

## RESSALVA

Alertamos para ausência das páginas 70 a 89, não incluídas pelo autor no arquivo original.

**José Carlos Pansonato Alves**

**Estudos citogenéticos no gênero *Characidium* (Teleostei,  
Characiformes, Chrenuchidae), com análise estrutural e molecular do  
sistema ZZ-ZW de cromossomos sexuais**

**Doutorado**

**Botucatu**

**2010**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP**  
**INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU**

**Estudos citogenéticos no gênero *Characidium* (Teleostei, Characiformes, Chrenuchidae), com análise estrutural e molecular do sistema ZZ-ZW de cromossomos sexuais**

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

**José Carlos Pansonato Alves**

**Orientador: Prof. Dr. Fausto Foresti**

Botucatu

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO  
DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Alves, José Carlos Pansonato.  
Estudos citogenéticos no gênero *Characidium* (Teleostei,  
Characiformes, Chrenuchidae), com análise estrutural e molecular do  
sistema ZZ-ZW de cromossomos sexuais / José Carlos Pansonato Alves  
– Botucatu : [s.n.], 2010.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de  
Botucatu, 2010

Orientador: Fausto Foresti  
Assunto CAPES: 20204000

1. Peixe - Genética    2. Citogenética animal    3. Cromossomos  
sexuais

CDD 597.015

Palavras-chave: *Characidium*; Cromossomos B; Cromossomos sexuais;  
Microdisseção cromossômica

Para todos os erros... que se busque a redenção...

Dedico

... a quem sempre me espera

Liliane

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida, por minha família, trabalho e amigos.

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

Aos professores Artur Antônio Andreata, Fabio Porto Foresti e Anderson Luis Alves, pelo incentivo e amizade.

Ao técnico Renato Devidé, sempre presente e disposto a ajudar nas coletas e nas preparações cromossômicas.

Ao professores Cláudio de Oliveira e Edmir Daniel de Carvalho, pelo exemplo como pesquisadores e dedicação ao trabalho.

Aos amigos Luiz Ricardo de Souza Paiva e Igor Paiva Ramos.

Aos amigos que fiz na UNESP de Botucatu e que sempre ajudaram em tudo o que precisei. Em especial, Cristiane e Guilherme, Daniela e Marlon, Débora e Patrícia, Priscila e Ricardo Utsonomia, Juliana e Viviani.

Aos amigos de Bauru, Diogo e Tatiana.

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

Aos professores Roberto Ferreira Artoni e Marcelo Ricardo Vicari, da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

À minha mãe, Maria de Lourdes, às minhas irmãs, Cristiane e Letícia, aos meus cunhados, Eduardo e Ricardo e aos meus sobrinhos, Vitor e Ana Clara, por serem a minha família.

A Liliane Duarte Azadinho, pelo amor, compreensão e paciência.

## Resumo

Foram analisadas onze espécies de peixes do gênero *Characidium*, *Characidium cf. zebra*, *Characidium cf. gomesi*, *Characidium lauroi*, *Characidium oiticicai*, *Characidium lanei*, *Characidium pterostictum*, *Characidium schubarti*, *Characidium alipioi*, *Characidium sp1*, *Characidium sp2* e *Characidium sp3* de diferentes bacias hidrográficas brasileiras, com o uso de técnicas citogenéticas básicas (coloração com Giemsa, localização das RONS pela marcação com nitrato de Prata e bandamento C) e moleculares (marcação por fluorocromos base-específicos, hibridação *in situ* fluorescente com sondas de DNAr 18S e 5S, com sondas teloméricas (TTAGGG)<sub>n</sub> e com sondas para histona H<sub>1</sub> e também microdissecção, amplificação e hibridação *in situ* fluorescente com sondas produzidas a partir do cromossomo sexual W e dos cromossomos B). Todas as espécies apresentaram número diplóide de 2n=50 cromossomos, com predominância dos cromossomos dos tipos meta e submetacêntricos, além da ocorrência de cromossomos supranumerários em *C. pterostictum*, *C. oiticicai*, *C. cf. gomesi* e *Characidium sp3*. Foi observada também a ocorrência de um sistema ZZ-ZW de cromossomos sexuais representado pelo par heteromórfico número 2 em todas as espécies, com exceção apenas de *Characidium cf. zebra*, que não apresentou cromossomos sexuais diferenciados. O DNAr 5S foi localizado em diferentes cromossomos entre estas espécies, mas sempre em posição intersticial dos cromossomos, reforçando a idéia de que esta localização cromossômica poderia representar alguma vantagem relacionada à organização destes genes no genoma. As RONS, identificadas pela prata, pela CMA<sub>3</sub> e pela sonda de DNAr 18S, foram sempre localizadas em compartimentos cromossômicos distintos do DNAr 5S e estão diretamente relacionadas ao processo de diferenciação dos cromossomos Z e W, desempenhando importante papel evolutivo, pois poderiam influenciar no pareamento desses cromossomos e, conseqüentemente, contribuir para a manutenção das permutas cromossômicas ocorridas durante a prófase meiótica. A análise da heterocromatina constitutiva, através do bandamento C, revelou que os cromossomos sexuais e os cromossomos B são heterocromáticos. No entanto, em algumas espécies, a heterocromatina desses cromossomos também apresenta afinidade pelos fluorocromos DAPI e CMA<sub>3</sub>. A técnica de pintura cromossômica, usando sondas produzidas a partir de cromossomos microdissecados, foi realizada para testar a homologia dos cromossomos sexuais Z e W encontrados em dez espécies de *Characidium*, bem como testar a homologia dos cromossomos B presentes em algumas espécies. Foi produzida uma sonda a partir do cromossomo W de *Characidium cf. gomesi*, obtida por microdissecção cromossômica e DOP-

