 3 a 35 cm e foram mantidos em aquários aerados com água do local de coleta. Com o intuito de aumentar o número de células em divisão, os peixes com escamas foram submetidos à descamação de uma porção da região dorsal ou no pedúnculo caudal de um lado do corpo, permitindo identificação futura, se necessário. Os peixes de couro (Siluriformes) foram lesionados com auxílio de uma agulha de insulina (0,3x13 mm) na mesma região dorsal, em apenas um dos lados.

Todos os exemplares analisados no presente trabalho foram injetados com uma solução de levedura (fermento biológico:açúcar:água – 1:2:3), segundo protocolo de Oliveira et al (1988). Após 48 a 72 horas, os exemplares foram anestesiados em solução de benzocaína (metilmetanosulfonato) 0,01 % (Gontijo et al, 2003) até a cessação de movimentos operculares. Em seguida, a porção anterior do rim foi extraída e colocada em placas de Petri contendo 10 ml de meio RPMI 1640 ou 199 (Earle) (GIBCO, Cultilab e Nutricell) a 37⁰C.

Tabela 1 – Espécies de peixes usadas para a obtenção de preparações cromossômicas.

Ordem	Espécies analisadas
Characiformes	<i>Astyanax altiparane</i> , <i>A. bockmani</i> , <i>A. fasciatus</i> , <i>A. paranae</i> , <i>Characidium gomesi</i> , <i>C. zebra</i> , <i>Hoplias malabaricus</i> , <i>Piaractus mesopotamicus</i>
Siluriformes	<i>Rhamdia</i> sp, <i>Pimelodela</i> sp, <i>Cetorpsorhamdia</i> sp, <i>Imparfinis</i> sp, <i>Hypostomus</i> sp
Gymnotiformes	<i>Gymnotus carapo</i> , <i>G. sylvius</i> , <i>G. inaequilabeatus</i> , <i>G.</i> <i>pantherhinus</i> , <i>Eigeinmania virescens</i> , <i>Eigeimamnia</i> sp, <i>Brachyhypopomus caudimaculatus</i>
Perciformes	<i>Creniciclha</i> sp, <i>Tilapia rendalli</i> , <i>Cichlasoma</i> sp
Synbranchyformes	<i>Synbranchus marmoratus</i>
Cyprinodontiformes	<i>Rivulus</i> sp, <i>Poecilia</i> sp

O tecido foi dissociado com auxílio de pinças e seringa de vidro, o sobrenadante foi transferido para tubos de centrífuga de fundo cônico (15 ml, de vidro) e foram adicionados 40 µl de colchicina 0,01%. A solução foi então homogeneizada e mantida em estufa a 37⁰C por 30 a 50 minutos, dependendo da espécie. Após este período, o tubo foi centrifugado a 9000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 10 ml de solução hipotônica (KCl 0,075M). O material foi homogeneizado e mantido em estufa a 37⁰C por 21 minutos, após os quais foram então adicionadas dez gotas de fixador (3:1 metanol: ácido acético) e o material foi novamente homogeneizado de maneira suave com o auxílio de pipeta Pasteur (pré-fixação). Após 5 minutos, o volume foi completado com fixador para 15 ml, o material foi ressuspensionado com pipeta Pasteur de forma vigorosa,

porém evitando turbilhões e centrifugado por 10 minutos a 900 rpm. O sobrenadante foi descartado, 10 ml de fixador foram adicionados e repetiu-se o passo anterior.

O tubo foi fechado com parafilme e mantido a -4°C *overnight*. No dia seguinte, foi repetida a lavagem com fixador novo, o sobrenadante foi descartado e foram preparadas lâminas para observação da qualidade da suspensão. Para melhor conservação, o material foi mantido em metanol em geladeira (4°C). As lâminas usadas para a confecção de preparações cromossômicas foram lavadas com sabão neutro, enxaguadas várias vezes com água destilada, mergulhadas rapidamente em álcool etílico 95% e secas ao ar. A lâmina seca era colocada sobre um suporte (placa de Petri) em um banho-maria a 55°C , sem contato direto com a água (Figura 1), permitindo que o vapor formasse uma fina camada de água sobre a lâmina. Então, cerca de $20\ \mu\text{l}$ da preparação cromossômica eram pingados sobre a lâmina com auxílio de micropipeta e, para diminuir a pressão sobre as células, cerca de 4 mm da ponta da ponteira eram retirados com auxílio de uma tesoura (Figura 1). A lâmina era retirada do banho-maria, seca ao ar e corada com Giemsa 2% por 7 minutos.

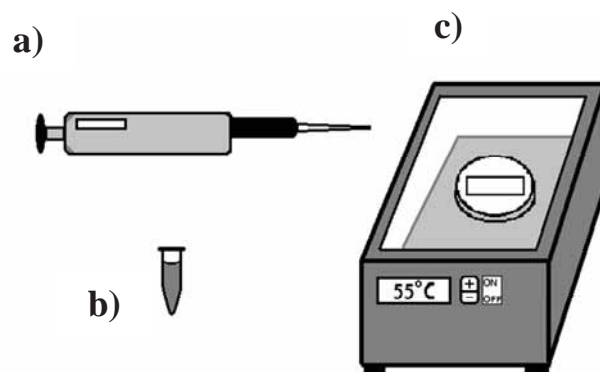


Figura 1 – Representação de elementos da metodologia usada para pingar preparações cromossômicas em lâminas: a) micropipeta; b) material em tubo de 2ml; c) banho-maria com placa de Petri e lâmina.

Resultados e Discussão

Todas as etapas testadas e descritas no item anterior, desde a manutenção dos peixes até o pingar do material na lâmina, mostraram-se cruciais para a obtenção de preparações cromossômicas de boa qualidade. Foi possível observar que o armazenamento dos peixes em aquários maiores, com um número reduzido de indivíduos por aquário e a utilização de água do próprio local de coleta fez com que os indivíduos respondessem melhor ao estímulo por injeção de levedura. Uma vez que esta injeção estimula o sistema imune, indivíduos saudáveis produziram uma melhor resposta. É importante observar que sem este estímulo havia a necessidade de analisar um número maior de indivíduos para a obtenção de resultados semelhantes para análise. O estímulo com a injeção de levedura aumentou significativamente a quantidade de células metafásicas, melhorando as preparações cromossômicas e diminuindo significativamente o número de exemplares sacrificados e o número de expedições de coletas.

Segundo Gontijo *et al* (2003), a solução de benzocaína não altera a estrutura do DNA, pois este não interage com o metilmetanosulfonato. Assim, após o período de 48 horas (somente *S. marmoratus* permaneceu por 72 horas para melhor resposta imune), os exemplares foram anestesiados para posterior sacrifício. É importante ressaltar que o período de estímulo completo deve ser respeitado porque com tempo inferior de incubação, poucas metáfases são obtidas e, com tempo superior, a maioria das células em divisão já está em estágios pós-metafásicos, como anáfase e telófase, conforme apontado por Kasahara (2009).

Os trabalhos relacionados à obtenção cromossômica citados na introdução deste trabalho (Mcphail e Jones, 1966, Stewart e Levin, 1968, Kligerman e Bloom, 1976, Bertollo *et al.*, 1978, e Foresti *et al.*, 1981, 1993, Neto *et al.*, 2007) descrevem a utilização

de colchicina a 0,05%, 0,025%, 0,017% para injeção peritoneal tanto para as preparações diretas quanto “in vitro”. No presente trabalho, a concentração utilizada foi de 0,01% de colchicina (Sigma), que forneceu uma quantidade excelente de metáfases, com cromossomos adequadamente distendidos e morfologia mais definida quando o protocolo foi utilizado nas preparações *in vitro*. Também foram realizados testes com Colcemid (KaryoMax, Invitrogen), com a qual não obtivemos resultados satisfatórios.

As preparações *in vitro* permitiram que um maior número de células entrassem em contato com o agente inibidor do fuso (colchicina), resultando num maior número de células metafásicas, diferentemente da técnica *in vivo* já estabelecida. A injeção intraperitoneal de colchicina muitas vezes leva à morte do indivíduo. Além disto, existe o risco da injeção da solução atingir algum órgão que não permita a circulação da colchicina, comprometendo todo o trabalho, gerando dúvidas sobre o motivo do insucesso. Com as células imersas e dissociadas em meio de cultura, a colchicina pode agir de forma mais homogênea em um maior número de células, permitindo um controle maior do tempo de exposição.

A hipotonização foi realizada com solução de KCl 0,075M por tempo aproximado de 50 minutos a 37°C, sendo seguida por pré-fixação das células com fixador à temperatura ambiente, para evitar choque térmico. Assim, com hipotonização e fixação adequadas, as células não se apresentaram fragilizadas ao serem pingadas sobre a lâmina. A fixação por longo período (*overnight*) permitiu reduzir o número de lavagens sem a perda de qualidade do material fixado. Isto é importante principalmente quando se trabalha com peixes pequenos, uma vez que evita a perda do material, que já é reduzido.

A manutenção de suspensões celulares em fixador por longos períodos geralmente leva à perda da qualidade das preparações cromossômicas. Este fato é frequentemente relatado por citogeneticistas que observam que o material estocado não apresenta

metáfases de boa qualidade e que a quantidade destas diminui em relação ao material recém-preparado. Por este motivo recomendamos o armazenamento das preparações cromossômicas em metanol puro, o que garante melhor conservação, uma vez que o contato com o ácido acético por longos períodos pode resultar na degradação do DNA das amostras (Barnett et al, 1980). Antes da utilização do material após a sua estocagem, deve-se ressuspendê-lo em fixador novo e prosseguir com a confecção das lâminas.

Outro fator essencial para a obtenção de bons resultados na confecção das lâminas com preparações cromossômicas é ter o material bem espalhado, com cromossomos esticados, sem sobreposições e propícios a aplicação de técnicas de bandamento cromossômico. O material citogenético gotejado em câmara úmida permite maior uniformidade no espalhamento das células, posterior secagem e envelhecimento. Segundo Barch et al (1997), a distribuição do material nas lâmina deve ser uniforme para que não haja diferença na morfologia dos cromossomos da “borda” e do interior da metáfase. Estes autores descreveram que o material pingado em lâmina seca não permite uma secagem uniforme dos cromossomos, levando à formação de cromossomos escuros e brilhantes quando observados em contraste de fase. Considera-se, pois, que estes cromossomos não sofreriam ação uniforme dos reagentes na realização de bandamentos cromossômicos, inviabilizando sua utilização. Sugeriram que o controle da umidade e temperatura ao se proceder o gotejamento do material em câmara úmida (controlada) permitiria uma maior uniformidade das metáfases e das preparações cromossômicas.

Outro fator reportado por Barch et al (1997) que interfere na qualidade dos resultados é o tempo de envelhecimento das preparações cromossômicas antes da aplicação dos protocolos de bandamento cromossômico. O material novo é muito suscetível à ação de qualquer reagente usado para produzir padrões de bandamento cromossômico; por outro lado, quando envelhecido, não se apresenta mais adequado ao bandamento. Neste sentido,

resultados interessantes. Por exemplo, o bandamento C forneceu em nosso laboratório excelentes resultados após o envelhecimento do material pingado em lâmina por dois dias à temperatura ambiente (cerca de 25 a 30⁰C). Com menos tempo de envelhecimento as bandas ficam claras, com aspecto de corrosão e, com mais tempo, parece não haver ação eficaz dos reagentes usados (dados não apresentados).

Em conclusão, a aplicação das condições apresentadas resultou na melhoria qualitativa das preparações cromossômicas quanto ao espalhamento, grau de condensação e morfologia dos cromossomos em diferentes espécies de peixes pertencentes às ordens Gymnotiformes, Symbranchyformes, Perciformes, Siluriformes e Characiformes. Com exceção desta última ordem, para a qual foram obtidos bons resultados com as técnicas previamente utilizadas, também observamos um aumento no número e na qualidade das metáfases nas preparações das espécies de todas as outras ordens amostradas (Figura 2).

Deve ser ressaltado, finalmente, que a qualidade das preparações citogenéticas depende de muitos fatores, entre os quais a procedência e qualidade dos reagentes usados, com melhora expressiva quando são usadas soluções recém-preparadas; do tempo de armazenamento das preparações, dos procedimentos utilizados na confecção das lâminas e, não menos importante, do preparo, conhecimento e experiência do citogeneticista.

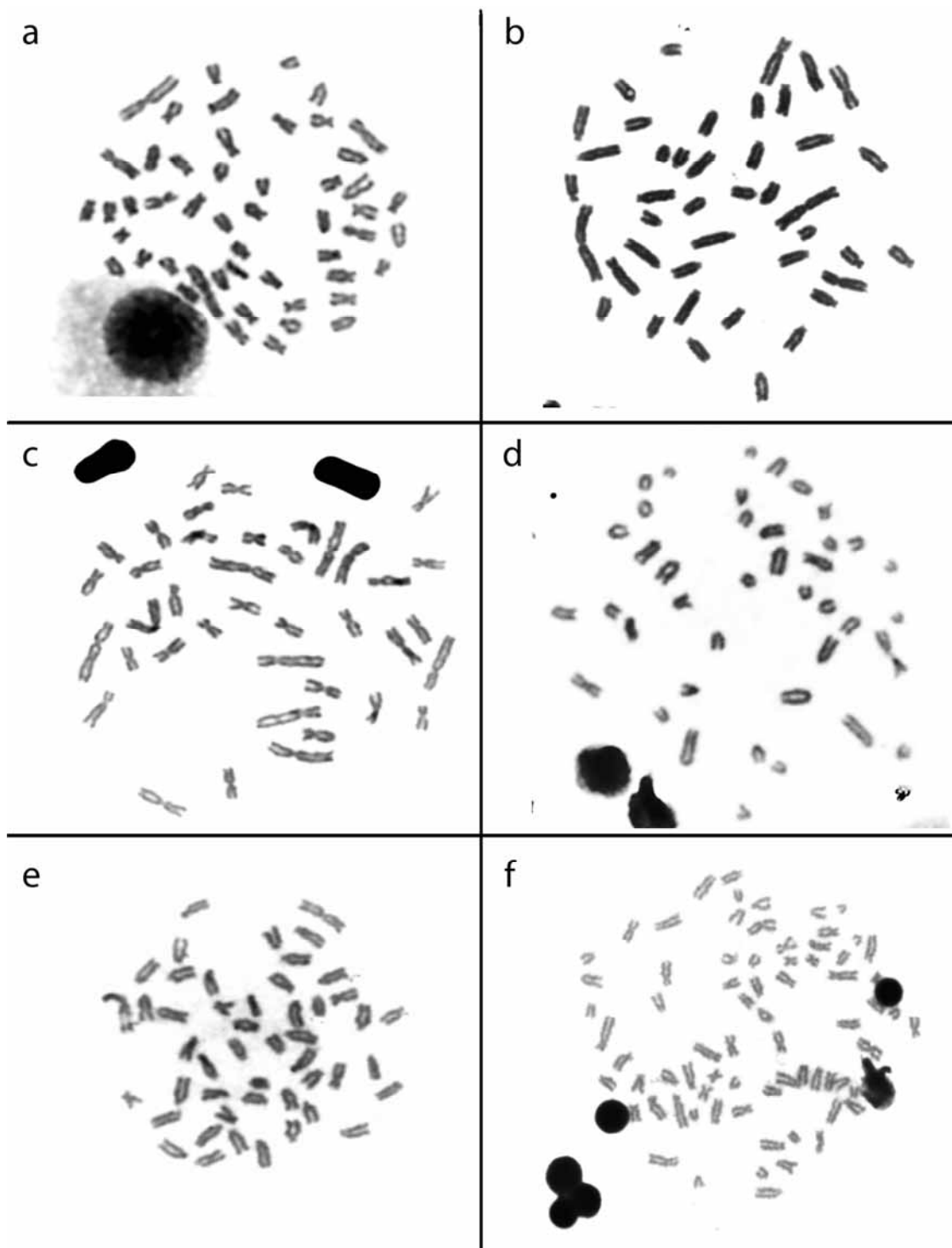


Figura 2 - Metáfases de espécies representativas de quatro ordens de peixes Neotropicais obtidas a partir de culturas de linfócitos de: (a) *Astyanax* sp; b) *Symbranchus marmoratus*; c) *Hoplias malabaricus*; d) *Gymnotus* sp; e) *Cichlasoma* sp; f) *Hypostomus* sp.

Referências

- Almeida-Toledo L.F.; Bernardino G.; Oliveira C.; Foresti F.; Toledo-Filho S.A. 1996. Gynogenetic fish produced by a backcross involving a male hybrid (female *Colossoma macropomum* x male *Piaractus mesopotamicus*) and a female *Piaractus mesopotamicus*. Bol. Téc. CEPTA, 9:31-37.
- Almeida-Toledo, L.F., Foresti, F. and Toledo-Filho, S.A. (2000) Karyotypic evolution in Neotropical freshwater fish – Chromosoma Today – vol. 13: 169-182.
- Alves JCP., Paiva LRS., Oliveira C., Foresti F. (2010) Interspecific chromosomal divergences in the genus *Characidium* (Teleostei: Characiformes: Crenuchidae). Neotropical Ichthyology, 8(1):77-86.
- Amemiya C.T., Bickham j.W., Gold J.R. (1984) A Cell Culture Technique for Chromosome Preparation in Cyprinid Fishes. Copeia, Vol. 1984, No. 1 pp. 232-235.
- Barch M.J. (Editor), Knutsen T. (Editor), Spurbeck J. (Editor). (1997) The AGT Cytogenetics Laboratory Manual. Softcover, Spiral Bound 688 pages.
- Bertollo, A.C., Fontes, M.S., Fenocchio, A. S. and Cano, J. (1997) The X₁X₂Y sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus*. I. G-, C- and chromosome replication banding. Chromosome Research – 5:493-499.
- Bertollo L. A. C., Takahashi C. S., Moreira-Filho O. (1978) Cytotaxonomic considerations of *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Brazil. J. Genet.*, 1: 103-120.
- Carvalho, R. A. and Dias, A.L. (2005) Karyotypic characterization of *Iheringichthys labrosus* (Pisces, Pimelodidae): C-, G- and restriction endonuclease banding. Genetics And Molecular Research – 4: 663-667.
- Fenocchio, A.S. and Bertollo L.A.C. (1978) A simple method for fresh-water fish lymphocyte culture. Revista Brasileira de Genética, v11, issue 4, 847-852.
- Foresti, F., Almeida-Toledo L.F., Toledo-Filho S.A. 1981. Polymorphic nature of nucleolus organizer regions in fishes. Cytogenetics and Cell Genetics, 31: 137-144.
- Foresti, F., Oliveira C., Almeida-Toledo, L.F. (1993). A method for chromosome preparations from large specimens of fishes using in vitro short treatment with colchicine. Experientia, Basel, Switzerland, v. 49, p. 810-813.
- Fujiwara A., Nishida-Umehara C., Sakamoto T, Okamoto N., Nakayama I., Abe S. (2001) Improved fish lymphocyte culture for chromosome preparation. *Genetica* 111: 77–89.

- Gontijo A.M.M.C., Barreto R.E., Speit G., Reyes V.A.V., Volpato G.L., Salvadori, D.M.F. 2003. Anesthesia of fish with benzocaine does not interfere with comet assay results. *Mutation Research* 534, 165–172.
- Kasahara, S. (2009) *Introdução à pesquisa em citogenética de vertebrados*. Ed. Sociedade Brasileira de Genética. 1ªed. 160 pp.
- Kligerman A.D., Bloom S.E. (1977) Rapid chromosome preparations from solid tissues of fishes. *Journal of Fishery Research Board of Canada*, 34: 266 – 269.
- Maistro, E. L., Foresti, F. and Oliveira, C. (1999) R- and G-band patterns in *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characiformes, Characidae). *Genetics and Molecular Biology* - 22:201-204.
- Maistro, E. L., Foresti, F. and Oliveira, C. (2000) Cytogenetic analysis of A- and B-chromosomes of *Prochilodus lineatus* (Teleostei, Prochilodontidae) using different restriction enzyme banding and staining methods. *Genetica* 108: 119–125.
- Mcphail, J.D. and Jones, R.L. (1966) A simple technique for obtaining chromosome from teleost fish. *J. Fish Res. Bd. Canad.* 23:767-769.
- Netto M.R.C.B, Pauls E., Affonso P.R.A.M. 2007. A standard protocol for obtaining fish chromosomes under post-mortem conditions. *Micron* 38, 214–217.
- Ojima, Y. (1978) Preparation of cell-cultures for chromosome studies of fishes. *Proc. Japan Acad., Ser. B: Phys. Biol. Sci.* 54(3):116-120.
- Oliveira C, Almeida-Toledo LF, Foresti F, Toledo-Filho AS (1988) Supernumerary chromosomes, Robertsonian rearrangements and multipleNORs in *Corydoras aeneus* (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae). *Caryologia* 41: 227–236.
- Oliveira, C., Wright, J.M. and Foresti, F. (2002) Chromosome structure in fishes. Some Aspects of Chromosome Structure and Functions. Narosa Publishing House – Ch 10.
- Portela-Castro A.L.B., Julio-Jr H.F., Martins-Santos I.C., Pavanelli C.S. (2007) Occurrence of two cytotypes in *Bryconamericus aff. Iheringii* (Characidae): karyotype analysis by C- and G-banding and replication bands. *Genetica* (2008) 133:113–118.
- Teruel M., Cabrero J., Perfectti F., Camacho JPM. (2010) B chromosome ancestry revealed by histone genes in the migratory locust. *Chromosoma* 119:217–225.