PCR, identificada como CgW. Essa sonda evidenciou sinais de hibridação nos cromossomos Z e W de todas as espécies analisadas, evidenciando homologias entre os cromossomos sexuais existentes e uma possível origem comum deste sistema de diferenciação sexual. Por outro lado, em *Characidium cf. zebra*, a hibridação com a sonda CgW revelou apenas marcações teloméricas nos cromossomos, apontando para a inexistência de homologia entre o cromossomo W e os cromossomos autossômicos desta espécie. A partir dos cromossomos B de *C. cf. gomesi*, *C. pterostictum* e *C. oiticicai* foram produzidas sondas específicas para os B de cada espécie, através de microdissecção e amplificação por DOP-PCR. As sondas produzidas, identificadas nestas espécies como CgB, CpB e CoB, respectivamente, foram hibridizadas sobre cromossomos metafásicos destas três espécies. Os resultados mostraram que os cromossomos B de *C. cf. gomesi* e *C. pterostictum* possuem homologia entre si e com alguns cromossomos do complemento A, sugerindo uma origem intra-específica, possivelmente relacionada ao processo de diferenciação dos cromossomos sexuais nestas espécies. Por outro lado, os cromossomos B de *C. oiticicai* não apresentam homologia com os cromossomos do complemento A e nem com os cromossomos B de *C. cf. gomesi* e *C. pterostictum*, sugerindo uma origem independente para estes cromossomos nesta espécie. Estudos desta natureza, além de trazerem informações acerca da estruturação do material genético presente nos cromossomos B e nos sexuais, fornecem também subsídios para o entendimento do processo de diferenciação cromossômica nas espécies de *Characidium* estudadas.



## Abstract

Eleven species of fish of the genus *Characidium* comprised by *Characidium cf. zebra*, *Characidium cf. gomesi*, *Characidium lauroi*, *Characidium oiticicai*, *Characidium lanei*, *Characidium pterostictum*, *Characidium schubarti*, *Characidium alipioi*, *Characidium sp1*, *Characidium sp2*, and *Characidium sp3* from different Brazilian hydrographic basins were analyzed using basic cytogenetic (coloration with Giemsa, localization of NORs for silver nitrate marking and C-banding) and molecular techniques (for base-specific fluorochrome markings, fluorescent in situ hybridization with 18S and 5S rDNA probes, telomere probes (TTAGGG)<sub>n</sub>, and H<sub>1</sub> histone, as well as microdissection, amplification and *in situ* fluorescent hybridization using probes prepared from both sex W and B chromosome). All the species presented a diploid number of 2n=50 chromosomes, with a predominance of the meta- and submetacentric types, besides the occurrence of supranumerary chromosomes in *C. pterostictum*, *C. oiticicai*, *C. cf. gomesi*, and *Characidium sp3*. The occurrence of a ZZ-ZW sex chromosome system represented by the heteromorphic pair number 2 in all species was observed, with the exception of *Characidium cf. zebra*, which did not present differentiated sex chromosomes. The 5S rDNA marks were observed in different chromosomes among these species, but always located in an interstitial position, strengthening the idea that this chromosome location might represent some advantage related to the organization of these genes in the genome. NORs identified using Silver and CMA<sub>3</sub> staining and 18S rDNA probe have always been located in distinct chromosome compartments when compared to 5S rDNA, showed to be directly related to the Z and W chromosome differentiation process, and is considered to play an important role in their evolution, considering that they could influence these chromosome pairing, and consequently contribute to the maintenance of chromosome exchanges during the meiotic prophase. The analysis of the constitutive heterochromatin through C-banding revealed that sex chromosomes, as well as B chromosomes are heterochromatic. However, in some species, chromosome heterochromatin also indicate an affinity to DAPI and CMA<sub>3</sub> fluorochromes. The chromosome painting technique using probes produced from microdissected chromosomes was carried through to test sex homology between Z and W chromosomes in ten species of *Characidium*, as well as the homology within B chromosomes observed among some species. A probe identified as CgW generated by microdissection of the W chromosome using DOP-PCR in sample of *Characidium cf. gomesi*, evidenced hybridization signals on both Z and W chromosomes of all analyzed species, providing evidence of homology between the existing sex chromosomes and