Tsuda J.R., Moraes V.P.O., Giuliano-Caetano L., Dias A.L. (2010) Occurrence of natural triploidy in *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae). Genet. Mol. Res. 9 (3): 1929-1935.

Verma, RS and Babu, A (1995). Human Chromosomes: Principles and Techniques. McGraw-Hill, New York.

Vicente, V.E., Bertollo, L.A.C., Valentini, S.R., and Moreira-Filho, O. (2003) Origin and Differentiation of a Sex Chromosome System in *Parodon hilarii* (Pisces, Parodontidae). Satellite DNA, G- and C-. Genética – 119:115-120.

Capítulo 2 - Cultura celular de sangue periférico para obtenção de cromossomos metafásicos de peixes ósseos neotropicais com aplicação de bandamento G

Resumo

Preparações cromossômicas obtidas com a utilização de cultura de linfócitos apresentam quantidade e qualidade de metáfases superiores às obtidas por preparação direta, já que é possível controlar melhor fatores bióticos e abióticos como temperatura, concentração de sais e fases do ciclo celular pelo tempo de crescimento, entre outros. Nos estudos citogenéticos de muitos grupos de vertebrados, a cultura celular é uma rotina já estabelecida, enquanto para peixes são pouco numerosos os trabalhos com espécies de peixes Neotropicais realizados com base na utilização de culturas celulares. Com o objetivo de melhorar qualitativamente e quantitativamente a análise citogenética de peixes, foi estabelecido um protocolo de obtenção cromossômica a partir de sangue periférico em peixes Neotropicais ósseos. Esta técnica possibilita utilizar exemplares sem a necessidade de sacrificá-los e resulta em preparações cromossômicas mais uniformes e de qualidade. Com uma pequena quantidade de sangue, cerca de 200 μ l, foi possível obter excelentes preparações citogenéticas, inclusive em exemplares de pequeno porte, como as apresentadas neste trabalho, no qual utilizamos como modelo *Oreochromis niloticus* linhagem chitralada.

Palavras-chave: cultura celular, sangue, citogenética, cromossomo e bandamento G

Introdução

Nos últimos 15 anos, a metodologia utilizada na análise citogenética de peixes sofreu grandes modificações e avanços, passando a incluir a técnica de hibridação “in situ” fluorescente (FISH) e suas variantes. Enquanto as técnicas de análise cromossômica convencionais permitiam uma abordagem mais relacionada a variações numéricas e estruturais, a produção de sondas para segmentos cromossômicos específicos e sua hibridação nos cromossomos metafásicos possibilitou mapear genes, caracterizar a estrutura cromossômica e determinar o papel de diferentes seqüências na organização genômica dos mais diversos organismos, tanto animais quanto vegetais. Devido ao tamanho diminuto dos cromossomos em certas espécies de plantas, o mapeamento cromossômico com sondas de DNA tornou-se imprescindível, possibilitando identificar espécies antes consideradas crípticas e identificar linhagens de interesse econômico dentro de uma mesma espécie (Lagercrantz, 1998; Paterson et al, 2000; Gao et al, 2009, Figueroa et al, 2010). O mesmo vem acontecendo com grupos de animais com cromossomos pouco distinguíveis quanto ao tamanho e forma, como as abelhas (Meznar et al, 2010), o galo doméstico, que possui microcromossomos (Krasikova et al, 2010), a tilápia (Lee et al, 2010) e pequenos peixes como *Characidium* (Alves et al, 2010), dentre outros.

Em peixes, os genes mais estudados com o uso da técnica de FISH são representantes de famílias de moderada repetitividade no genoma, como DNAr 5S e 45S, utilizados na maioria dos trabalhos recentes. Sua utilização já é considerada uma rotina estabelecida nesta área e é fundamental na maior parte dos trabalhos que utilizam peixes como modelos, tanto em estudos ecológicos populacionais, como de dispersão gênica, organização no genoma ou ainda para a análise de novas classes de DNAr (Martins et al, 2006; Noleto et al, 2007; Alves et al, 2010). Mais recentemente, o mapeamento com

sondas de histonas tem ampliado os conhecimentos relacionados à organização genômica em insetos (Cabrero et al, 2009; Teruel et al, 2010, Hashimoto et al, 2011).

O mapeamento cromossômico ainda é dificultado em peixes por problemas relacionados ao tamanho, semelhança e elevado número de cromossomos que caracterizam o cariótipo de grande número de representantes deste grupo de organismos, conforme constatado em representantes das famílias Paradontidae, Curimatidae e Prochilodontidae. A cultura celular possibilita a obtenção de cromossomos longos e com morfologia distinta, com muitas metáfases de boa qualidade, enquanto preparações diretas (*in vivo*) têm limitações quanto a estes mesmos aspectos (Capítulo 1). As preparações cromossômicas obtidas através de cultura celular também apresentam a vantagem de fornecer melhores resultados após a aplicação das técnicas de bandamento cromossômico clássico e de FISH, resultando na identificação mais precisa dos cromossomos.

Embora em número pouco expressivo, alguns trabalhos realizados na área da citogenética de peixes utilizaram protocolos de técnicas de obtenção de preparações cromossômicas com base na cultura de linfócitos (Fenocchio e Bertollo, 1988; Fugiwara et al, 2001; Eyo, 2005), cultura de tecido por curto período (Fenocchio et al, 1991) e cultura de fibroblastos (Amemya, 1984; Komura et al, 1988; Zhang et al, 1998). Entretanto, estas técnicas ainda são pouco utilizadas para estudos mais amplos, relacionados a aspectos ecológicos, populacionais e citosistemáticos.

Neste trabalho procuramos adaptar protocolos existentes da técnica de cultura de linfócitos de peixes com o intuito de formular uma metodologia eficiente e adequada à obtenção de preparações cromossômicas com maior número de metáfases e com cromossomos alongados, de modo a permitir a utilização de exemplares de pequeno porte (com cerca de dez centímetros) e sem a necessidade de sacrifício ou de injeção de estimulantes mitóticos.

Materiais e Métodos

Para estabelecer a técnica de obtenção de cromossomos mitóticos por cultura de sangue periférico total, utilizamos como modelo a linhagem chitralada da tilápia *Oreochromis niloticus*. Os exemplares foram cedidos pelo Prof. Dr. Edgar Teixeira (Departamento de Zootecnia, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais). As culturas celulares foram realizadas no Laboratório de Citogenética Evolutiva do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Minas Gerais.

Foram utilizados 12 exemplares de *O. niloticus* mantidos em tanques aerados. Nenhum exemplar foi sacrificado. Para proceder à coleta de sangue, os exemplares foram previamente anestesiados em benzocaína (metilmetanosulfato – MMS), segundo Gontijo et al. (2003). Foram utilizadas seringas heparinizadas (heparina sódica de 5000 U.I/ml – Blausiegel) de 5 ml (BD , Injex e SR) e agulhas 25X0,7 mm para punção cardíaca. O sangue retirado dos exemplares foi mantido refrigerado entre 4^oC a 8^oC por até três dias.

O meio de cultura completo era constituído de 5ml de meio de cultura RPMI 1640 com L-glutamina (Gibco; Embriolife; Cultilab; Nutricell) ou 199(Earle) com L-glutamina (Cultilab; Nutricell), 1 ml de soro fetal bovino (Embriolife; Cultilab; Nutricell), 20 µl de solução de antimicótico/antibiótico 100X (Sigma) e 50 µl a 300 µl de fitohemaglutinina forma M (Gibco; Cultilab). O pH do plasma sanguíneo de um exemplar por espécie foi medido com tiras indicadoras de pH 0-14 (Merck), resultando em uma média de 8 a 8,5. O pH do meio de cultura foi ajustado para 8 com NaOH 1M. Para a semeadura foram adicionados de 100 µl a 200 µl de sangue periférico total (Tabela 1).

Tabela 1 – Concentração de fitohemaglutinina (PHA), tipo e marca de meio de cultura e tempo de incubação usados nos experimentos.

Amostras Concentração de Fitohemaglutini na	Meio RPMI 1640												Meio 199 (Earle)															
	Horas de Crescimento (72, 96, 120 e 144 horas pós semear, para cada meio)																											
	Gibco				Cultilab				Embriolife				Nutricell				Cultilab				Nutricell							
1 – 50 µl	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2 - 100 µl	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3 – 150 µl	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	2	2	0	1	1	1	1	1	1
4 – 200 µl	1	2	2	3	1	1	1	2	1	1	2	2	1	1	2	2	1	2	4	5	1	2	4	5	1	2	4	5
5 – 250 µl	1	1	3	3	0	1	2	3	0	1	3	3	0	1	1	1	1	1	3	5	1	1	2	5	1	1	2	5
6 – 300 µl	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	1	0	0	0

Legenda: 0 = sem resultado; 1= poucas metáfases (menos de três por lâmina); 2= quantidade insuficiente e qualidade ruim (cerca de dez metáfases por lâmina); 3= quantidade ótima de metáfases com qualidade irregular (cerca de 40 metáfases por lâmina); 4= quantidade ótima para análise (cerca 100 metáfases por lâmina); 5= quantidade elevada de metáfases com erros (aneuplóides ou poliploides).

As células foram cultivadas em tubos estéreis de centrífuga de fundo cônico de 15 ml (Techno Plastic Products) mantidos em estufa incubadora B.O.D. (demanda bioquímica de oxigênio) de 72 a 144 horas (três a seis dias) a 27⁰C. Os tubos permaneceram inclinados (45⁰ em relação à base) e sem agitação (Figura 1). Os tempos de cultura testados estão indicados na Tabela 1. Todos os testes foram realizados duas ou três vezes.

Após o período de incubação, foram adicionados 40 µl de colchicina 0,01% (Sigma) pelo período de 35 minutos. O material foi centrifugado por 10 minutos a 900 r.p.m.. O sobrenadante foi descartado e o material foi ressuscitado em 5 ml de solução hipotônica 0,075 M e mantido em estufa a 27⁰C por 35 minutos. Foi realizada então a pré-fixação (fixador 3:1 ácido acético:metanol), na qual eram adicionadas 10 gotas de fixador à

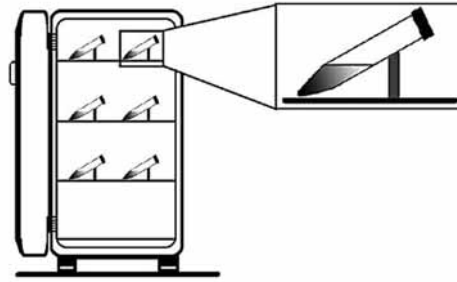


Figura 1 – Representação esquemática de uma estufa B.O.D. e a posição do tubo de centrifugação de fundo côncavo.

temperatura ambiente e o material era homogeneizado gentilmente com pipeta Pasteur. Após 5 minutos, foi adicionado fixador até o volume de 15 ml e o material foi ressuspendido gentilmente com pipeta Pasteur por cerca de 50 vezes. O material foi centrifugado a 900 r.p.m por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e repetiu-se sua ressusensão em 10 ml de fixador, pipetando gentilmente cerca de 50 vezes. O tubo foi vedado e mantido a -20°C “overnight”. Após este período, o material foi retirado do freezer, ressuspendido e centrifugado a 900 r.p.m. por 10 minutos. Quando o *pellet* não estava totalmente branco, a lavagem com fixador era repetida. O sobrenadante era descartado e o material ressuspendido em 0,5 ml a 1 ml de fixador recém-preparado.

As lâminas previamente limpas com detergente neutro e bucha macia, sempre esfregando num único sentido, foram então lavadas com água destilada e mantidas em etanol 95%, retiradas da solução e secas ao ar. As lâminas secas eram colocadas sobre um suporte dentro de um banho-maria a 55°C , próximas à água, mas sem tocá-la, permitindo que o vapor formasse uma fina camada sobre a lâmina. O material era então pingado num ângulo de aproximadamente 45° . Após alguns segundos, quando o material já se espalhará

bem sobre a lâmina, esta era retirada do banho-maria e o excesso de água era removido com papel absorvente. As lâminas eram então secas ao ar e mantidas por sete dias à temperatura ambiente, antes de serem usadas para análise. O bandamento G foi realizado segundo o protocolo proposto por Seabright (1971). As preparações cromossômicas foram analisadas em microscópio óptico Nikon Eclipse E800 e as correções de captura foi utilizado o software BandView –Applied Spectral Imaging.

Resultados

Os testes realizados e seus resultados estão apresentados na Tabela 1. As amostras foram numeradas de 1 a 6, de acordo com a quantidade de fitohemaglutinina utilizada. Nas amostras 1, 2, 3 e 6, que continham respectivamente, 50 μ l, 100 μ l, 150 μ l e 300 μ l de fitohemaglutinina, não foi possível observar crescimento celular significativo. Portanto, o uso de 200 μ l e 250 μ l de fitohemaglutinina mostrou-se o mais adequado.

Foram testados tempos de cultura de 72, 96, 120 e 144 horas. Com 72 e 96 horas, foram visualizadas poucas metáfases, menos de dez por lâmina. Períodos de crescimento superiores (120 e 144 horas) forneceram melhores resultados de crescimento celular. Os testes 4 e 5, com 200 μ l e 250 μ l de fitohemaglutinina, respectivamente, e cultivo de 72 e 96 horas, apresentaram baixa concentração de células metafásicas, porém com melhor qualidade, quando comparadas com os outros testes. Os períodos de cultivo de 120 e 144 horas forneceram um crescimento muito significativo, com o ótimo obtido com 120 horas. Após 144 horas de cultura, tanto com 200 μ l como com 250 μ l de fitohemaglutinina (testes 4 e 5), foram observadas metáfases aneuplóides e poliplóides, com predominância de tetraplóides (Figura 2). O teste 4 (200 μ l de fitohemaglutinina) forneceu, portanto, o melhor resultado, com muitas metáfases sem alterações do número diplóide. Também foi

possível observar diferenças quanto à qualidade das preparações cultivadas nos meios RPMI 1640 e 199 (Earle). O último meio forneceu melhores resultados para *O. niloticus*. O uso do meio RPMI 1640 resultou num menor número de metáfases.

Após a padronização da técnica de obtenção de cultura de sangue periférico utilizando a tilápia como modelo, foram realizados cultivos de sangue periférico de outras quatro espécies (*Astyanax* sp, *Hoplias* cf *malabaricus*, *Gymnotus silvius*, *Cichlasoma* sp) com as melhores condições obtidas em tilápia. Nestas, foram observadas variações na quantidade de metáfases obtidas, mas que sempre apresentavam boa qualidade quanto à forma e dispersão dos cromossomos (Figura 3). Foram obtidos os padrões de bandamento G nas preparações cromossômicas obtidas por cultura de linfócitos de *Oreochromis niloticus* (Figura 4).

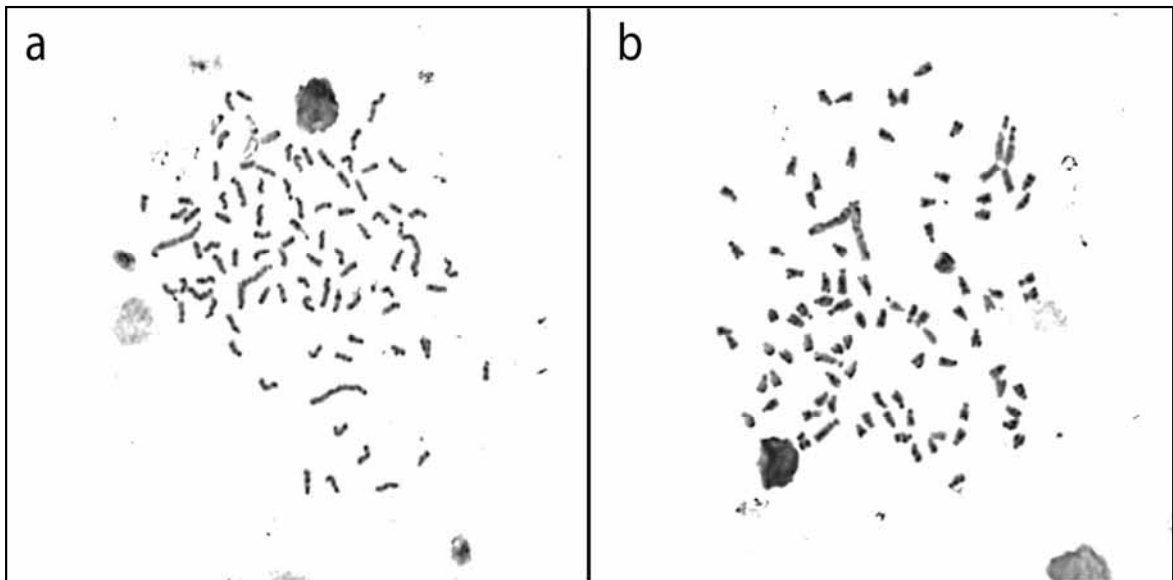


Figura 2 – Metáfases tetraplóides obtidas após 144 horas de cultura.

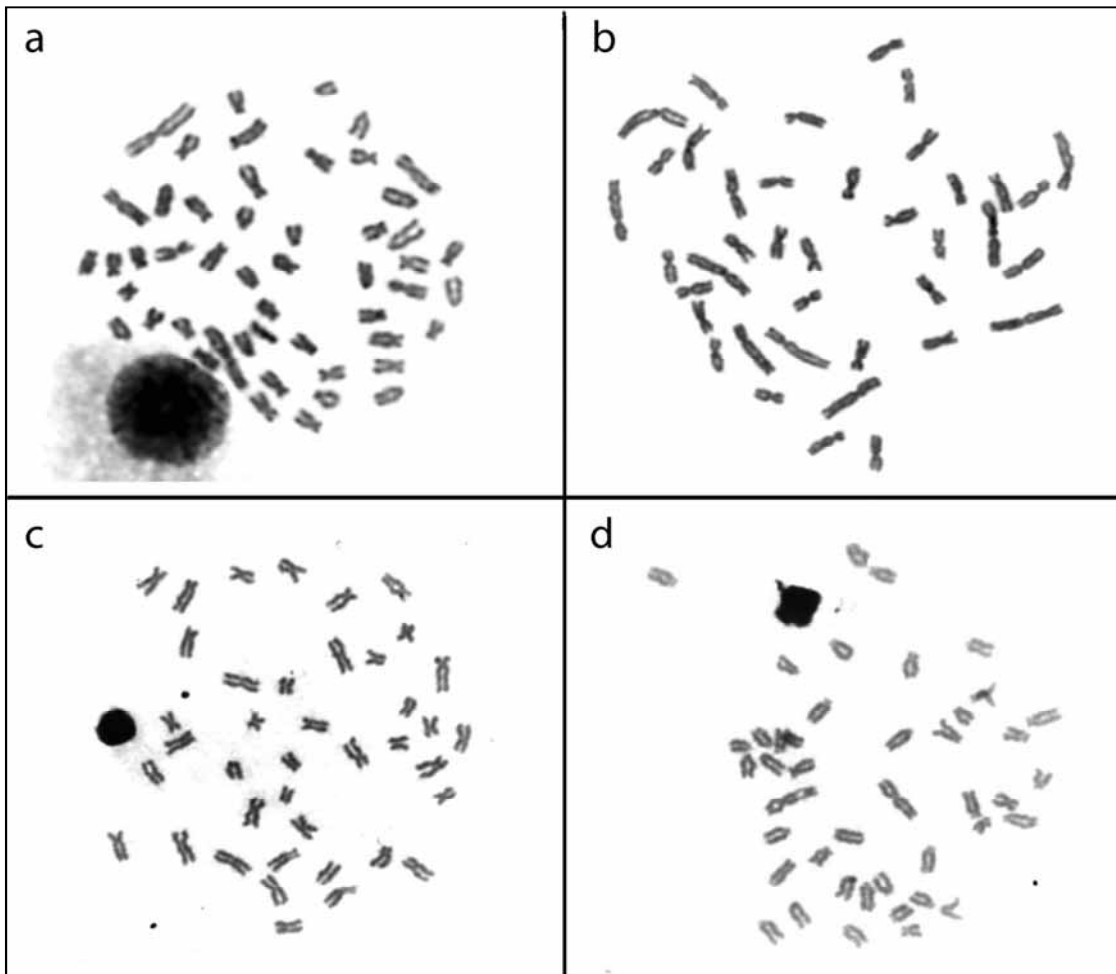


Figura 3 – Metáfases obtidas por cultura de sangue periférico em: a) *Astyanax*; b) *Hoplias*; c) *Gymnotus*; d) *Cichlasoma*. Notar o bom padrão de dispersão dos cromossomos.

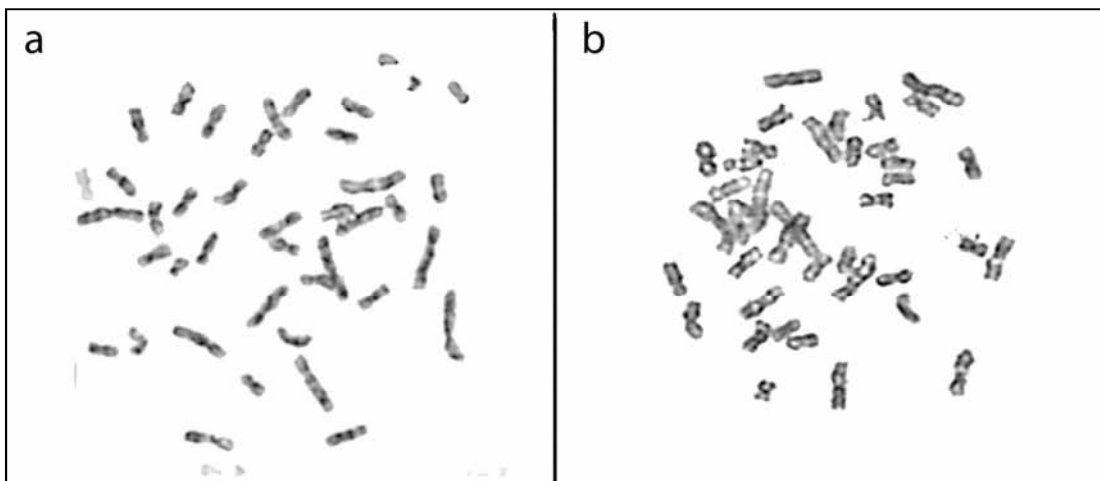


Figura 4 – Bandamento G em metáfases de *Oreochromis niloticus*: a) metáfase obtida por cultura de sangue periférico; b) metáfase obtida pela técnica direta convencional.

Discussão

A cultura celular é uma ferramenta valiosa para os pesquisadores em diversos campos. Facilita a análise de propriedades e processos biológicos difíceis de estudar diretamente no organismo. Também permite desenvolver e manter linhagens celulares para as mais diversas aplicações, sem a necessidade de se manter o organismo como um todo para teste (Helgason e Miller, 2005, Kasahara, 2009).

De acordo com Helgason e Miller (2005), quatro passos são necessários para o sucesso das culturas celulares. O primeiro passo está relacionado aos equipamentos que facilitam a implantação e manutenção da cultura celular, ou seja, deve-se ter uma estrutura laboratorial adequada, dependente do nível de segurança dos organismos estudados. O nível de biocontaminação (Níveis 1-4) é dependente do tipo de células em cultura e dos riscos que essas células podem ter de transmitir agentes infecciosos.

O segundo passo é relacionado à esterilidade do local de trabalho (fluxo laminar, estufa, bancada de processamento) e de quem irá manipular o material. Tudo deve estar limpo, obedecendo às normas de esterilidade. O terceiro passo diz respeito ao controle de qualidade dos reagentes e suplementos, que devem ser testados a cada lote adquirido. A opção por uma determinada marca para cada reagente e suplemento diminui o erro entre os lotes utilizados.

Uma vez que os três passos anteriores estejam bem estabelecidos, pode-se iniciar o quarto passo, que se relaciona às questões biológicas da cultura celular. Assim, é necessário determinar se o tecido a ser usado é ou não aderente e a identificação do tipo celular usado deve ser feita a fim de validar a linhagem utilizada.

A obtenção de cromossomos mitóticos a partir de cultura de sangue periférico total em peixes contribui de forma significativa, permitindo realizar a análise citogenética em

espécies nunca ou pouco estudadas devido a dificuldades na obtenção de material. Este é o caso de exemplares de grande porte, que não podem ser mantidos em aquários adequadamente, ou ainda, de coletas em regiões distantes e sem estrutura para a realização de preparações diretas de cromossomos. O uso de cultura celular permite também manipular exemplares que não podem ser sacrificados, como matrizes de piscicultura, exemplares de testes de cruzamento e espécies raras com número reduzido de indivíduos. A quantidade de sangue é outro fator importante, já que com 0,1 a 0,2 ml (100 μ l – 200 μ l) de sangue é possível obter excelentes culturas celulares, sem a necessidade de maiores quantidades, como descrito por Fugiwara et al (2001).

É importante ressaltar que a coleta de sangue por punção cardíaca neste trabalho permitiu a manutenção de todos os indivíduos analisados, que foram previamente anestesiados com em solução de benzocaína (Gontijo et al, 2003). Segundo Gontijo et al. (2003), a solução de benzocaína diminui o sofrimento do exemplar, permitindo coletar amostras de sangue, aumentando a taxa de sobrevivência e, mais importante, impedindo a interação do MMS com o DNA, mantendo assim a integridade cromossômica. Foram realizadas também coletas por punção através da veia dorsal, segundo Fenocchio e Bertollo (1988). Neste caso, nem sempre a coleta ocorria na primeira tentativa e havia a dificuldade de localizar a veia com precisão, bem como de avaliar seu calibre. Isso acarretava a necessidade de várias tentativas de coleta, aumentando o dano ao exemplar, com possível hemorragia local e, em muitos casos, a morte. Após a coleta, o material pode ser mantido em geladeira por até três dias, mas quanto maior o tempo de armazenamento, menor é o sucesso de crescimento celular, resultando em menos de metáfases.

Os testes realizados demonstraram que o meio 199 (Earle) com L-glutamina forneceu um melhor resultado do que o meio RPMI 1640. Resultados similares foram relatados por Fugiwara et al. (2001), que testaram, além de diferentes meios de cultura,

diferentes indutores mitóticos, métodos de separação da camada linfocitária e vários períodos de incubação.

Diferentemente de Fugiwara et al. (2001), neste trabalho procuramos utilizar pequenas quantidades de sangue e, por isto, cultivamos sangue total, assim como fizeram também Fenocchio e Bertollo (1988). Entretanto, mesmo em pequenas quantidades de sangue, há eritrócitos e outros componentes da fase vermelha do sangue, o que dificulta consideravelmente o crescimento celular, já que a quantidade de eritrócitos é maior do que a de linfócitos. Estes elementos sangüíneos competem diretamente com os linfócitos pelos componentes do meio de cultura e pelo espaço, afetando os linfócitos em divisão. Além disto, são células nucleadas que não se dividem mais e, após o processamento do material, os núcleos densos dos eritrócitos ficam dispersos na lâmina, muitas vezes se sobrepondo aos cromossomos e impossibilitando a análise. Para reduzir estes problemas, não se deve utilizar mais do que 200 µl de sangue total, mesmo aumentando a quantidade de meio de cultura, pois quanto mais meio maior a pressão interna no tubo sobre as células (Barch et al, 1997). Com a finalidade de reduzir esta pressão, utiliza-se o tubo inclinado, aumentando a superfície de contato (Figura 1). Para diminuir a quantidade de hemácias, pode-se utilizar 0,5 ml mais de fixador ao ressuspender o material, homogeneizar a solução, esperar 10 minutos sem agitar o material, retirar o sobrenadante e reservá-lo para preparar lâminas, descartando o *pellet*.

Além de permitir a obtenção de boas preparações cromossômicas, o material obtido por cultura celular é mais indicado para a obtenção de padrões de bandamento cromossômico (Fugiwara et al , 2001), resultando na melhor qualidade nos resultados, como pode ser visto na Figura 4. Os fatores que afetam a obtenção de bons padrões de bandamento G ainda são desconhecidos, porém acredita-se que proteínas não-histônicas

estariam diretamente ligadas ao bandamento (Homquist e Comings, 1976; Holmquist et al., 1982).

Há vários relatos na literatura sobre a qualidade dos padrões de bandas G em cromossomos de mamíferos obtidos a partir de técnicas diretas e indiretas, bem como após diferentes formas de fixação (Takayama, 1974; Barnett, 1980; Ronne, 1988; Islam e Levan, 1987). Neste trabalho, foi possível observar esta diferença também em cinco espécies de peixes. Assim, é evidente que a obtenção de cromossomos metafásicos por cultura de sangue periférico é interessante, visto que fornece preparações cromossômicas de melhor qualidade, permitindo inclusive a obtenção de padrões de bandas G bastante resolutivos, raramente apresentados em trabalhos com peixes.

Referências

- Alves JCP., Paiva LRS., Oliveira C., Foresti F. (2010) Interspecific chromosomal divergences in the genus *Characidium* (Teleostei: Characiformes: Crenuchidae). *Neotropical Ichthyology*, 8(1):77-86.
- Amemiya CT., Bickham JW., Gold JR. (1984). A Cell Culture Technique for Chromosome Preparation in Cyprinid Fishes. *Copeia*, Vol, 1984, No. 1, pp. 232-235.
- Barnett RI., Gray VA., Mackinnon EA. (1980) Effects of acetic acid-alcohol, trypsin, histone 1 and histone fragments on Giemsa staining patterns in chromosomes. *Histochemistry*. vol. 65, pp 207-215.
- Barch M.J. (Editor), Knutsen T. (Editor), Spurbeck J. (Editor). (1997) *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. Softcover, Spiral Bound 688 pages.
- Cabrero J., López-León MD., Teruel M., Camacho JPM. (2009) Chromosome mapping of H3 and H4 histone gene clusters in 35 species of acridid grasshoppers. *Chromosome Research* 17:397–404.
- Eyo JE. (2005) Cytogenetic variations in *Clarias* species (CLARIIDAE: SURULIFROMIS) of the Anambra river using leucocytes culture techniques. *Animal Research International* 2(1): 275 – 286 275 .

- Fenocchio AS, Venere PC, César ACG, Dias AL and Bertollo LAC (1991) Short term culture from solid tissues of fishes. *Caryologia* 44:161–166.
- Fenocchio AS., Bertollo LAC. (1988) A simple method for fresh-water fish lymphocyte culture. *Revista Brasileira de Genética* v.11, issue 4, pg 847-852.
- Figueroa DM., Davis JD., Strobel C., Conejo MS., Beckham KD., Ring BC., Bass HW. (2010). The Selection and Use of Sorghum (*Sorghum propinquum*) Bacterial Artificial Chromosomes as Cytogenetic FISH Probes for Maize (*Zea mays* L.) *Journal of Biomedicine and Biotechnology* Volume 2011, Article ID 386862, 16 pages.
- Fujiwara A., Nishida-Umehara C., Sakamoto T., Okamoto N., Nakayama I., Abe S. (2001) Improved fish lymphocyte culture for chromosome preparation. *Genetica* 111: 77–89, 2001.
- Gao D., Gill N., Kim HR., Walling JG., Zhang W., Fan C., Yu Y., Ma J., SanMiguel P., Jiang N., Cheng Z., Wing R.A., Jiang J., Jackson S.A. (2009) A lineage-specific centromere retrotransposon in *Oryza brachyantha*. *The Plant Journal* (2009) 60, pp. 820–831.
- Helgason CD., Miller Cl. (2005) Basic Cell Culture Protocol. 3^a ed. Human Press *in*: *Methods in molecular biology*. p. 364.
- Holmquist GP., Comings DE. (1976) Histones and G Banding of Chromosomes. *Science, New Series*, Vol. 193, No. 4253, pp. 599-602.
- Holmquist GP., Gray M., Porter T., Jordan J. (1982) Characterization of Giemsa dark- and light-band DNA. *Cell*, vol31, issue 1, pp. 121-129.
- Islam MQ., Levan G. (1987) A new fixation procedure for improved quality G-bands in routine cytogenetic work. *Hereditas*, vol 107, pp. 127-130.
- Kasahara, S. (2009) Introdução à pesquisa em citogenética de vertebrados. Ed. Sociedade Brasileira de Genética. 1^aed. 160 pp.
- Komura JI., Mitani H., Shima A. (1988) Fish cell culture: Establishment of two fibroblast-like cell lines (OL-17 and OL-32) from fins of the Medaka, *Oryzias latipes*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, Vol. 24, No. 4, pp. 294-298.
- Krasikova A.V., Vasilevskaya E.V., Gaginskaya E.R. (2010). Chicken Lampbrush Chromosomes: Transcription of Tandemly Repetitive DNA Sequences. *Russian Journal of Genetics*, 2010, Vol. 46, No. 10, pp. 1173–1177.

- Lagercrantz U. (1998) Comparative Mapping Between *Arabidopsis thaliana* and *Brassica nigra* Indicates That *Brassica* Genomes Have Evolved Through Extensive Genome Replication Accompanied by Chromosome Fusions and Frequent Rearrangements. *Genetics* 150: 1217–1228.
- Lee BY., Coutanceau JP., Ozouf-Costaz C., D’Cotta H., Baroiller JF., Kocher TD. (2010) Genetic and Physical Mapping of Sex-Linked AFLP Markers in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Mar Biotechnol* DOI 10.1007/s10126-010-9326-7.
- Martins C., Ferreira IA., Oliveira C., Foresti F., Galetti Jr. PM. (2006) A tandemly repetitive centromeric DNA sequence of the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) is derived from 5S rDNA. *Genetica* 127:133–141.
- Meznar ER., Gadau J., Koeniger N., Rueppell O. (2010). Comparative Linkage Mapping Suggests a High Recombination Rate in All Honeybees. *Journal of Heredity*, 101 (suppl 1): S118-S126.
- Nirchio M., Oliveira C. (2006) Citogenética de Peces. Livro. Ed. Cordinación de Publicaciones del Rectorado de la Universidad de Oriente, 212 páginas.
- Noletto RB., Vicari MR., Cipriano RR., Artoni RF., Cestari MM. (2007) Physical mapping of 5S and 45S rDNA loci in pufferfishes (Tetraodontiformes). *Genetica* 130:133–138.
- Ronne M. (1987) Chromosome preparation and high resolution banding techniques. A review *in*: Symposium: cytogenetics and cell biology. *Journal Dairy Science*. Vol. 72, pp. 1363-1377.
- Paterson AH., Bowers JE, Burow MD., Draye X., Elsik CG., Jiang CX., Katsar CS., Lan TH., Lin YR., Ming R., Wright RJ. (2000) Comparative Genomics of Plant Chromosomes. *The Plant Cell*, Vol. 12, 1523–153.
- Seabright M. (1971) A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* 2:971-2.
- Teruel M., Cabrero J., Perfectti F., Camacho JPM. (2010) B chromosome ancestry revealed by histone genes in the migratory locust. *Chromosoma* 119:217–225.
- Zhang Q., Cooper RK., Wolters WR., Tiersch TR. (1998) Isolation, culture and characterization of a primary fibroblast cell line from channel catfish. *Cytotechnology* 26: 83–90.

Capítulo 3 - Bandamento G em Cromossomos de Peixes

Resumo

Se um primeiro marco na história evolutiva dos estudos em citogenética foi proporcionado por Karl Wilhelm von Nägeli in 1842, com a observação dos cromossomos em plantas, a década de 70 pode ser considerada como um segundo marco, em época recente, pelo surgimento de técnicas importantes de bandamento cromossômico, identificando novas ferramentas de estudo como a técnica Q (quinacrina) proposta por Carsperson et al (1970), o bandamento G (tripsina) formulado por Seabright (1971) e o bandamento C (hidróxido de bário) por Sumner (1972). A aplicação desta metodologia permitiu inicialmente identificar com maior precisão os pares de cromossomos homólogos, cromossomos relacionados às ploidias e aneuploidias, rearranjos cromossômicos como translocação, inversão, deleção, inserção, duplicação, fusão, fissão e, mais recentemente, com auxílio de sondas de DNA, a transposição de segmentos entre os cromossomos, antes identificada apenas pelo tamanho e forma dos cromossomos (fórmula cariotípica). Nos estudos de citogenética animal foi possível utilizar os bandamentos para identificar espécies e entender os eventos de rearranjos cromossômicos envolvidos na história evolutiva destes organismos, sendo o bandamento C a técnica estabelecida para o grupo de peixes (Nirchio e Oliveira, 2006). No presente trabalho são apresentados dados sobre a aplicação da técnica de bandamento G em cromossomos de peixes ósseos Neotropicals, que resultaram na visualização de 112 bandas cromossômicas em *Serrapinnus notomelas*, até 223 bandas em *Eigeimmania virescens*. Considera-se, pois, que esta metodologia, quando realizada considerando-se as particularidades de cada espécie, pode resultar em padrões adequados de bandamento em cromossomos de peixes, permitindo a identificação

de regiões específicas dos braços cromossômicos e um pareamento mais preciso dos homólogos, além de possibilitar a identificação de rearranjos cromossômicos também em peixes.

Introdução

Bandamento cromossômico

As análises citogenéticas passaram a ter expressiva importância a partir da década de 70 com os trabalhos de Carperson (1970) e Seabright (1971), possibilitando acessar a micro estrutura dos cromossomos. Dessa forma, foi possível realizar a identificação cromossômica das alterações estruturais em cromossomos humanos e mais tarde com outros grupos de vertebrados. Em 1972, Sumner descreveu a técnica de bandamento centromérico, podendo ser considerada hoje, ponto chave para a análise citogenética de peixes e para os mais diversos estudos cromossômicos em heterocromatina. A técnica de bandamento C revela regiões de heterocromatina constitutiva e seus polimorfismos, como demonstrado por Sumner (2003) para os cromossomos humanos 1, 9 e 16. Kasahara (2009) descreve que além da técnica de bandamento C, regiões heterocromáticas podem ser identificadas por outras técnicas como fluorocromos base-específicos, incorporação por análogos de bases como 5-bromodeoxiuridina e por sondas de DNA, pela técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH), sendo o bandamento C o mais utilizado devido à aplicabilidade, simplicidade da técnica e baixo custo. A técnica de bandamento C é fundamental à citogenética clássica animal e quando aplicada nos cromossomos de peixes pode revelar marcações em posição centromérica, telomérica, intersticial; pode estar associada às regiões organizadoras de nucléolo; auxilia ainda na identificação de cromossomos extras (cromossomos B), cromossomos sexuais e em alguns casos, na

identificação de espécies e possíveis híbridos (Almeida-Toledo et al, 1987, Sumner, 2003, Venere et al, 2004, Nirchio e Oliveira, 2006, Alves et al, 2010).

Organização Cromossômica em Vertebrados

O estudo da estrutura e organização cromossômica em vertebrados teve seu início mesmo antes do conhecimento da forma e comportamento dos cromossomos metafásicos, com análises do comportamento mitótico e meiótico realizado pelo zoólogo Alemão Anton Schneider em 1873 (Sumner, 2003). Desde então as discussões quanto ao comportamento cromossômico e sua composição são temas recorrentes e complexos. Supondo que *Homo sapiens* seja o organismo mais derivado evolutivamente, pressupõe-se que seu genoma, em toda a sua forma, também seja o mais derivado (Darwin, 1859). Assim, temos hoje como modelo e parâmetro as teorias, hipóteses e técnicas aplicáveis para os demais vertebrados previamente postulados para os estudos de genoma humano. O bandamento G proposto por Seabright (1971) tornou-se técnica indispensável em análises clínicas cromossômicas para humanos, podendo ser aplicadas outras técnicas apenas para solucionar problemas específicos decorrentes de análises prévias por bandamento G.

O desenvolvimento dos estudos citogenéticos normalmente surge com resultado de análises em cromossomos humanos. Segundo Verma e Babu (1995), podem ser aplicadas cerca de dez tipos de técnicas clássicas (banda C, R, G, T, N e variantes destas) para bandamento em cromossomos humanos e cerca de onze para bandamento fluorescente (DAPI, DIPI, Hoechst, Cromomicina, Quinacrina, Olivomicina, Brometo de Etídio, dentre outros), com combinação de cinco ligantes não fluorescentes (Mitramicina, Distamicina, Actinomicina, Methyl green, Malachite green), seis tipos de enzima de restrição (AluI, DdeI, HaeIII, MboI, RsaI) e incontáveis sondas de DNA para a aplicação da técnica de FISH. Com esta gama de possibilidades de bandamento cromossômico ou identificação por

sondas de DNA, vários pesquisadores vêm tentando aplicá-las a outros grupos animais e plantas, com o intuito de conhecer melhor a organização cromossômica destes organismos (Sight, 1993, Verma e Babu, 1995).

Poucos trabalhos relatam a utilização de bandas G em cromossomos de peixes (Gold et al, 1990; Bertollo e Mestriner, 1998; Bertollo et al, 1997; Medrano et al, 1998, Maistro et al, 1999; Wang et al, 2004; Zhuang et al, 2006; Swarça et al, 2006; Portela-Castro et al, 2008), quase sempre ressaltando a dificuldade de se conseguir repetições do padrão de bandas G obtidas. Esta dificuldade foi inicialmente relatada por Medrano et al (1988) que discutem a inviabilidade da obtenção de bandas G para o grupo dos peixes. A dificuldade de obtenção de banda G em peixes poderia estar associada à organização genômica, onde tem sido postulado que o conteúdo GC em vertebrados de sangue-frio (répteis, anfíbio e peixes) seria mais disperso, quando comparado a vertebrados de sangue-quente (aves e mamíferos), não possibilitando a formação de isocores (Hudson et al, 1980, Bernardi, 1993, Jabbari et al, 2003, Bucciarelli et al, 2002, Jabbari e Bernardi, 2004, Duret et al, 2006, Federico et al, 2006, Constantini et al, 2007).

Compartimentalização genômica é definida como o conteúdo de bases GC e sua distribuição ao longo dos cromossomos, podendo formar *clusters* bem definidos possibilitando a visualização de segmentos cromossômicos por bandamento G e R, segundo Medrano et al (1980). Bernardi (2005) descreve que o genoma humano se divide em compartimentos ricos em bases GC (H1, H2, H3) e GC pobres (L1, L2), com distribuição de 1:2 respectivamente, sugerindo que estas regiões estariam envolvidas com a localização das bandas R e G, 1:1 respectivamente. Bernardi (2005) descreveu as razões justificativas para tal hipótese: (i) bandas G corresponderiam a regiões AT ricas, sendo identificadas como bandas de replicação tardia e bandas R (bandas de replicação inicial), corresponderiam a regiões GC ricas; (ii) banda G seria visualizada em vertebrados de

sangue quente, mas não em vertebrados de sangue frio, sendo uma característica correspondente à alta e baixa heterogeneidade da composição de conteúdo GC, respectivamente; (iii) os padrões de bandamento G seriam conservados nas aves e mamíferos, como são as quantidades relativas e os níveis dos principais componentes GC do DNA dessas espécies; (iv) a quantidade de DNA por banda cromossômica, como os altos níveis alcançados por Yunis em 1976, seria compatível com o tamanho do isocore; e (v) a amplificação gênica levaria à formação de regiões homogeneamente coradas, caso os segmentos genômicos fossem menores do que os isocores, como foi o caso.

Outra técnica de bandamento longitudinal para identificação de cromossomos é a incorporação pelo análogo de base (timina) BrdU, aplicada a cromossomos humanos e a outros vertebrados (Jankun et al, 1998; Luo, 1998; Maistro et al, 1999; Maistro et al, 2000; Silva et al, 2006; Salvadori et al, 2003; Daniel-Silva e Almeida-Toledo, 2005; Fugiwara *et al*, 2007; Portela-Castro et al, 2008, Kasahara, 2009), que possibilita a visualização reversa do bandamento G. É realizada em células vivas por meio de cultura ou *in vivo* no organismo a ser estudado (Verma e Babu, 1995, Kasahara, 2009). Para os estudos cromossômicos em vertebrados de sangue-frio, a incorporação por BrdU produz excelentes resultados em nível de identificação de espécies, polimorfismos e eventos de rearranjos cromossômicos, permitindo avaliar processos evolutivos da reorganização cariotípica.

Assumindo que o genoma dos peixes apresenta um padrão disperso quanto ao conteúdo de bases GC, era de se esperar que a mesma dificuldade relatada por alguns autores quanto à obtenção de padrões de bandamento G também acontecesse ao bandamento por BrdU, já que a ação desta molécula ocorre por incorporação como análogos da base timina; porém, esta particularidade não foi relatada em nenhum trabalho.

Segundo Czepulkowski (2001), os bandamentos são possíveis através de digestão enzimática e/ou denaturação, seguido de coloração com corante específico para

proporcionar bandas claras e escuras variando de tonalidade. Estas bandas refletiriam o grau com o qual a cromatina dos cromossomos difere na composição de bases, tempo de replicação, conformação da cromatina e densidade de genes. Todos os bandeamentos cromossômicos podem ser aplicados à maioria dos tecidos, porém a diferente constituição dos tecidos exige algum tipo de adaptação da técnica, desde a preparação cromossômica até a obtenção de bandamentos cromossômicos.

Isocores

Um isocore caracteriza-se como uma extensa região do DNA (maior que 3 KB), com um elevado grau de uniformidade no conteúdo de bases GC e CG (coletivamente GC), que tende a ter mais genes, local com temperaturas de fusão ou desnaturação mais elevadas e de flexibilidade diferente. Em termos gerais, isocores são regiões altamente homogêneas em conteúdo de bases GC, em contraste com a heterogeneidade encontrada no genoma como um todo.

Os estudos referentes à presença e organização dos isocores nos cromossomos de vertebrados iniciaram-se com o emprego da técnica de ultracentrifugação por gradiente de densidade, introduzida por Meselson, Stahl e Vinograd (1957). A técnica é aparentemente simples e consiste basicamente em adicionar uma solução salina de baixo peso molecular ao DNA extraído (de alto peso molecular) e ultracentrifugar até que seja atingido o equilíbrio de centrifugação em densidade de gradiente. No equilíbrio de sedimentação, a molécula de DNA de dupla hélice aparece como um gradiente ao longo do tubo, sendo chamado de flutuação na composição de bases (Li, 2002). Desse modo a ultracentrifugação do material genético em solução salina pode atingir o equilíbrio sobre um padrão de condições, sendo reproduzível (Clay *et al.*, 2006).

O emprego do método de ultracentrifugação tem sido de extrema importância para o entendimento da variação composicional do genoma em vertebrados (Hudson *et al.*, 1980; Bernardi, 1993; Hughes *et al.*, 1999; Perani *et al.*, 2000; Bucciarelli *et al.*, 2002; Clay *et al.*, 2003; Jabbari e Bernardi, 2004; Federico *et al.*, 2006; Fortes *et al.*, 2006b, Clay *et al.*, 2006). Alguns trabalhos reportam a existência de compartimentalização do genoma de vertebrados de sangue-quente com base no fracionamento do genoma total por ultracentrifugação (Bernardi, 1993; Perani *et al.*, 2000; Saccone e Bernardi, 2001; Bernardi, 2001; Belle *et al.*, 2002; Jabbari *et al.*, 2003; Clay *et al.*, 2003; Federico *et al.*, 2005; Costantini *et al.*, 2006). De acordo com a quantidade e composição de bases GC no genoma (mosaico de segmentos > 300 kb) é possível se obter diferentes classes para estas frações, denominadas de classes L1 e L2 as que correspondem respectivamente às menores concentrações de GC do produto fracionado e classes H1, H2 e H3, as classes com maior composição de conteúdo GC (Saccone e Bernardi, 2001; Cohen *et al.*, 2005; Constantini *et al.*, 2006). Tais classes compreendem o estudo da estrutura de isocores ao longo do genoma, podendo apresentar-se dispersa no genoma de vertebrados de sangue frio a altamente compartimentalizada, como no genoma dos vertebrados de sangue quente.

Após o sequenciamento do genoma humano pelo “International Human Genome Consortium” (Human Genome, 2001), os estudos das classes de isocores passaram a ter um interesse considerável. Até então, as classes de isocores eram discutidas de forma mais suposicional, apenas como regiões ricas ou pobres em GC, mais ou menos compartimentalizadas e que estavam diretamente relacionadas à bandamentos cromossômicos dos tipos G, T e Q. Duret *et al.* (2006) e Costantini *et al.* (2006) demonstram que estas classes GC ricas possuem uma relação direta com a quantidade de genes no genoma humano, sendo que as classes H2 e H3 possuem mais da metade do total de genes e representam apenas 15% do genoma total.

Associado aos estudos de isocores está o estudo de regiões repetitivas GC3, ligadas à alteração na composição da terceira base (Duret e Hurst, 2001; Jabbari *et al.*, 2003; Cruveiller *et al.*, 2004, Jabbari and Bernardi, 2004). Fortes *et al.* (2006a) demonstram uma relação muito intrínseca entre GC3 em vertebrados de sangue-frio e as classes de isocores identificadas em vertebrados de sangue-quente e de sangue-frio. Esta alteração na terceira base está ligada à estrutura e composição das classes de isocores apresentadas acima, pois ocorrendo nesta posição uma guanina ou uma citosina em um DNA de alta repetibilidade, o peso molecular na ultracentrifugação será alterado. Acredita-se que esta diferença no peso molecular estaria ligada à quantidade de pontes de hidrogênio entre as bases que compõe a estrutura em dupla hélice do DNA (Sustada, 2001). Assim, a composição de GC3, sua repetibilidade e a distribuição ao longo do genoma influenciam diretamente a densidade de flutuação do DNA ao longo do gradiente do tubo em UCA (Clay *et al.*, 2006).

Isocores e o Genoma de Peixes

Em discussão recente sobre a evolução cariotípica dos peixes Neotropicais e a estrutura de isocores parece persistir o entendimento de que o genoma de peixes seria não compartimentalizado (Oliveira *et al.*, 2000), justificando a não padronização dos bandamentos cromossômico por tripsina. Jabbari e Bernardi (2004) correlacionaram o produto do sequenciamento de *Takifugu rubripes* e *Tetraodon nigroviridis*, peixes presentes em diferentes regiões com até 15°C de diferença na temperatura, às diferenças ambientais. Os padrões de bandas obtidos poderiam ser determinados por diferenças composicionais no conteúdo de bases GC entre as duas espécies. Justificaram esta diferença pela “hipótese da estabilidade termodinâmica”, onde ambientes mais quentes exigiriam uma maior quantidade de conteúdo GC, de modo que a maior quantidade de triplas pontes de

hidrogênio ligando as duas moléculas de DNA permitiria maior estabilidade e manutenção do genoma. Assim, a composição do conteúdo GC estaria diretamente relacionada à presença de isocores em vertebrado, promovendo estabilidade à molécula de DNA na interfase e no processo de condensação da cromatina, possibilitando finalmente a visualização destas regiões por técnicas de bandamentos cromossômicos.

As técnicas utilizadas no bandamento cromossômico em peixes geralmente constituem adaptações de metodologia desenvolvida para vertebrados de sangue-quente (mamíferos). Frequentemente podem produzir excelentes resultados em alguns peixes como nos gêneros *Hoplias* e *Astyanax* (Bertollo *et al.*, 1997; Daniel-Silva e Almeida-Toledo, 2005), embora em outros grupos sejam pouco exploradas, como em Siluriformes, talvez devido ao tamanho diminuto dos cromossomos que caracterizam as espécies.

A partir da implantação de técnicas que possibilitaram marcar moléculas de DNA com elementos radioativos (Pinkel *et al.*, 1986), o processo de identificação cromossômica foi expandido, permitindo a obtenção de marcações específicas em vertebrados de sangue-frio (Federico *et al.*, 2006). Por outro lado, trabalhos recentes demonstram que o genoma de peixes possui quantidade de bases GC abaixo da quantidade de vertebrados de sangue-quente, com menos de 5% em alguns casos (Saccone *et al.*, 1999; Bucciarelli *et al.*, 2002).

Fortes *et al.* (2006a) definiram bandamento cromossômico como sendo “um processo que resulta num padrão de bandas que podem ser encontradas em cromossomos” e relatam ainda que o primeiro trabalho com bandamento cromossômico foi realizado em 1894 (Metzner revisado por Levan, 1946). Trabalhando com compartimentalização do genoma de peixes, Medrano *et al.* (1988) propuseram que a composição do conteúdo GC do genoma poderia ser heterogênea (não compartimentalizada) nos representantes deste grupo, a partir de dados obtidos com bandamentos cromossômicos e ultracentrifugação analítica (UCA) com CsCl, justificando assim a dificuldade de obtenção e padronização do

bandamento cromossômico do tipo G em algumas espécies de peixes (vertebrados de sangue-frio).

A citogenética de peixes tem como base de seus estudos a caracterização do cariótipo segundo medidas obtidas por Levan (1981), porém com nomenclatura particular (cromossomos pareados por tamanho e forma), caracterização de regiões heterocromáticas por bandamento C (Summer, 1972), regiões de organização nucleolar por impregnação pela Prata (Howel e Black, 1980) e, mais recentemente, a utilização de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) por sondas de DNA repetitivo. Contudo, a aplicação destas técnicas ainda não permite um pareamento seguro de todos os cromossomos do complemento. Alguns trabalhos referem-se a ferramentas alternativas para identificação de diferentes espécies ou populações. Nakagawa *et al.* (1998) descreveram diferenças citogenéticas em *Astyanax scabripinnis* em análises associadas a dados morfométricos que permitiram identificar a ocorrência de duas populações distintas no mesmo ambiente. Porém, a análise da estrutura cariotípica de curimatídeos é mais complexa, devido à homogeneidade do número diplóide (54 cromossomos) e dos cariótipos muito semelhantes em forma, tamanho e padrão de bandas-C, demonstrando alta conservação cariotípica (Brassesso *et al.*, 2004).

Trabalhos importantes vêm surgindo com o estudo do padrão de bandas de replicação, utilizando 5-Bromodeoxiuridina (ISCN, 1978). Venere *et al.* (1996) descreveram eventos de rearranjos cromossômicos em curimatídeos utilizando-se da técnica por incorporação de análogos de base (BrdU). Daniel-Silva e Almeida-Toledo (2005) encontraram homeologias entre duas espécies do gênero *Astyanax* em nível cromossômico, indicando uma possível relação de origem cromossômica entre as espécies *Astyanax altiparanae* e *Astyanax schubarti*.

Outros métodos de bandamento utilizando corantes fluorescentes como Cromomicina (CMA₃ – Schmid, 1980) e Distamicina A/Mitramicina (Schmid, 1983),

aparecem como fonte de informação para validação e melhor entendimento de segmentos cromossômicos ricos em GC, geralmente associados a regiões ribossomais. Mais recentemente têm sido intensificados os estudos de regiões de DNA repetitivo com a utilização da técnica de hibridação “in situ” fluorescente (FISH) (Pinkel *et al.*, 1986); contudo, as informações obtidas relacionadas ao estudo de isocores em cromossomos de vertebrados de sangue-frio têm sido ainda restritas.

Materiais e Métodos

Foram coletados exemplares de sete espécies de peixes pertencentes a quatro ordens, de ocorrência comum na região Neotropical, os quais foram mantidos no Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, do Instituto de Biociências – UNESP, para aplicação das técnicas citogenéticas, estruturais e moleculares. As espécies analisadas foram:

Ordem Characiforme: *Serrapinnus* sp, *Astyanax fasciatus*, *Hoplias malabaricus* e *Piaractus mesopotamicus* (provável híbrido)

Ordem Siluriforme: *Pterodoras granunolus*

Ordem Perciforme: *Cichlasoma* sp; *Oreochromis niloticus*

Ordem Gymnotiforme: *Eigeimannia virescens*

A obtenção das preparações cromossômicas foi realizada segundo o protocolo descrito nos Capítulos 1 e 2 do presente trabalho. O bandamento G foi aplicado segundo protocolo estabelecido por Seabright (1971), com adaptações.

As preparações cromossômicas submetidas à digestão enzimática (bandamento G) foram analisadas em microscópio óptico (Olympus BX-61 Digital). Somente para *O. niloticus* as metáfases foram capturadas em microscópio Nikon Eclipse E800 e as

correções de captura e montagem do cariótipo foi utilizado o software BandView –Applied Spectral Imaging.

Os cromossomos obtidos através do bandamento-G foram montados e classificados de acordo com o padrão de bandas cromossômicas obtidas (ISCNDA, 1989). Para montagem dos cariótipos, os pares cromossômicos foram colocados em ordem decrescente de tamanho e a relação de braços de acordo com Nirchio e Oliveira (2006).

Resultados

Para caracterizar os cromossomos homólogos e permitindo pareamento mais preciso, foi necessário adequar à técnica de obtenção de cromossomos mitóticos, possibilitando aumentar a quantidade de metáfases e obter preparações com os cromossomos distendidos e homogêneos no seu grau de condensação (capítulos 1 e 2).

Foi possível obter bandas G nos cromossomos de indivíduos pertencentes a oito espécies de quatro ordens de peixes Neotropicais (Characiformes, Siluriformes, Perciformes e Gymnotiformes). A Figura 1 apresenta os maiores cromossomos de cada espécie. As Figuras 2 e 3 representam cariótipos de preparações submetidas ao bandamento G. Como controle para a qualidade das imagens, foram capturadas metáfases de cromossomos humanos (Figura 1), sendo mostrado em destaque o cromossomo humano. Descrição do padrão de bandas segundo ISCNDA, 1989.

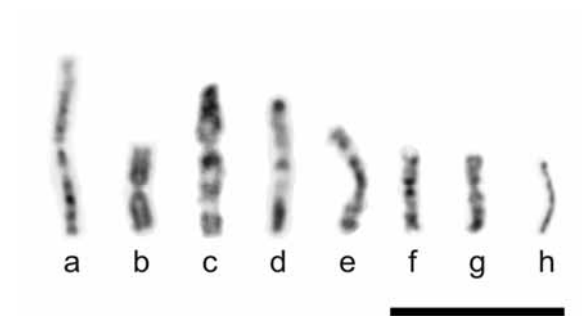


Figura 1- Representação dos cromossomos de maior tamanho para diferentes espécies por bandamento G. Em “a” e “b”, cromossomo humano; c) *Serrapinnus* sp; d) *Astyanax fasciatus*; e) *Hoplias malabaricus*; f) *Piaractus mesopotamicus*; g) *Pterodoras granunolus*; h) *Cichlasoma* sp. A barra indica escala de 5 μ m.

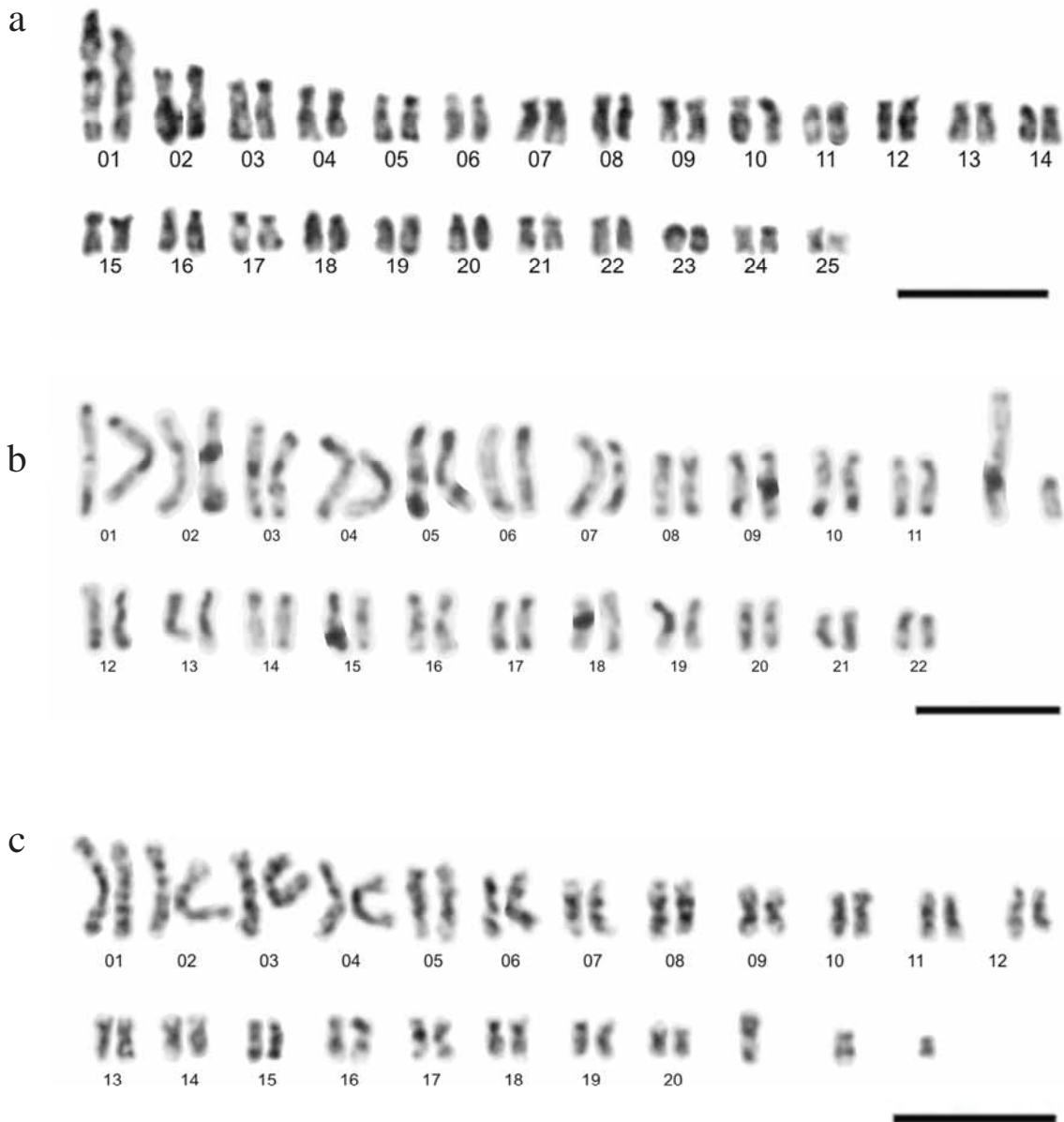


Figura 2 – Cariótipos G bandados de espécies pertencentes à Ordem Characiformes – a) *Serrapinnus* sp; b) *Astyanax fasciatus*; c) *Hoplias malabaricus* . A barra indica escala de 5 μm. Obs. Em “a” bandamento G obtido de material com mais de seis meses em fixador, armazenados em eppendorf a -5 °C, os demais cariótipos foram obtidos de materiais recém preparados.

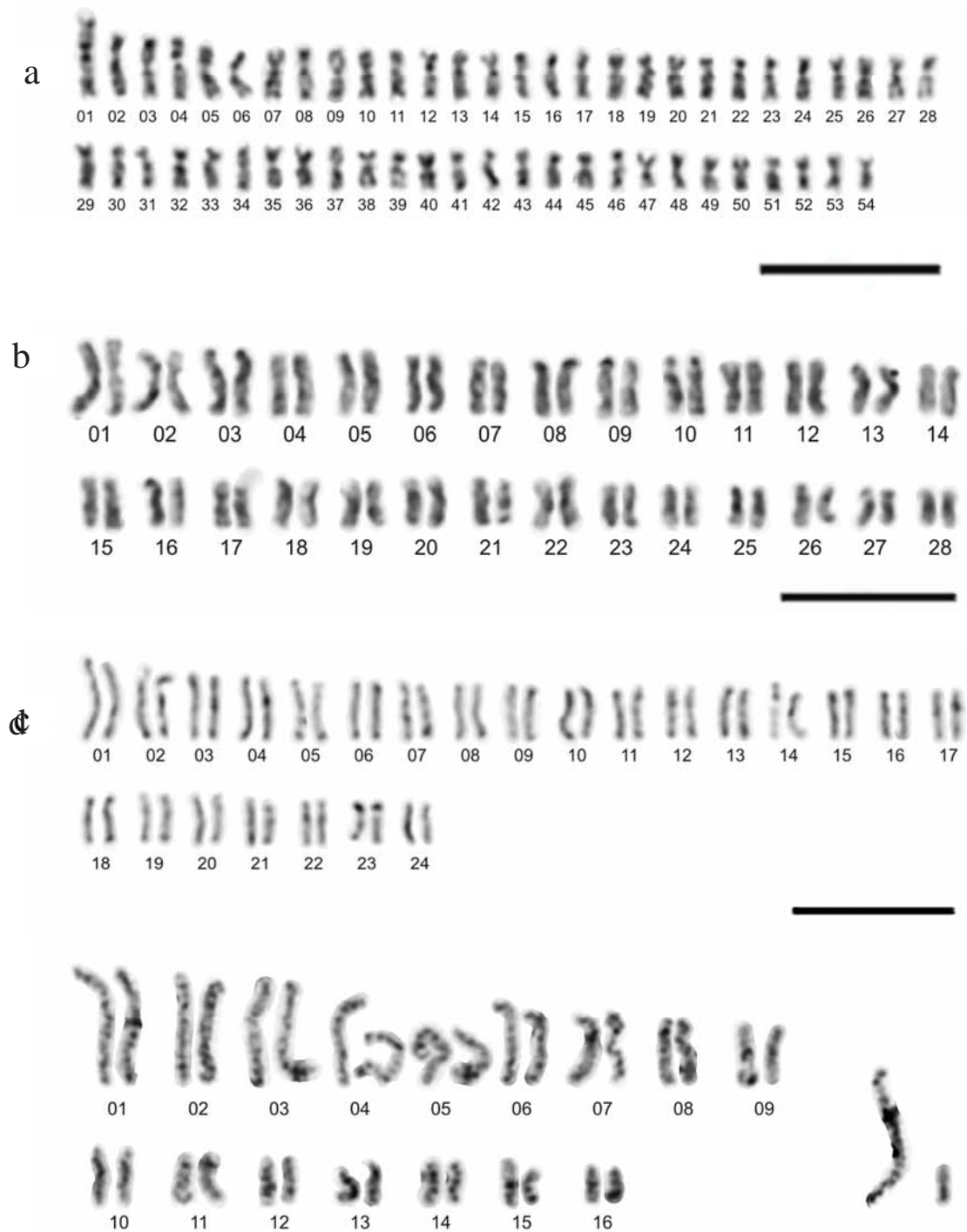


Figura 3 – Cariótipos G bandados de: a) Ordem Characiformes - *Piaractus mesopotamicus*, sendo um provável híbrido; b) Siluriforme – *Pterodoras granulosus*; c) Cichlidae – *Cichlasoma* sp; d) Gymnotiforme – *Eigeimannia virescens*. A barra indica escala de 5 μ m. Obs. Em “b” bandamento G obtido de material com mais de seis meses em fixador, armazenados em eppendorf a -5 °C, os demais cariótipos foram obtidos de materiais recém preparados.

Para *O. niloticus* As bandas G obtidas nos diferentes exemplares foram observadas a partir do menor grau de compactação até o mais resolutivo possível, constando de até 104 bandas cromossômicas para os cromossomos 2 a 21 e 50 bandas cromossômicas para os cromossomos pertencentes ao par 1 heteromórfico, totalizando 154 bandas (Figura 4).

Quando analisados os cromossomos do primeiro par individualmente em diferentes graus de compactação puderam ser observados, com a diminuição gradativa na quantidade das bandas cromossômicas para o par 1, onde estes cromossomos apresentaram o mínimo de 29 bandas. O heteromorfismo de tamanho observado para o par 1 corrobora com o sistema sexual cromossômico do tipo XY proposto por análise meiótica (Foresti et al, 1993, Griffin et al, 2002, Campos-Ramos et al, 2009), quando comparado ao obtido no presente trabalho por digestão enzimática por tripsina (Figura 4).

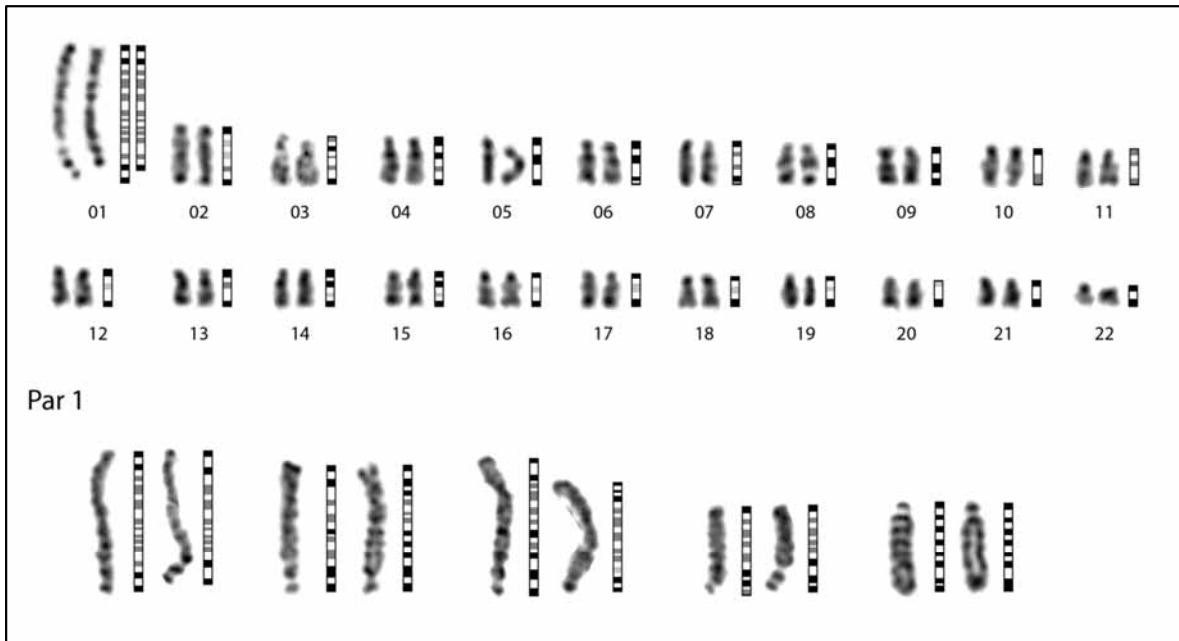


Figura 4 – Cariótipo por banda G de Tilápia linhagem chitralada (*Oreochromis niloticus*), com representação em ideograma dos cromossomos. Em destaque par 1 de cromossomos de diferentes metáfases, evidenciando o grau de compactação e a consequente diminuição da quantidade de bandas visualizadas.

Discussão

Aspectos referentes à compartimentalização genômica têm sido relacionados na tentativa de explicar as dificuldades para a obtenção de banda G em animais de sangue-frio. Pesquisas recentes indicam que o conteúdo de bases GC no genoma estaria diretamente relacionado a esta compartimentalização, de forma que maior porcentagem de conteúdo GC significaria regiões menos dispersas no genoma. No bandamento G as bandas cromossômicas escuras estariam relacionadas à menor porcentagem de conteúdo GC e maior concentração de conteúdo AT e as bandas claras relacionadas à maior porcentagem de conteúdo GC (Medrano et al, 1988, Bernardi, 2005).

Correlacionado a este conceito, mais recentemente foi proposta a “hipótese da estabilidade termodinâmica” por Jabbari e Bernardi (2004), sendo que, as principais razões para justificá-la estariam relacionadas (i) a grande diversidade entre os vertebrados onde estes seriam um táxon menor quando comparados aos invertebrados, porém com a maior parte das propriedades genômica e genéticas, (ii) outro fator seria a temperatura do corpo, com a marcante diferença entre vertebrados de sangue frio e vertebrados de sangue quente, endotérmicos e ectotérmicos ou pecilotérmicos, respectivamente (iii) para vertebrados de sangue quente as sequências codificantes e não-codificantes envolveram grandes mudanças durante o processo evolutivo em composição e estrutura, diferentemente dos vertebrados de sangue frio que apresentam o genoma mais homogêneo.

Segundo a hipótese de estabilidade termodinâmica, vertebrados de sangue frio, que vivem em regiões com altas temperaturas, deveriam ter composição diferente dos viventes em região mais frias (Bernardi, 2005). A aplicação desta hipótese aos peixes Neotropicais pressupõe que deveria haver um aumento na quantidade de conteúdo GC, possibilitando talvez a formação de cores nestes genomas (Varriale *et al*, 2008 e Federico *et al*, 2006).

Assim, a proposta teria por base a interpretação de que o conteúdo GC se organizaria de forma diferenciada em animais de sangue-quente (endotérmicos), com temperatura corporal mais estável e controlada, com pouca ou nenhuma variação em condições normais, quando comparados aos animais de sangue-frio que são ectotérmicos, influenciados por variações da temperatura externa, como répteis, anfíbios e peixes.

Segundo Bernardi (2005), estas alterações são mais significativas em répteis, pois podem viver em locais onde o ambiente atinge altas temperaturas. Nesse sentido, animais homeotérmicos teriam desenvolvido sistemas que resultaram em evolução no sentido de um genoma mais compartimentalizado, afim de que as regiões GC ricas não codificantes funcionassem como protetores de regiões codificantes, não permitindo constantes rearranjos cromossômicos. Isso poderia explicar a vasta possibilidade de alterações cromossômicas em peixes (numéricas e não-numéricas), presença de cromossomos Bs, deleções, ploidias e aneuploidias, dentre outras (Nirchio e Oliveira, 2005).

Bandamento G

A partir do trabalho de Caspersson *et al* (1968 e 1970) e Seabright (1972), utilizando o fluorocromo Quinacrina mostarda e tripsina, respectivamente, foi permitido verificar o padrão de bandas mais resolutivas em cromossomos humanos e, conseqüentemente, realizar a identificação precisa dos cromossomos homólogos e suas alterações. No presente trabalho apresentamos padrões de bandamento G para sete espécies de peixes da região Neotropical, representantes de quatro ordens (Siluriformes, Characiformes, Perciformes e Gymnotiformes).

Foi possível observar que a obtenção de bandamento G de boa qualidade necessita de extremo rigor em alguns passos como: (i) preparação cromossômica direta – o material obtido permite melhor qualidade no bandamento quando realizados os procedimentos a

seguir, imediatamente após a obtenção dos cromossomos mitóticos; (ii) armazenamento do material obtido – após a obtenção cromossômica o material foi diluído em metanol e mantido em freezer, preservando a estrutura do DNA, visto que o ácido acético degrada proteínas histônicas e não histônicas (Holmquist, 1978); (iii) preparação das lâminas - previamente limpas com detergente neutro e bucha macia, sempre esfregando num único sentido, lavadas com água destilada e mantida em etanol 95%, retiradas da solução e secas ao ar. As lâminas secas eram colocadas sobre um suporte dentro de um banho-maria a 55^oC, próximas à água, mas sem tocá-la, permitindo que o vapor formasse uma fina camada sobre a lâmina. O material era então pingado num ângulo de aproximadamente 45^o. Após alguns segundos, quando o material já se espalhara bem sobre a lâmina, esta era retirada do banho-maria e o excesso de água era removido com papel absorvente, deixada secar ao ar e mantida por sete dias à temperatura ambiente, antes de ser usadas para análise. (iv) tempo de envelhecimento do material em lâmina – para o material recém-preparado, recomenda-se deixar secar ao ar livre. Testes devem ser realizados, pois o envelhecimento depende de temperatura e humidade, o que pode variar em diferentes regiões; (vi) soluções – devem ser preparadas sempre novas, pois alterações de pH, salinidade e envelhecimento da tripsina podem não resultar no bandamento adequado.

No presente trabalho foram obtidos padrões de bandamento G nas oito espécies de peixes analisadas, demonstrando a viabilidade deste bandamento, bem como o controle da qualidade quando comparadas diferentes condições de armazenamento das preparações citogenéticas (Figuras 2 e 3). A quantidade de bandas cromossômicas está diretamente relacionada ao tamanho do cromossomo e seu grau de condensação, por se tratar de cromossomos menores e mais estreitos que os cromossomos humanos (Figura 1).

Embora tenha sido frequentemente ressaltada a dificuldade em se obter e repetir o padrão de bandamento G em peixes, relatos esparsos revelam preparações que

apresentaram resultados interessantes (Medrano et al, 1988, Bertollo et al, 1997, Portela-Castro et al, 2008). Os resultados do presente trabalho confirmam que realmente existe maior dificuldade em se obter bandamento G em cromossomos de peixes; porém, quando estabelecidas às condições adequadas no protocolo da técnica, há a possibilidade de repetição do padrão de bandas e este parece ser dependente direto do grau de condensação dos cromossomos nas metáfases analisadas. A existência de sub-bandas em diferentes graus de compactação é descrita também em peixes (capítulo 4), do mesmo modo que para cromossomos humanos (ISCN, 2005).

Segundo alguns autores, a falta de uma espécie modelo de estudo, como ocorre para aves com *Gallus gallus domesticus* (Krasikova et al, 2010), poderia dificultar a obtenção de bons resultados de bandamento G em peixes, uma vez que é extremamente necessária a padronização de protocolos de obtenção de cromossomos mitóticos e de aplicação da técnica (Barch et al, 1997). Neste caso, a grande quantidade de espécie de peixes existentes poderia fornecer elementos positivos para a escolha da espécie ou de espécies apropriadas para a padronização dos procedimentos de obtenção, preparo da suspensão de células e aplicação de diferentes técnicas.

O mecanismo que leva à formação de bandamento G é ainda desconhecido; porém, muitos trabalhos reportam que diferentes técnicas podem resultar em bandamento G, como a utilização de soluções salinas quentes, tratamentos enzimáticos e incorporação de análogos de bases (Kasahara, 2009), entre outras. Holmquist (1976) relata a que as polisinas, poliargininas e histonas H1, H2A, H2B e H3 inibiriam a coloração por Giemsa e bandamento cromossômico por ligação com o DNA e prevenir o empilhamento das cargas positivas do corante tiazina, por meio das cargas negativas do grupo fosfato no DNA. Contudo, este efeito é inespecífico e não dá evidências do papel das histonas.

Aplicação de Bandamento G em Oreochromis niloticus (tilápia)

Os estudos dos cromossomos sexuais em peixes são numerosos, visto a grande variabilidade de possíveis sistemas determinados por machos (XY) ou fêmeas (ZW), e as várias combinações quando detectado sistema múltiplo sexual (Nirchio e Oliveira, 2006, Kasahara, 2009). Vários estudos citogenéticos têm sido realizados para tilápia com diferentes aplicações técnicas, sendo que um importante objetivo ainda é de identificar possíveis cromossomos sexuais e genes que possam estar envolvidos (Carrasco et al, 1999, Griffin et al, 2002, El-Sayed, 2006, El-Sayed, 2006, Sofy et al, 2008, Campos-Ramos, 2009).

Utilizando complexo sinaptonêmico em gônadas de machos de *O. niloticus*, Foresti et al (1993) observaram uma porção terminal do braço longo para o par 1 em machos, sem pareamento meiótico em paquíteno, sugerindo a existência de sistema de cromossomos sexuais do tipo XY. Outros trabalhos também relatam o não pareamento desta mesma região terminal no início da fase de paquíteno em cromossomos bivalentes obtidos por meiose de *O. niloticus*, para o par 1 cromossômico (Campos-Ramos et al, 2009, Ocalewicz et al, 2009).

O presente trabalho com aplicação de bandamento G demonstra que na região terminal do primeiro par há diferença estrutural, com a visualização de duas bandas a mais (Figura 4 e 5). Diferença estrutural para esta região em particular foi observada também por Ocalewicz et al (2009), por DAPI em cromossomos mitóticos e meióticos (bivalentes em início de paquíteno), clones de *Dmo (dmrt4)* e *OniY227* em BACs, onde possibilitou a identificação de sistema de cromossomos sexuais do tipo XY. O bandamento G no presente trabalho auxiliou no pareamento mais preciso dos cromossomos homólogos, além de identificar o heteromorfismo e ampliar a discussão sob compartimentatilação cromossômica.

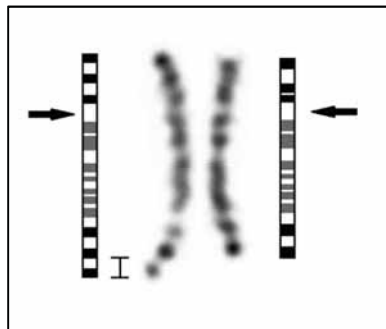


Figura 5 – Representação esquemática do par 1. Setas indicam centrômero e em destaque região heteromórfica do possível cromossomo Y em macho de tilápia (*O. niloticus*).

Aliado a aplicação cromossômica, o presente trabalho trás também a obtenção dos cromossomos metafásicos sem a necessidade de sacrifício dos exemplares, permitindo manejo destes, a partir de 10 cm de tamanho, pela obtenção de cromossomos mitóticos por cultura de sangue periférico.

Com a possibilidade de identificação mais precisa dos cromossomos homólogos e do par heteromórfico ligado ao sexo para *O. niloticus*, as aplicações citogenéticas para o manejo em piscicultura desta espécie possibilitará a identificação de alterações cromossômicas ligadas ou não ao sexo, com controle prévio dos parentais para reprodução. Possibilitará também o entendimento de eventos evolutivos de rearranjos cromossômicos, bem como mapear regiões de interesse nos cromossomos. Amplia a viabilidade para aplicação das técnicas apresentadas neste trabalho a outras espécies deste grupo de peixes, auxiliando no entendimento dos eventos cromossômicos e seus processos evolutivos.

Diante dos resultados de bandamento G obtidos em diferentes espécies de peixes no presente trabalho e as figuras metafásicas apresentadas por Gold e Li (1990), com cromossomos apresentando distinto bandamento G em ciprinídeos, a possibilidade de bandamento G em peixes parece ser mais uma questão metodológica do que inerente à estrutura dos cromossomos podendo, então, também ocorrer em genomas que apresentam composição de bases do DNA mais homogênea. Assim o presente trabalho resgata um questionamento feito por Gold e Li (1990): “Nossa habilidade em obter bandas G em cromossomos de ciprinídeos usando tripsina levanta uma questão sobre a hipótese de Medrano et al (1988), onde bandas cromossômicas G ou R estariam relacionadas à compartimentalização genômica”.

Referências

- Almeida-Toledo, L.F., Foresti, F. and Toledo-Filho, S.A. (2000) Karyotypic evolution in Neotropical freshwater fish – *Chromosoma Today* – vol. 13: 169-182.
- Amemiya, C.T. and Gold, J.R. (1986). Chromomycin A3 stains nucleolus organizer regions of fish chromosomes. *Copeia* 1986: 226-231.
- Barch M.J. (Editor), Knutsen T. (Editor), Spurbeck J. (Editor). (1997) *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. Softcover, Spiral Bound 688 pages.
- Belle, E., Smith, N. and Eyre-Walker, A. (2002) Analysis of the phylogenetic distribution of isochores in vertebrates and a test of the thermal stability hypothesis. *Journal of Molecular Evolution* 55:356–363.
- Bernardi, G. (1993). The vertebrate genome: isochores and evolution. *Molecular Biology Evolution* 10:186.
- Bernardi, G. (2005) *Structural and Evolutionary Genomics: Natural Selection in Genome Evolution*. First edition Elsevier, pp441.
- Bernardi, G. 2001. Misunderstandings about isochores. Part I. *Gene* 276: 3–13.
- Bertollo, A.C., Fontes, M.S., Fenochio, A. S. and Cano, J. (1997) The X₁X₂Y sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus*. I. G-, C- and chromosome replication banding. *Chromosome Research* – 5:493-499.
- Bertollo LAC, Mestriner CA (1998). The X₁X₂Y sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae). II. Meiotic analyses. *Chromosome Research* 6: 141–147.
- Bertollo, L.A.C., Takahashi, C.S. and Moreira-Filho, O. (1978). Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Braz. J. Genet.* 1: 103-120.
- Brassesco, M.S., Pastori, M.C., Roncati, H.A. and Fenocchio, A.S (2004) Comparative cytogenetic studies of Curimatidae (Pisces, Characiformes) from the middle Paraná River (Argentina). *Genetics And Molecular Research* – 2:293-301.
- Bucciarelli, G., Bernardi, G. and Bernardi G (2002) An ultracentrifugation analysis of two hundred fishes genomes. *Gene* 295:153–162.

- Campos-Ramos R., Harvey S.C., Penman D. J. (2009) Sex-specific differences in the synaptonemal complex in the genus *Oreochromis* (Cichlidae). *Genetica* (2009) 135:325–332.
- Carvalho, R. A. and Dias, A.L. (2005) Karyotypic characterization of *Iheringichthys labrosus* (Pisces, Pimelodidae): C-, G- and restriction endonuclease banding. *Genetics And Molecular Research* – 4: 663-667.
- Caspersson T., Zech L., Johansson C. (1971) Analysis of Human Metaphase Chromosome Set by Aid of DNA-Binding Fluorescent Agents. *Experimental Cell Research* 253, 302–304.
- Cestari, A. N. (1973) Métodos de estudo dos cromossomos de vertebrados. IN: Azevedo, T.L. de e Costas, S.O.P. da org. *Exercícios Práticos de Genética*, 29-31. Companhia Editora Nacional – Editora da Universidade de São Paulo, SP.
- Clay, O., Carels, N., Douany, C.J. and Bernardi, G. (2006) Density Gradient Ultracentrifugation and Whole Genome Sequences: Fine-tuning the correspondence. *Progr. Colloid. Polym Sci.* 131: 97-107.
- Clay, O., Douany, C.J., Hughes, S., Bucciarelli, G. and Bernardi, G. (2003) Using analytical ultracentrifugation to study compositional variation in vertebrate genomes. *Eur Biophys J* – 32: 418-426.
- Cohen, N., T. Dagan, L. Stone, and D. Graur. 2005. GC composition of the human genome: in search of isochors. *Mol. Biol. Evol.* 22:1260–1272.
- Constantini, M., Clay, O., Auletta, F. and Bernardi, G. (2006) An Isochore map of human chromosomes. *Genome Research* – 16: 536-541.
- Cruveiller, S., Jabbari, K., Clay, O., and Bernardi, G. 2003. Compositional features of vertebrate genomes for checking predicted genes. *Brief. Bioinform.* 4: 43–52.
- Daniel-Silva and Almeida-Toledo (2005) Chromosome evolution in fish: BrdU replication patterns demonstrate chromosome homeologies in two species of the genus *Astyanax*. *Cytogenic and Genome Research.* 109:497-501.
- Darwin, C. (1859) *On the Origin of Species*. Murray, London.
- Duret, L., and Hurst, L.D. (2001) The elevated G and C content at exonic third sites is not evidence against neutralist models of isochore evolution. *Mol. Biol. Evol.*, 18, 757±762.

Duret. L., Eyre-Walker, A. and Galtier, N. (2006) A new perspective on isochore evolution. *Gene*.

Egozcue, J (1971). Técnicas em Citogenética. Editorial Espaxs, *Barcelona*, pp. 144.

El-Sayed A.-F.M. (2006). The Tilapia Culture in Saltwater: environmental requirements nutritional implications and economic potenciales *in* Avances en nutrición acuícola VIII. Simposium Internacional Nutrición Acuícola.

(a) El-Sayed A.-F.M. (2006). The Tilapia Culture. Edited by CABI Publishing. Pp 277.

Federico, C., Cantarella, C. D., Scavo, C., Saccone, S., Bed'Hom, B. and Bernerdi, G. (2005) Avian genomes: different karyotypes but a similar distribution of the GC-richest chromosome regions at interphase. *Chromosome Research* – 13:785-793.

Federico, C., Scavo, C., Cantarella, C.D., Motta, S., Saccone, S. and Bernardi, G. (2006) Gene-rich and gene-poor chromosomal regions have different locations in the interphase nuclei of cold-blooded vertebrates. *Chromossoma* – 115: 123-128.

Foresti F, Almeida-Toledo LF and Toledo SA (1981) – Polymorphic nature of nucleolus organizer regions in fishes. *Cytogen. Cell Genet.* 31: 137-144.

Foresti, F., Oliveira, C. and Almeida-Toledo, L. F. (1993) A method for chromosome preparations from large fish specimens using in vitro short-term treatment with colchicines. *Cellular and Molecular Life Sciences* – 49: 810-813.

(a) Foresti, F., Oliveira, C., Galetti, P.M. and Almeida-Toledo, L.F. (1993) Synaptonemal complex analysis in spermatocytes of tilapia *Oreochromis niloticus* (Pisces, Cichlidae). *Genome* 36, pp. 1124–1128.

(a) Fortes, G. G., Bouza, C., Viñas, A., Martinez, P. and Sanches, L. (2006) Fish Cytogenetics: Diversity in Isochore Structure and Chromosome Banding *in*: Fish Cytogenetics– Science Publishers – p. 405-420.

(b) Fortes, G.G., Bouza, C., Martinez, P. and Sanches, L. (2006) Diversity in isochore structure among cold-blooded vertebrates based on GC content of coding and non-coding sequences. *Genetica*. Volume 129, Number 3, 281-289.

Gold JR, Li YC, Shipley NS, Powers PK (1990) Improved methods for working with Fish chromosomes with a review of metaphase chromosome banding. *J Fish Biol* 37: 563±575.

Griffin D.K., Harvey S.C., Campos-Ramos R., Ayling L-J., Bromage N.R., Masabanda J.S., Penman D.J. (2002) Early origins of the X and Y chromosomes: Lessons from tilapia. *Cytogenet Genome Research*, 99:157-163.

Howell, WM and Black, DA (1980). Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36: 1014-1015.

Hudson, A.P., Cuny, G., Cortadas, J., Haschemeyer, A.E.V. and Bernardi, G., 1980. An analysis of fish genomes by density gradient centrifugation. *Eur. J. Biochem.* 112, 203–210.

Hughes, S., Zelus, D. and Mouchiroud, D. (1999) Warm-Blooded Isochore Structure in Nile Crocodile and Turtle. *Mol. Biol. Evol.* – 11: 1521-1527.

International Human Genome Sequencing Consortium (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409, 860±921.

Jabbari, K. and Bernardi, G. (2004). Body temperature and evolutionary genomics of vertebrates: a lesson from genomes of *Takifugu rubripes* and *Tetraodon nigroviridis*. *Gene* – 333: 179-181.

Jabbari, K., Clay, O. and Bernardi, G., 2003. GC3 heterogeneity and body temperature in vertebrates. *Gene* 317, 161– 163.

Kligerman e Bloom (1976) Sister chromatid differentiation and exchanges in adult mudminnows (*Umbra limi*) after in vivo exposure to 5-bromodeoxyuridine. *Chromosoma* – 56: 101-109.

Krasikova A.V., Vasilevskaya E.V., Gaginskaya E.R. (2010). Chicken Lampbrush Chromosomes: Transcription of Tandemly Repetitive DNA Sequences. *Russian Journal of Genetics*, 2010, Vol. 46, No. 10, pp. 1173–1177.

Levan A, Fredga K and Sandberg AA, (1964). Nomenclature for centromeric position of chromosomes. *Hereditas* 52: 201–220.

Levan, A. (1946) Heterochromaty in chromosome during their contraction phase. *Hereditas* 32: 449-468.

Li, W. 2002. Are isochore sequences homogeneous? *Gene* 300:129–139.

Maistro, E. L., Foresti, F. and Oliveira, C. (1999) R- and G-band patterns in *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characiformes, Characidae). *Genetics and Molecular Biology* - 22:201-204.

- Maistro, E. L., Foresti, F. and Oliveira, C. (2000) Cytogenetic analysis of A- and B-chromosomes of *Prochilodus lineatus* (Teleostei, Prochilodontidae) using different restriction enzyme banding and staining methods. *Genetica* 108: 119–125.
- Mcphail, J.D. and Jones, R.L. (1966) A simple technique for obtaining chromosome from teleost fish. *J. Fish Res. Bd. Canad.* 23:767-769.
- Medrano, L., Bernardi, G., Couturier, J., Dutrillaux, B. and Bernardi, G. (1988) Chromosome banding and genome compartmentalization in fishes. *Chromossoma – 96*: 178-183.
- Meselson M, Stahl F, Vinograd J (1957) Equilibrium sedimentation of macromolecules in density gradients. *Proc Natl Acad Sci USA* 43:581–588.
- Nakagawa Mizoguchi, S.M.H. and Martins-Santos, I.C. (1998) Cytogenetic and morphometric differences in populations of *Astyanax "scabripinnis"* (Pisces, Characidae) from Maringá region, PR, Brazil. *Genetics and Molecular Biology – v21, n.1*.
- Nirchio M., Oliveira C. (2006) *Citogenética de Peces*. Livro. Ed. Cordinación de Publicaciones del Rectorado de la Universidade de Oriente, 212 páginas.
- Ocalewicz K., Mota-Velasco J.C., Campos-Ramos R., Penman D.J. (2009) FISH and DAPI staining of the synaptonemal complex of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) allow orientation of the unpaired region of bivalent 1 observed during early pachytene. *Chromosome Research* 17:773-782.
- Oliveira, C., Wright, J.M. and Foresti, F. (2002) Chromosome structure in fishes. Some Aspects of Chromosome Structure and Fuctions. Narosa Publishing House – Ch 10.
- Perani, P., Caccio, S., Saccone, S., Andreozzi, L. and Bernardi, G. (2000) Telomeres in Warm-Blooded of GC-Rich Isochore. *Biochemical Genetics – 38*: 227-239.
- Pinkel, D., Straume, T. and Gray, J.W. (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, highsensitivity, fluorescence hybridization. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 83, 2934–2938.
- Portela-Castro A.L.B., Julio-Jr, H.F., Martins-Santos I.C., Pavanelli C.S. (2008) Occurrence of two cytotypes in *Bryconamericus aff. Iheringii* (Characidae): karyotype analysis by C- and G-banding and replication bands. *Genetica* 133:113–118.
- Saccone, S. and Bernardi, G. (2001) Human chromosomal banding “in situ” hybridization of isochores – *Methods in Cell Science – 23*: 7-15.

Saccone, S., Federico, C. and Bernardi, G., 2002. Localization of the generichest and the gene-poorest isochores in the interphase nuclei of mammals and birds. *Gene* 300, 169–178.

Schmid M (1980). Chromosome banding in Amphibia. IV. Differentiation of GC- and AT-rich chromosome regions in Anura. *Chromosoma* 77: 83-103.

Seabright M. (1971) A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* 2:971-2.

Silva A.P.Z., Haddad, C.F.B., Galassi G.G., Kasahara, S. (2006) Multiple nucleolus organizer regions in *Leptodactylus mystacinus* (Amphibia, Anura) and comments on its systematic position in the *L. fuscus* group based on cytogenetic and molecular analyses. *Genetica* (2006) 127:35–44.

Snustad, D.P. and Simmons M.J. (2001) *Fundamentos de Genética*. Ed. Guanabara Koogan- Segunda Edição.

Sumner, AT (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell Res.* 75: 304-306.

Swarça AC, Fenocchio AS, Cestari MM, Bertollo LAC, Dias AL (2006) Heteromorphic sex chromosome system with an exceptionally large Y chromosome in a catfish *Steindachneridion* sp. (Pimelodidae). *Cytogenet Genome Res.* Volume 16, Number 6, 815-825.

Verma, RS and Babu, A (1995). *Human Chromosomes: Principles and Techniques*. McGraw-Hill, New York.

Vicente, V.E., Bertollo, L.A.C., Valentini, S.R., and Moreira-Filho, O. (2003) Origin and Differentiation of a Sex Chromosome System in *Parodon hilarii* (Pisces, Parodontidae). Satellite DNA, G- and C-. *Genética* – 119:115-120.

Wang C., Zhang S., Chu J. (2004) G-banding patterns of the chromosomes of amphioxus *Branchiostoma belcheri tsingtauense*. *Hereditas* 141: 2-7

Capítulo 4 - Chromosomal heteromorphism characterization by G-11 and R-HSS bands in *Pterodoras granulosus* (Siluriformes) with discussion about the karyotypic evolution in Doradidae family.

¹ Luiz Ricardo De Souza Paiva, ² Anderson Luís Alves, ² Fausto Foresti, ¹ Horácio Ferreira Júlio Jr. & Paulo Cesar Venere³

¹*Universidade Estadual de Maringá, Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aqüicultura (Nupelia) G-90, Av. Colombo, 5790, 87020-900 – Maringá, PR, Brazil.*

²*Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Departamento de Morfologia, Botucatu, SP, Brazil.*

³*Universidade Federal de Mato Grosso, Instituto Universitário do Araguaia, Laboratório de Ictiologia/GEPEMA, Pontal do Araguaia, MT, Brazil*

Correspondence should be sent to H. F. Julio-Jr. E-mail: juliojr@nupelia.uem.br

Phone (44) 3261-4750 - Fax (44) 3261-4625

RUNNING TITLE: Chromosomal Heteromorphism and Evolution in *Pterodoras granulosus*

Keywords: Fish cytogenetic, chromosomal polymorphism, G-11 and R-HSS bands, karyotypic evolution.

Abstract

Doradidae represents a group of fishes karyotypically stable in terms of diploid and Ag-NORs number. Such relative karyotypic conservatism corroborates the hypothesis of monophyletism for this family. Regardless of being easily sampled, *Pterodoras granulosus*, a common species on the upper Parana River floodplain, exhibit only the diploid number previously described. In this context, 23 specimens with the $2n=58$ chromosomal numbers were analyzed. Despite the stableness of the diploid number, it has been found that all individuals analyzed presented a size heteromorphism for chromosomal pair 14 (sm) and a chromosomal rearrangement involving a pericentric inversion of pair 16 (sm). Ag-NORs are simple and subterminal on the short arm of chromosomal pair 23 (st), and revealed to be GC-rich after CMA₃ staining. The HSS (R-band) and G-11 banding analyses aided in the characterization of size heteromorphism and chromosomal rearrangement, evidencing clear markings between pairs 14 (sm) and 16 (sm), respectively. G-11 banding, usually applied for studies of heterochromatic areas in human chromosomes, used in an excellent technique for the identification of chromosomal heteromorphisms, rearrangements, and pairing in fish, mainly in those groups where there is a great conservation of the karyotypical macrostructure identified by conventional techniques used in fish cytogenetics.

Introduction

The Doradidae family includes 72 species distributed in 30 genera distributed across all large hydrographic basins of the Neotropical region (Sabaj and Ferraris, 2003). Only *Rhynodoras d'orbigny* used to be in the Upper Parana River; but, after the closing of the Itaipu Dam, four other species had colonized this area (Zawadzki, et al, 1996). One of them, *Pterodoras granulosus*, is of great importance for both commercial and sport fishing (Agostinho et al., 1997; Sabaj and Ferraris, 2003).

Cytogenetic studies in Doradidae had started with the study of Fenocchio et al (1993), whereby a diploid number of 58 chromosomes was observed for *Pseudodoras niger* and *Rhynodoras d'orbigny* and $2n=56$ chromosomes for *Trachydoras paraguayensis*. Venere (1998) developed an analysis in four other species, confirming that the chromosomal number of 58 is the same for all of them. This lack of information indicates that this is a group of fish among the Neotropical Siluriformes that has been less evaluated (Oliveira et al., in press). Despite the aforementioned, information available in the literature reveal that this family represents a group that has a conserved karyotypic macrostructure, with $2n=58$ for 10 species, and $2n=56$ for *Trachydoras paraguayensis* (Table 1).

The detection of chromosomal size heteromorphism in fish is very common, mainly those related to Ag-NORs (Foresti et al., 1981; Swarça et al., 2001; Alves et al., 2003). On the other hand, the identification of structural heteromorphisms, such as inversions, using more resolute bands (G and R-bands, for example), is very difficult because of the reduced chromosome size in fish. Almeida-Toledo (1998) discussed the cytogenetic data available for Neotropical fish, using high resolution R- and/or G-bands for the best chromosomal pairing. These results are mainly observed for the fishes of the order

Characiformes, as in *Hoplias malabaricus* (Bertollo et al., 1997) and *Astyanax scabripinnis* (Daniel-Silva and Almeida-Toledo, 2001; Maistro et al., 1999) and in Gymnotiformes, *Eigenmannia virescens* (Almeida-Toledo et al., 1988).

Table 1. A summary of the cytogenetic data available for the family Doradidae. 2n = diploid number; M = metacentric; SM = submetacentric; ST = subtelocentric; A = acrocentric.

Species	Locality	2n	Karyotypic Formulae	Sex Chrom.	Reference
<i>Franciscodoras marmoratus</i>	R São Francisco, Três Marias, Minas Gerais	58	32M,6SM,10ST,10A	--	Garcia et al. (2003)
<i>Wertheimeria maculata</i>	R. Pardo, Minas Gerais	58	--	--	Miranda et al. (2004)
<i>Hassar cf. Orestis</i>	R Jari, Almerim, Pará	58	58M/SM	--	Milhomem et al. (2002)
<i>H. orestis</i>	R. Araguaia, Mato Grosso	58	42M,14SM,2A	--	Venere (1998)
<i>H. wilder</i>	R. Araguaia, Mato Grosso	58	32M,16SM,10ST	--	Venere (1998)
<i>Hassar sp.</i>	R Jari, Almerim, Pará	58	58M,SM	--	Milhomem et al. (2002)
<i>Leptodoras acipenserinus</i>	R Araguaia, Mato Grosso	58	24M,16SM,14ST,4A	--	Venere (1998)
<i>Opsodoras humeralis</i>	R Solimões, Manaus, Amazonas	58	--	--	Della-Rosa et al. (1980)
<i>Opsodoras sp</i>	R Araguaia, Mato Grosso	58	F 21M,18SM,12ST,7A M 20M,18SM,12ST,8A	ZW/ZZ	Venere (1998)
<i>Oxydoras Níger</i>	R Araguaia, Mato Grosso	58	--	--	Brito et al. (2002)
<i>O. Níger</i>	R Tocantins, Pará	58	20M,16SM,8ST,14A	--	Fenocchio et al. (1993)
<i>Platydoras armatulus</i>	R Bento Gomes, Poconé, Mato Grosso	58	--	--	Troy and Miyazawa (2000)
<i>P. costatus</i>	R Araguaia, Mato Grosso	58	--	--	Brito et al. (2002)
<i>Pterodoras granulosus</i>	R Paraná, Paraná	58	--	--	Júlio Junior et al. (1988)
<i>Rhynodoras dorbignyi</i>	R Mogi-Guaçu, São Paulo	58	20M,20SM,4ST,14A	--	Fenocchio et al. (1993)
<i>R. dorbignyi</i>	R Mogi-Guaçu, São Paulo	58	20M,20SM,4ST,14A	--	Jorge et al. (1992)
<i>Rhynodoras sp.</i>	R Araguaia, Mato Grosso	58	18M,16SM,12ST,12A	--	Venere (1998)
<i>Trachydoras paraguayensis</i>	R Paraná, Posadas, Argentina	56	32M,20SM,4ST	--	Fenocchio et al. (1993)
<i>T. paraguayensis</i>	R. Paraná, Porto Rico, Paraná	56	32M,20SM,4ST	--	Paiva and Julio Junior (2001)

Although reports on the application of more resolutive bandings in Siluriformes are rare, Vasconcelos and Martins-Santos (2000), found chromosomal size and heterochromatin heteromorphisms for one species of the family Pimelodidae (*Pimelodella* sp.1), similar to that described for *Pterodoras granulosus* (current study).

In the present work, mitotic chromosomes of *Pterodoras granulosus* were studied, aiming to identify the particularities that allow a good characterization of the group. For this purpose, conventional bandings were used, besides those of the R-HSS type (Hot Saline Solution) (Artoni et al, 1999) and Giemsa-11 banding (G-11) (Verma and Babu,

1995). The latter was used in fish for the first time. Aspects of the karyotypic evolution in this family of Neotropical fish are approached, seeking a better understanding of the karyotypic changes during the chromosomal diversification in Doradidae.

Material and Methods

Twenty-three (23) specimens (7 males and 16 females) of *Pterodoras granulosus* from a population of the high Parana River, sampled between the Ivinhema River and Porto Primavera Dam, state of Parana (Figure 1), were analyzed. The chromosomal preparations were accomplished in accordance with the technique for the obtainment of mitotic chromosomes, which was first adapted to chromosomal studies in fish by Bertollo *et al* (1978) and later modified by Foresti *et. al.* (1981). Silver nitrate stain was used for the observation of the nucleolar organizing regions (NORs) identification (Howell and Black, 1980). GC-rich regions were investigated by the Chromomycin technique (CMA₃) (Schweizer, 1976). The detection of multiple bands (R-HSS) was done in accordance with Artoni *et al.* (1999).



Figure 1. Southern portion of South America showing the collection site of *Pterodoras granulosus* samplings in Paraná river, from Ivinhema river to Porto Primavera, Paraná (in the inset).

For G-banding analysis, the technique proposed by Verma and Babu (1995), originally described for use in human chromosomes and was modified for chromosomal studies in fish. First, slides were incubated during 7 to 10 days on a chamber at 37° C, and then washed in 2XSSC solution at 60° C for 30 minutes. After this, they were washed in distilled water and air-dried. The preparations were stained in Giemsa 2% (buffer phosphate NaOH 50mM - pH 11) for 8 min, washed in distilled water, drained unstained in methanol:acetic acid (3:1), washed again and air-dried. The final staining was reached with conventional Giemsa (5%) for 3 minutes. After washing in distilled water, the slides were air-dried and ready for the analysis.

Results

The chromosomal analysis of *Pterodoras granulosus* showed a diploid number $2n=58$ chromosomes (16m + 16sm + 14st + 12a) for both sexes (Figure 2). The nucleolar organizing regions (Ag-NORs) were detected in a subterminal position on the short arms of the subtelocentric chromosomal pair 23 (Figure 2). The use of fluorochrome CMA₃ revealed rich-GC blocks only in the position coincidence with Ag-NORs (Figure 2). A size heteromorphism between homologous chromosomes of pair 14 (sm) was observed in males and females (Figure 2).

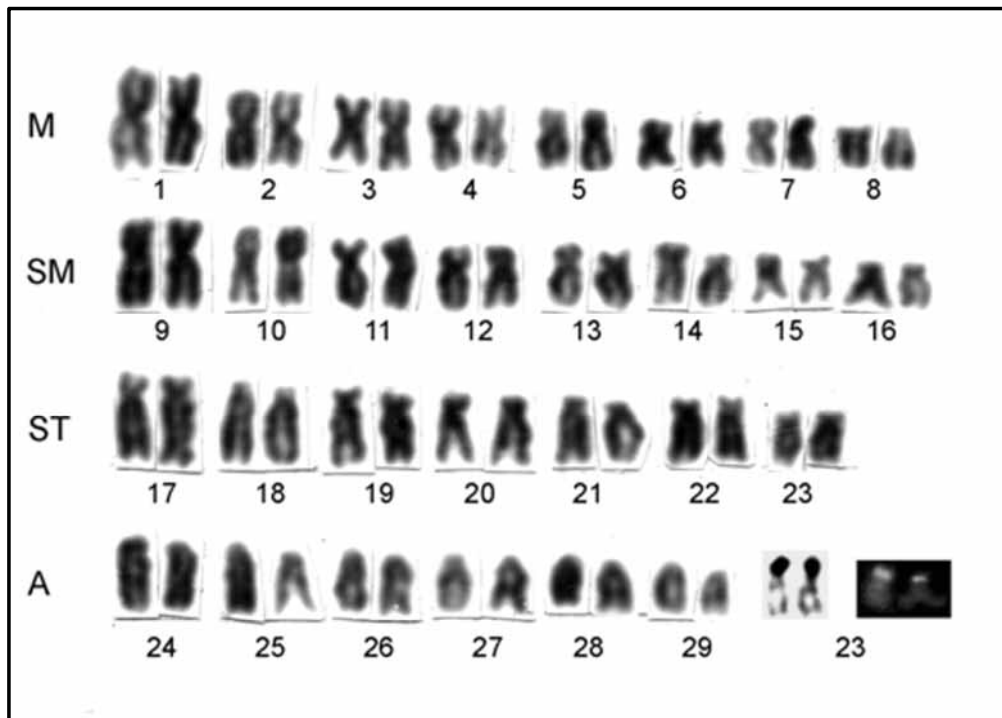


Figure 2. Giemsa stained karyotypes of the *Pterodoras granulosus* with 2n=58 chromosomes. In the in sets, the NOR-bearing pairs and the chromomycine marked pairs with trace in arms of pair 14 presenting size heteromorphism.

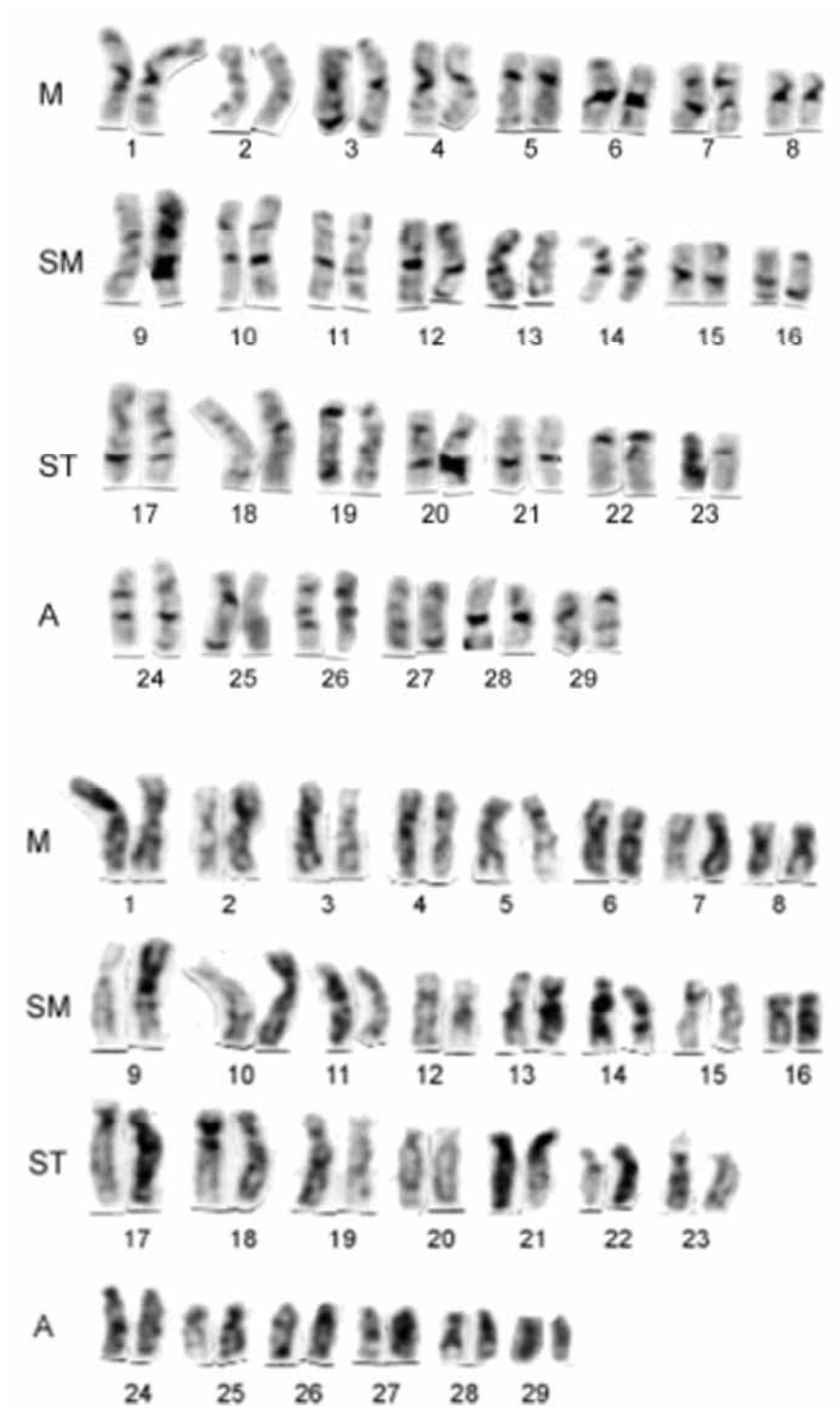


Figure 3. Karyotypes of *Pterodoras granulosus* the bands G-11 (a) and R-HSS (b), highlighted pair of pericentric inversion 16 carrier.

The use of G-11 banding (Figure 3a) showed interstitial and pericentromeric longitudinal demarcations some pairs of chromosomes (5, 6, 14, 16, 17, 26), and also subterminal demarcations in two pairs of chromosomal (19 and 22). Size heteromorfism between pair 14 (sm) homologous (Figure 2) was observed in G-11 banding and is represented by a weak, longitudinal band at a sub-terminal position in one of the homologues pairs, and little evident in the other (Figure 3a and 4), suggesting a duplication of this chromosomal segment in pair 14 (Figure 5a).

Chrom	Glensa	G-11	Idio	R HSS	Idio
14					
16					

Chrom.: Chromosome pair; **Idio.:** Idiogramme

Figure 4. Outline of heteromorphisms observed in *Pterodoras granulosus* in chromosomes 14 (SM) and 16 (SM).

A structural chromosomal heteromorphism in pair 16 (sm), not detected by the staining with Giemsa staining (Figure 1), was observed by G-11 banding (Figure 3a and 4), suggesting a possible event of pericentromeric inversion of one of the homologous chromosomes. R- HSS banding was used aiming, but not confirm the heteromorphisms, which had previously been revealed by G-11 technique.

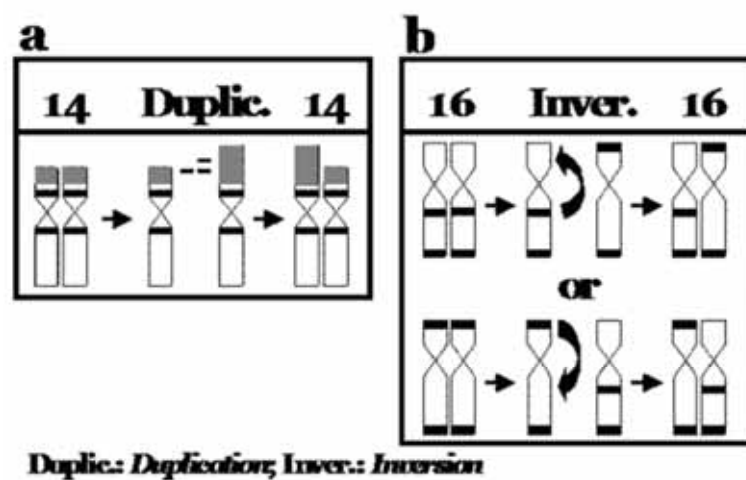


Figure 5. Scheme of the possible evolutionary origin of heteromorphisms observed in *Pterodoras granulosus* in chromosome pair 14 (MS) showing a duplication of a chromosomal segment (a) and heteromorphism in chromosome pair 16 (SM) suggesting a pericentromeric inversion (b).

The use of these technique revealed that the heteromorphism of pair 14 is the consequence of a duplication in a small segment of this chromosomal pair (Figure 3b and 4). On the other hand, the structural heteromorphism observed in pair 16 is due a pericentromeric inversion in one of the homologous of this chromosome pair (Figure 3b

and 4). An ideogram demonstrating the possible origins of the heteromorphisms identified in pairs 14 and 16 is shown in Figure 04.

Discussion

Morphological systematic suggest that the genera *Weiteimeria* and *Franciscodoras* genera form a basal clade for family Doradidae; *Trachydoras* and *Pterodoras*, in turn, are considered derived (Higushi, 1992). Moyer *et al.* (2004) developed a molecular phylogeny for this family corroborating the derived origin of *Trachydoras* and *Pterodoras*, *Acanthodoras* as a basal genus. However, the last one was not analyze according to Higushi's morphological data (1992).

Although cytogenetic reports on fish of the family Doradidae are rare (Table 1), the data available data show a tendency of numeric karyotypic stability, with most of the species exhibiting $2n=58$ chromosomes and simple Ag-NORs in subterminal/terminal position. Oliveira and Gosztanyi (2000) suggests that the basal diploid number for Siluriformes is $2n=56$ chromosomes, hence, karyotypes with $2n=58$ chromosomes and simple Ag-NORs in subterminal position could be represent the most primitive condition for Doradidae. This hypothesis may be confirmed by the karyotypic analysis of *Wertheimeria maculata* (Eler *et al.*, 2006) and *Franciscodoras marmoratus*, which have $2n=58$ chromosomes (Table 1), and simple Ag-NORs in a subterminal position.

The diploid number $2n=58$, with predominance of biarmed chromosomes, and the presence of simple Ag-NORs in a subterminal position observed in *Pterodoras granulosus* (current study), support the hypothesis that there is a tendency of chromosomal stability in this family.

Our karyotypic analysis showed the occurrence of a size heteromorphism among the homologous chromosomes of pair 14 (sm), exhibit by all in all of the analyzed individuals. Considering the migratory habit of the high levels specie, the of this kind of heteromorphism observed suggest that it is an event already fixed in the studied population. Investigations developed in another populations of *Pterodoras granulosus* from the medium and lower Paraná River basin, as well as in other hydrographic basins, can provide extra data about the probable origin of this heteromorphism. On the other hand, the construction of the Itaipu brought together populations of fish that were not previously found in that environment. In this way, the following questions arise: would this heteromorphism have been present in some isolated ancestral group of the species under study, and is now dispersing among the different populations of *Pterodoras* from the Parana River basin, or is that heteromorphism present in *Pterodoras* at homo and heterozygosis condiction, Once the tendency of migratory fish is the maintainance of a more stable karyotypic structure, would that heteromorphism represent an event restricted to the populations of *Pterodoras granulosus* of the Parana River?

Analyzing the above questions, it is possible to verify that the occurrence of homomorphic forms for the chromosomal pairs 14 and 16 were not observed in *Pterodoras granulosus* in the sampled area. Whitch may confirm the hypothesis of fixation of these chromosomal heteromorphisms. That fixation is possibly related to some kind of adaptative advantage of these heteromorphism over the homomorphic forms. Although the sampling performed is highly representative of the population under study, the homomorphic forms may be further evaluated with the analysis of a larger number of individuals.

The use of G-11 banding was important not only for the detection of size heteromorphism between chromosomes of pair 14 (sm), but also because it showed to be an efficient subside for pairing in the final assembly of kayotyopes (Figure 3a).

The identification of size heteromorphism among homologous chromosomes in Neotropical fish is relatively common, and may be also related to sex (Andreatta et al., 1993; Almeida-Toledo and Foresti, 2001; Venere *et al.*, 2004), or to Ag-NORs (Born and Bertollo, 2000; Vasconcelos and Martins-Santos, 2000; Alves et al., 2003), or be a tool to distinguish populations (Giuliano-Caetano, 1998); nevertheless, this study brings for the first time a characterization of a chromosomal heteromorphism in Neotropical fish by G-11 banding that is neither related to sex nor to the nucleolar organization regions.

The structural chromosomal heteromorphism of pair 16 (SM), observed in all individuals of the population assessed, suggests a possible chromosomal rearrangement of pericentric inversion kind in one of the homologous chromosomes of this pair (Figure 5b).

The identification and characterization of structural chromosomal rearrangements in Neotropical fish are rare, mainly due to the laboriousness in applying bandings with larger resolutions, such as R- or G-bands. On the other hand, the obtaining of replication bands by the treatment with the DNA base analogue 5-bromine-2'-deoxyuridine (BrdU) has provided clarifying results in many species of vertebrate (Daniel-Silva and Almeida-Toledo, 2005). However, such methodology is difficult to control and requires excessive time for studies comprising a great number of individuals.

Thus, use of G-11 banding in fish seems to be a good approach for the production of multiple bandings and the consequent identification of chromosomal structural rearrangements. The use of this methodology in other species will certainly yield an increasing the number of reports on structural heteromorphisms in Neotropical fish.

Another alternative for the identification and characterization of chromosomal size and/or structural heteromorphisms in fish is the R-HSS banding, used in the present study to characterize of chromosomal pairs of the *Pterodoras granulosus* karyotype.

In general, Wyandt et al. (1976) emphasize the efficiency of the G-11 banding because it promotes the denaturation of AT-rich areas, extracting them and maintaining the GC-rich areas, that are strongly staining. In fish cytogenetics, the G-11 and R-HSS bandings can be used to obtain a better chromosomal pairing, mainly in those groups where the chromosomes are characterized by similar size and morphology.

In *Pterodoras granulosus* (current study), these bandings were resolute not only for a better chromosomal pairing but also for the identification and characterization of heteromorphisms. However, only with the analysis of hybridization *in situ* (FISH) using centromeric and telomeric DNA probe we will be able to have conclusive data about the origin and evolution of the detected heteromorphisms related.

Acknowledgments —The authors are grateful to Pavanelli, C.S. (Nupelia/UEM) for the taxonomic identification of the species. This study was supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

References

- Agostinho, A.A., Julio Jr., H.F., Gomes, L.C., Bini, L.M., Agostinho, C. S. (1997). Composição, abundância e distribuição espaço-temporal da ictiofauna. In: Vazzoler, A. E. A. M.; Agostinho, A. A.; Hahn, N. S. (Eds.). *A Planície de Inundação do Alto rio Paraná*. Maringá:EDUEM, 1997. cap.II.4, p.179-208.
- Artoni, R. F., Molina, W. F., Bertollo, L. A. C. Heterochromatin (1999). Analysis In The Fish Species *Liposarcus anisitsi* (siluriformes) and *Leporinus elongatus* (characiformes). *Genet. Mol. Biol.* 22:39-44.
- Artoni, R. F., Bertollo, L. A. C. (2001) Trends in the Karyotype Evolution of Loricariidae Fish (Siluriformes). *Hereditas*. 134: 201-210.
- Bertollo, L.A.C., Takahashi, C.S. and Moreira-Filho, O. (1978). Cytotaxonomic Considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Braz. J. Genet.* 1: 103-120.
- Bertollo LAC, Fontes MS, Fenocchio AS and Cano J (1997a). The X1X2Y sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus*. I. G-, C- and chromosome replication banding. *Chrom Res* 5:493-499.
- Eduardo S. Eler E.S., Dergam J.A., Venere, P.C., Paiva L.C., Miranda G.A. & Oliveira A.A. The karyotypes of the thorny catfishes *Wertheimeria maculata* Steindachner, 1877 and *Hassar wilderi* Kindle, 1895 (Siluriformes: Doradidae) and their relevance in doradids chromosomal evolution. *Genetica*. *Genetica* (2007) 130: 99–103.
- Fenocchio, A. S., Jorge, L. C., Vênere, P. C., Bertollo, L. A. C. 1993. Karyotypic characterization and nucleolus organizer regions in tree species of Doradidae (Pisces, Siluriformes). *Brazil. J. Genet.* 16: 1097-1101.
- Higushi, H. A. 1992. Phylogeny of South American thorny catfishes (Osteichthyes; Siluriformes, Doradidae). Thesis of Doctorate, Department of Organismic and Evolutionary Biology, Cambridge University. 372 p.
- Howell, W.M. and Black, D.A. (1980). Controlled Silver Staining of Nucleolus Organizer Regions With a Protective Colloidal Developer: a 1-step method. *Experientia* 36: 1014-1015.
- Júlio Jr, H F., Garcia, R. M., Venere, P. C. 1988. Estudos Cariotípicos em Duas Espécies da Família Doradidae (Pisces, Siluriformes). *Simpósio de Citogenética Evolutiva Aplicada a Peixes Neotropicais*. Maringá, Universidade Estadual de Maringá, p.15.

- Levan, A., Fredga K., and Sandberg, A. A. (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosome. *Hereditas* 52: 201-220.
- Medrano, L., Bernardi, G., Couturier, J., Dutrillaux, B. and Bernardi, G. (1988). Chromosome Banding and Genome Compartmentalization in Fishes. *Chromosoma* 79: 53-64.
- Moyer, G. R., Burr B. M. And Krajewski, C. (2004) Phylogenetic relationships of thorny catfishes (Siluriformes: Doradidae) inferred from molecular and morphological data. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 2004,140, 551–575.
- Oliveira, C. and Gosztonyi, A. E. (2000) A Cytogenetic Study of *Diplomystes mesembrinus* (Teleostei, Siluriformes, Dypломystidae) With a Discussion of Chromosome Evolution in Siluriforms. *Caryologia* 53: 31-37.
- Paiva, L. R. S., Julio Jr, H. F., 2002. Identificação de Heteromorfismo Cromossômico por Bandamento G11 e HSS em *Pterodoras granulosus*, Doradidae (Pisces, Siluriformes). *IX Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes – Maringá- Pr-Brasil*, pp. 86.
- Sabaj, M.H. and C.J. Ferraris Jr., 2003. Doradidae (Thorny catfishes). p. 456-469. In R.E. Reis, S.O. Kullander and C.J. Ferraris, Jr. (eds.) Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America. Porto Alegre: EDIPUCRS, Brasil.
- Stein, Contance K. (1998). Modified Giemsa-11 Staining Protocol for Chromossomes of Human and Hybrid Cells. *Somatic Cell and Molecular Genetics*. Vol24, No.3, pp 191-195.
- Vasconcelos, C. and Martins-Santos I.C. (2000) Chromosome polymorphism in species of the Pimelodidae family (Pisces, Siluriformes). *Hereditas* 132:103-109.
- Verma, R.S. and Babu, A. (1995). Human Chromosomes: Principles and Techniques. McGraw-Hill, New York.
- Wyandt, H. E., Wysham, D. G., Minden, S. K., Andeson, R. S. and Hecht, F. (1976). Machanisms of Giemsa Banding of Chromossomes. *Exp. Cell Research.*, pp 85-94.
- Zawadski, C. H., Pavanelli, C. S., Julio Jr, H. F. 1996. Caracterização Morfológica e Distribuição das Espécies da Família Doradidae (Pisces, Siluriformes) no Alto e Médio Paraná: Registros e Comentários. *Arquivo de Biologia e Tecnologia*. 39 (2): 409-417.

Considerações Finais

Os estudos citogenéticos em animais e plantas tiveram desenvolvimento significativo após a aplicação sistemática de técnicas de obtenção cromossômica que permitiram a integridade do cromossomo, sem a degradação de seus principais constituintes (DNA, proteínas histônicas e não histônicas), possibilitando análises por técnicas de bandamentos cromossômicos. Evolutivamente o DNA organizou-se de arranjos em sequências com poucas proteínas associadas a sua estrutura, para a forma mais elaborada conhecida hoje, estando presente em organismos superiores como animais e plantas em forma de cromossomos mitóticos que podem ser visualizados quando em metáfase.

A divergência relacionada a plantas e animais ocorreu a aproximadamente 900 milhões de anos atrás a partir do “Mitocondrion”, que seria um eucarioto ancestral heteromórfico aeróbio não ciliado (Cavalier-Smith, 2004). Um importante questionamento para o processo evolutivo organizacional cromossômico em animais e plantas surge deste acontecimento, “quais eventos e processos teriam direcionado o DNA antes linear a se organizar em circular, e mais tarde em cromossomos com mesma constituição estrutural, com centrômero, telômero, DNAs repetitivos, processos de compactação similares, eventos meióticos e mitóticos, entre os Reinos Animaliae e Plantae?” Se há esta tendência clara em organização cromossômica independente entre Reinos tão distintos, “o que realmente conduz os cromossomos de alguns vertebrados a apresentarem bandamento G, enquanto outros não apresentam? E por que em plantas ocorre o mesmo”?

Bernardi (2005) reúne mais de 20 anos de trabalho em seu livro, discutindo e avaliando a estrutura genética e cromossômica dos vertebrados, através da composição do conteúdo G e C para estes organismos por ultracentrifugação analítica. A composição do conteúdo GC rico teria diferentes proporções em vertebrados de sangue quente (aves e mamíferos) e vertebrados de sangue frio (anfíbios, répteis e peixes), são os chamados isocores. A composição dos isocores quanto ao conteúdo de GC rico em vertebrados, permitiu associar à composição GC com a possibilidade de bandamentos mais resolutivos, principalmente bandamento G (Medrano et al, 1988, Bernardi, 2005). O conteúdo GC rico estaria presente em maior quantidade em vertebrados de sangue quente formando os isocores diferentemente dos vertebrados de sangue frio, onde o conteúdo GC rico estaria em menor proporção e disperso sem a formação de isocores.

Segundo Bernardi (2005) três fatores seria os principais agentes das alterações de composição genômica entre os vertebrados de sangue frio e os de sangue quente: (i) vertebrados são uma parte muito pequena do táxon partilhando muitas propriedades genéticas e genômicas, em outras palavras, a grande maioria dos insumos que influenciam a composição do genoma são muito semelhante (ii) uma grande diferença entre vertebrados de sangue frio e os de sangue quente é a temperatura do corpo (iii) as "grandes mudanças" nunca foram observados em peixes e anfíbios (maioria dos vertebrados), envolveu ambas seqüências codificantes e não-codificantes, somente em cerca de 10-15% do genoma, interessante a parte mais rica em genes. Estes fatores formam a "hipotese da estabilidade termodinâmica" (Jabbari e Bernardi, 2004).

A análise do conteúdo GC rico em ultracentrifugação analítica por densidade de gradiente em CsCl (cloreto de cézio) de espécies de peixes que vivem em região quente (cerca de 40°C) como *Alcolapia alcalicu* (tilápia) e região fria (cerca de 20°C) o

Cyprinodon salinus, permitiu verificar diferenças significativas de composição do conteúdo GC rico (Jabbari e Bernardi, 2004, Bernardi, 2005). O mesmo ocorreu quando avaliaram a Composição do conteúdo GC₃ e metilação de ilhas CpGs em genomas de vertebrados de sangue frio (Bernardi, 2005).

O trabalho de Medrano et al (1988) que associa a compartimentalização cromossômica, os isocores, a não obtenção de banda G em peixes, pode ser considerado um marco na citogenética de peixes, pois muitos trabalhos posteriores utilizaram desta relação para explicar a inviabilidade obtenção do bandamento cromossômico e/ou a não repetibilidade deste em cromossomos de peixes (banda G para todos os casos em peixes) (Bertollo et al, 1997, Maistro et al, 1999, Portela-Castro et al, 2008, Kasahara, 2009). É interessante observar que os trabalhos acima mencionados utilizaram peixes da região neotropical, regiões normalmente quentes, mesmo com a possibilidade de maior conteúdo GC rico, os bandamentos G não foram consistentes.

Esta discussão torna-se ainda mais interessante quando observamos o trabalho de Wang et al (2004) com banda G em anfioxo, um protocordado, utilizando obtenção cromossômica através de cultura celular de embrião (*Branchiostoma belcheri tsingtauense*) indicando, provavelmente, que outros fatores além da constituição de conteúdo GC rico dos isocores estariam envolvidos com a possibilidade deste bandamento. Zhuang et al (2006) descreve banda G para linguado (*Cynoglossus semilaevis*), sendo os cromossomos menores que 5µm de tamanho, permitindo ainda a discriminação de um par para cromossomos sexuais nesta espécie.

Daniel-Silva e Almeida-Toledo (2005) descrevem bandamento R (BrdU) para duas espécies do gênero *Astyanax*, e devido ao padrão distinto das bandas, possibilitou inferir sobre origem cromossômica para este espécimens. Vários outros trabalhos reportam

bandamento R por BrdU em peixes (Gilles et al, 1988, Amores et al, 1995, Molina e Galetti-Jr, 2007, Claro e Almeida-Toledo, 2010).

Além dos vertebrados de sangue frio, outros trabalhos descrevem banda G para plantas com excelentes resultados (Song et al, 1994, Cai et al, 2003, Fedak e Kim, 2008), mesmo com trabalhos tentando explicar a inviabilidade do bandamento G neste grupo. apresentando o resultado da banda G como de constituição coincidente com o bandamento C em mamíferos, devido a provável organização das regiões G bandadas e quanto a riqueza do conteúdo GC (Schubert e Rieger 1984).

Xiaofeng e Zili (1988) induziram com sucesso a formação de macrocolis em plantas, o que indicou uma grande possibilidade de bandamento G em plantas, já que em animais este fator está intrinsecamente relacionado processo compactação cromossômica e a possibilidade de formação de banda G, e que a obtenção das bandas em plantas estaria mais relacionada a processos presentes nas preparações cromossômicas do que com a estrutura gênomic (Hapaala, 1984).

Outro aspecto fundamental chama a atenção para a questão organizacional cromossômica, onde em peixes e anfíbios são possíveis de obter excelentes resultados por bandamento R através da injeção por BrdU (Daniel-Silva e Almeida –Toledo, 2005, Kasahara, 2009, Claro e Almeida-Toledo, 2010). A banda R é considerada reversa ao bandamento G para vertebrados de sangue quente, mas o que ocorreria nos cromossomos de vertebrados de sangue frio com os quais podem se obter banda R, que inviabilizaria a obtenção de banda G? Outros organismos além dos vertebrados de sangue quente e dos peixes já citados, também apresentam bandamento G, assim como em anfíbios (Schimid, 1980; Sekiya e Nakagawa, 1983), répteis (Mengden e Stock, 1980, Yonenaga- Yassuda et

al. 1996; HU e JIE, 1999) e mesmo alguns artrópodes como aranha (Rodríguez-Gil et al, 2007) e abelhas (Stanimirovic et al, 2005).

Reportando o início das obtenções de banda G em cromossomos humanos se percebe que nem sempre foi tão prática e imediata a aplicação. Em relato pessoal de Marina Seabright (1981) é relatado como ocorreu e como padronizou a banda G para cromossomos humanos. A seguir trecho extraído do relato pessoal de Seabright:

“A história das bandas por tripsina realmente começou em 1967, enquanto examinava um cromossomo, com coloração por Leishman. Para minha surpresa, notei a presença de estranhas listras em todas as cromátides. Intrigada com esta observação eu busquei a opinião de citogeneticistas sêniores quanto ao possível significado deste fenômeno. Ai de mim, eles não ficaram impressionados. De pronto e de forma unanime o veredicto foi: *artefatos!* Laboriosamente, então eu tentei reproduzir esta foto refazendo todas as etapas do o cronograma de coloração, mesmo adicionando a coloração algumas gotas de café Nescafé, porque me lembrei que bebia naquele momento. Nada aconteceu. Em retrospecto, devo ter usado uma pipeta contaminada com tripsina, que tinha sido anteriormente utilizados para a colheita de uma cultura de fibroblastos, portanto, as bandas...”

Vários outros trabalhos após Seabright (1971) relatam a necessidade de boas preparações cromossômicas, com atenção especial a fixação do material citogenético para a melhor obtenção do bandamento G em cromossomos humanos (Takayama, 1974, Retief e Rachel, 1977, Comings, 1978, Barnett et al, 1980, Burkholder e Duczek, 1980, Soltis, 1982, Burkholder e Duczek, 1982, Islam e Levan, 1987, Ronne, 1988, Gold e Li 1990, Barch et al, 1997, Masters, 2000).

A fixação do material citogenético está diretamente relacionada à possibilidade de banda G nos cromossomos como descrito por Islam e Levan (1987), que testaram

diferentes proporções de metanol/ ácido acético, demonstrando que há significativa alterações na qualidade das bandas G obtidas. Holmquist e Comings (1976) investigaram quais fatores poderiam estar envolvidos com a formação da banda G, identificando que proteínas histônicas (H1, H2A, H2B e H3), polilisinas e poliargininas, inibiam a coloração por Giemsa. Comings e Avelino (1975) já haviam encontrado indício de que proteínas não histônicas estariam envolvidas com formação de banda G por tripsina. Apesar de todos os indícios relacionados a banda G em cromossomos, ainda é desconhecido o completo mecanismo que leva a formação destas bandas.

Seguramente três grandes fatores são estão envolvidos com a formação ou não de banda G em cromossomos de vertebrados de sangue frio: (i) presença, constituição e organização de conteúdo G e C, os isocores; (ii) constituição proteica das regiões claras em banda G (proteínas histônicas e não histônicas); (iii) fixação do material citogenético.

O presente trabalho traz aplicações técnicas e práticas com o objetivo de melhorar as obtenções cromossômicas adequando a bandamentos mais resolutivos. Alguns autores já descreveram estes parâmetros para cromossomos humanos, onde a banda G por tripsina, estaria mais relacionada a proteínas não histônicas presentes no arcabouço cromossômico, e a permeabilidade para conseqüente bandamento, poderia ser influenciada pela fixação do material citogenético resultando em melhores ou piores bandamentos cromossômicos (Comings e Avelino, 1974, Matsui e Sasaki, 1975, Holmquist e Comings, 1976, Barnett et al, 1980, Burkholder e Duczek, 1980, Burkholder e Duczek, 1982, Islam e Levan, 1987, Ronne, 1987, Henagariu et al, 2001, Claussen et al, 2002).

Nas observações do presente estudo quanto à possibilidade de bandamento G e organização cromossômica em peixes, obtiveram-se as mesmas conclusões de Xiaofeng e Zili (1988) para plantas, relacionando a não obtenção de banda G em peixes, com a

metodologia de obtenção cromossômica utilizada, uma vez que o presente trabalho trás bandamento G em diferentes espécies de peixes, representantes de quatro ordens. Ficou evidente também, que a obtenção cromossômica por cultura celular de sangue periférico, proporcionou os melhores resultados para bandamento G. Vale ressaltar que os trabalhos em peixes com banda G de melhor qualidade também foram utilizadas técnicas de obtenção cromossômica por cultura celular, assim como para cromossomos humanos (Medrano et al, 1988, Wang et al, 2004, Fugiwara et al, 2007). O tipo de tecido e a metodologia utilizada determinam a qualidade e viabilidade do bandamento G em cromossomos como visualizado no presente trabalho (Roberts e Tattersall, 1987, Novak et al, 1993).

A possibilidade de banda G em cromossomos de peixes demonstrada no presente trabalho reforça a idéia de que estruturas extra-DNA como proteínas não histônicas, estejam envolvidas com este processo e que a formação dos isocores com conteúdos GC ricos ou pobres talvez não seja determinante deste processo organizacional no genoma dos vertebrados (Matsui e Sasaki, 1973, Comings e Avelino, 1975, Holmquist e Comings, 1976).

Referências Gerais

Almeida-Toledo, L.F., Foresti, F. and Toledo-Filho, S.A. (2000) Karyotypic evolution in Neotropical freshwater fish – *Chromosoma Today* – vol. 13: 169-182.

Amores A., Bejar J., Alvarez M.C. (1995) Replication, C and Ag-NOR chromosome-banding in two anguilliform fish species *Marine Biology* Volume 123, Number 4, 845-849.

Bertollo, A.C., Fontes, M.S., Fenochio, A. S. and Cano, J. (1997) The X_1X_2Y sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus*. I. G-, C- and chromosome replication banding. *Chromosome Research* – 5:493-499.

Bertollo LAC, Mestriner CA (1998). The X_1X_2Y sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae). II. Meiotic analyses. *Chromosome Research* **6**: 141–147.

Buckup P.A., Menezes N.A., Ghazzi M.S. (2007) Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil. Série livros 23. Museu Nacional. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

Cavalier-Smith T. (2004) Only six kingdoms of life. *Proceeds Royal Society of London* 271, 1251–1262.

Cai N., Hu K., Xiong H., Li S., Su W., Zhu F. (2003) Image segmentation of G bands of *Triticum monococcum* chromosomes based on the model-based neural network. *Pattern Recognition Letters* 25, 319–329.

Carvalho, R. A. and Dias, A.L. (2005) Karyotypic characterization of *Iheringichthys labrosus* (Pisces, Pimelodidae): C-, G- and restriction endonuclease banding. *Genetics And Molecular Research* – 4: 663-667.

Claro L.F., Almeida-Toledo L.F. (2010) Evidence of chromosome fusion in *Gymnotus sylvius* Albert & Fernandes-Matoli, 1999 (Teleostei: Gymnotiformes) detected by telomeric probes and R-banding. *Caryologia*. Vol. 63, no. 2: 134-141.

Claussen U., Michel S., Mühlig P., Westermman M., Grummt U.W., Kromeyer-Hauschild K., Liehr T. (2002) Demystifying chromosome preparation and the implication for the concept of chromosome condensation during mitosis. *Cytogenic and Genome Research*. 98: 136-146.

- Cestari, A. N. (1973) Métodos de estudo dos cromossomos de vertebrados. IN: Azevedo, T.L. de e Costas, S.O.P. da org. Exercícios Práticos de Genética, 29-31. Companhia Editora Nacional – Editora da Universidade de São Paulo, SP.
- Comings D.E., Avelino E. (1974) Mechanisms of chromosome banding. VII. Interaction of Methylene Blue with DNA and Chromatin. *Chromosoma* 51, 365-379.
- Holmquist G.P. e Comings D. E. (1976) Histones and G Banding of Chromosomes. *Science, New Series*, Vol. 193, No. 4253, pp. 599-602.
- Hsu T-C. (1983) G-band of plant chromosome. United of States. Patent No. 4,596,089.
- Fedaki G., Kim N.S. (2008) Tools and methodologies for cytogenetic studies of plant chromosomes. *Cytology and Genetics*, 2008, Vol. 42, No. 3, pp. 189–203.
- Foresti F, Almeida-Toledo LF and Toledo SA (1981) – Polymorphic nature of nucleolus organizer regions in fishes. *Cytogen. Cell Genet.* 31: 137-144.
- Foresti, F., Oliveira, C. and Almeida-Toledo, L. F. (1993) A method for chromosome preparations from large fish specimens using in vitro short-term treatment with colchicines. *Cellular and Molecular Life Sciences* – 49: 810-813.
- Fujiwara A., Fujiwara M., Nishida-Umehara C., Abe S., Masaoka T. (2007) Characterization of Japanese flounder karyotype by chromosome bandings and fluorescence in situ hybridization with DNA markers *Genetica* 131:267–274.
- Giles V., Thode G., Alvarez M.C. (1988) Early replication bands in two scorpion fishes, *Scorpaena porcus* and *S. notata* (order Scorpaneiformes). *Cytogenet Cell Genet* 47:80-83
- Gold JR, Li YC, Shipley NS, Powers PK (1990) Improved methods for working with Fish chromosomes with a review of metaphase chromosome banding. *J Fish Biol* 37: 563±575.
- Henegariu O., Heerema N.A., Wright L.L., Bray-Ward P., Ward D.C., Vance G.H. (2001) Improvements in Cytogenetic Slide Preparation: Controlled Chromosome Spreading, Chemical Aging and Gradual Denaturing. *Cytometry* 43:101–109.
- Islam M.Q., Levan G. (1987) A new fixation procedure for improved quality G-bands in routine cytogenetic work. *Hereditas*, 107: 127:130.
- Jabbari, K., Clay, O. and Bernardi, G., 2003. GC3 heterogeneity and body temperature in vertebrates. *Gene* 317, 161– 163.

- Kasahara, S. (2009) Introdução à pesquisa em citogenética de vertebrados. Ed. Sociedade Brasileira de Genética. 1ªed. 160 pp.
- Kligerman e Bloom (1976) Sister chromatid differentiation and exchanges in adult mudminnows (*Umbra limi*) after in vivo exposure to 5-bromodeoxyuridine. *Chromossoma* – 56: 101-109.
- Luo C. (1998) Multiple chromosomal banding in grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*. *Heredity*, 81: 481-485.
- Maistro, E. L., Foresti, F. and Oliveira, C. (1999) R- and G-band patterns in *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characiformes, Characidae). *Genetics and Molecular Biology* - 22:201-204.
- Maistro, E. L., Foresti, F. and Oliveira, C. (2000) Cytogenetic analysis of A- and B-chromosomes of *Prochilodus lineatus* (Teleostei, Prochilodontidae) using different restriction enzyme banding and staining methods. *Genetica* 108: 119–125.
- Matsui S-I., Sasaki M. (1975) The mechanism of Giemsa-banding of mammalian chromosomes, with especial attention to the role of non-histone proteins. *Japan Journal of Genetics*. Vol 50, 3: 189-204.
- Mcphail, J.D. and Jones, R.L. (1966) A simple technique for obtaining chromosome from teleost fish. *J. Fish Res. Bd. Canad.* 23:767-769.
- Medrano, L., Bernardi, G., Couturier, J., Dutrillaux, B. and Bernardi, G. (1988) Chromosome banding and genome compartmentalization in fishes. *Chromossoma* – 96: 178-183.
- Mengden G.A., Stock A.D. (1980) Chromosomal Evolution in Serpentes; A Comparison of G and C Chromosome Banding Patterns of Some Colubrid and Boid Genera. *Chromosoma* 79, 53-64.
- Nirchio M., Oliveira C. (2006) *Citogenética de Peces*. Livro. Ed. Cordinación de Publicaciones del Rectorado de la Universidade de Oriente, 212 páginas.
- Portela-Castro A.L.B., Julio-Jr, H.F., Martins-Santos I.C., Pavanelli C.S. (2008) Occurrence of two cytotypes in *Bryconamericus aff. Iheringii* (Characidae): karyotype analysis by C- and G-banding and replication bands. *Genetica* 133:113–118.
- Rodríguez-Gil S.G., Merani M.S., Scioscia C.L., Mola I.M. (2007) Cytogenetics in three species of Polybetes Simon 1897 from Argentina (Araneae, Sparassidae) I. Karyotype and chromosome banding pattern. *The Journal of Arachnology* 35:227–237.

- Ronne M. (1989) Chromosome Preparation and High Resolution Banding Techniques. *In*: Symposium: Cytogenetics and Cell Biology. *Journal Dairy Science* 72:1363-1377.
- Seabright M. (1971) A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* 2:971-2.
- Seabright M. (1981) This Week's Citation Classic "Seabright M.: A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* 2:971-2, 1971". CC/Number 14 April 6.
- Silva A.P.Z., Haddad, C.F.B., Galassi G.G., Kasahara, S. (2006) Multiple nucleolus organizer regions in *Leptodactylus mystacinus* (Amphibia, Anura) and comments on its systematic position in the *L. fuscus* group based on cytogenetic and molecular analyses. *Genetica* (2006) 127:35–44.
- Song Y. C., Liu L. H., Ding Y., Tian X. B., Yao Q., Meng L., He C. R., Xu M. S. (1994) Comparisons of G-banding patterns in six species of the Poaceae. *Hereditas* 121: 31-38.
- Stanimirovic Z., Stevanovic J., Andjelkovic M. (2005) Chromosomal diversity in *Apis mellifera carnica* from Serbia. *Apidologie* 36 (2005) 31–42.
- Swarça AC, Fenocchio AS, Cestari MM, Bertollo LAC, Dias AL (2006) Heteromorphic sex chromosome system with an exceptionally large Y chromosome in a catfish *Steindachneridion* sp. (Pimelodidae). *Cytogenet Genome Res.* Volume 16, Number 6, 815-825.
- Takayama S. (1974) Factors for giemsa-band formation in air-dried mammalian chromosomes. *Japan Journal of Genetics.* Vol. 49 No.4: 180-195.
- Vari R.P., Malabarba L.R. (1998). Neotropical Ichthyology: an overview. In *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes* (L.R. Malabarba, R.E. Reis, R.P. Vari, Z.M.S. Lucena & C.A.S. Lucena, eds.). EDIPUCRS, Porto Alegre, p. 1-11.
- Vicente, V.E., Bertollo, L.A.C., Valentini, S.R., and Moreira-Filho, O. (2003) Origin and Differentiation of a Sex Chromosome System in *Parodon hilarii* (Pisces, Parodontidae). *Satellite DNA, G- and C-.* *Genética* – 119:115-120.
- Verma, RS and Babu, A (1995). *Human Chromosomes: Principles and Techniques.* McGraw-Hill, New York.
- Venere P.C., Galetti Jr. P.M. (1995) — Multiple longitudinal bands in fish chromosomes: comparison of structural G-banding and replication R bands among curimatids. *Cytobios* 84: 71-78.

Wang C., Zhang S., Chu J. (2004) G-banding patterns of the chromosomes of amphioxus *Branchiostoma belcheri tsingtauense*. Hereditas 141: 2-7