reinforcing the hypothesis of a possible common origin of this sex differentiated system. On the other hand, in *Characidium cf. zebra*, the hybridization with the CgW probe disclosed only telomeric markings on the chromosomes pointing to the lack of homology between the W and the autosomal chromosomes of this species. Specific probes were produced for B chromosomes of each species *C. cf. gomesi*, *C. pterostictum* and *C. oiticicai* by microdissection and amplification by DOP-PCR. The probes, identified as CgB, CpB and CoB, respectively, were hybridized on metaphase chromosomes of these three species. The results showed that B chromosomes of *C. cf. gomesi* and *C. pterostictum* presented homology among themselves and with some chromosomes of the A complement, suggesting an intraspecific origin, possibly related to the sex chromosome differentiation process in these species. B chromosomes of *C. oiticicai* did not present any homology with either the chromosomes of the A complement or with B chromosomes of *C. cf. gomesi* and *C. pterostictum*, suggesting an independent origin for these chromosomes in these species. Such studies besides bringing information on the structure of the present genetic material stored in B and in sex chromosomes, also provide subsidies for the understanding of the chromosome differentiation process in the genus *Characidium*.

## Sumário

<b>1 Introdução</b> .....	1
1.1 Considerações sobre a citogenética de peixes e a microdissecção cromossômica.....	1
1.2 O gênero <i>Characidium</i> : características taxonômicas e citogenéticas.....	5
<b>2 Objetivos</b> .....	10
<b>3 Materiais e métodos</b> .....	11
3.1 Materiais .....	11
3.2 Métodos .....	11
3.2.1 Estimulação de Mitoses .....	15
3.2.2 Obtenção de Cromossomos Metafásicos.....	15
3.2.3 Detecção das Regiões Organizadoras de Nucléolos (RONs) através da Impregnação com Nitrato de Prata (AgNO <sub>3</sub> ) .....	16
3.2.4 Identificação da Heterocromatina Constitutiva .....	17
3.2.5 Identificação de Regiões Cromossômicas ricas em GC, pelo fluorocromo Cromomicina A <sub>3</sub> .....	17
3.2.6 Identificação de Regiões Cromossômicas ricas em AT, pelo fluorocromo DAPI .....	18
3.2.7 Preparação das sondas de DNA para hibridação fluorescente <i>in situ</i> (FISH) .....	18
3.2.7.1 Microdissecção .....	18
3.2.7.2 DOP-PCR .....	19
3.2.7.3 Primeira PCR.....	19
3.2.7.4 Segunda PCR.....	20
3.2.7.5 PCR de marcação.....	20
3.2.7.6 Preparação da sonda telomérica .....	21
3.2.7.7 Preparação das sondas de DNAr 18S e 5S .....	22
3.2.7.8 Preparação da sonda para Histona H <sub>1</sub> .....	23
3.2.7.9 Hibridação Fluorescente <i>in situ</i> .....	24
3.2.8 Métodos Moleculares .....	26
3.2.9 Estudos Cariotípicos .....	27
<b>4 Resultados e Discussão</b> .....	28
<b>4.1 Capítulo 1-</b> Diversidade cromossômica interespecífica no gênero <i>Characidium</i> (Teleostei, Characiformes, Crenuchidae) .....	29
<b>4.2 Capítulo 2-</b> Diversificação cromossômica em populações de <i>Characidium cf. gomesi</i> (Characiformes, Crenuchidae). Aspectos evolutivos da diferenciação alopátrica .....	47

<b>4.3 Capítulo 3-</b> Conservação cariotípica em populações de <i>Characidium cf. zebra</i> (Teleostei, Characiformes, Crenuchidae): mapeamento físico dos genes ribossomais e ocorrência de triploidia natural .....	63
<b>4.4 Capítulo 4-</b> Polimorfismos cromossômicos em populações alopátricas de <i>Characidium pterostictum</i> (Teleostei, Characidae).....	80
<b>4.5 Capítulo 5-</b> Distribuição das sequências teloméricas (TTAGGG) <sub>n</sub> em três espécies de peixes do gênero <i>Characidium</i> .....	95
<b>4.6 Capítulo 6-</b> Relações evolutivas entre as espécies de peixes do gênero <i>Characidium</i> Análises cromossômicas e moleculares.....	107
<b>4.7 Capítulo 7-</b> Mapeamento cromossômico e inferências evolutivas sobre a distribuição dos genes para histona H <sub>1</sub> e DNAr 18S e 5S em quatro populações alopátricas de <i>Characidium cf. gomesi</i> (Characiformes, Crenuchidae) .....	124
<b>4.8 Capítulo 8-</b> Microdissecção e pintura cromossômica de cromossomos B em peixes Neotropicais da família Crenuchidae, gênero <i>Characidium</i> .....	147
<b>4.9 Capítulo 9-</b> Diferenciação e evolução dos cromossomos sexuais no sistema ZZ-ZW em espécies de peixes do gênero <i>Characidium</i> (Osthariophisi, Crenuchidae): microdissecção do cromossomo W.....	164
<b>Considerações finais</b> .....	185
<b>Referências Bibliográficas</b> .....	190

## 1 Introdução

### 1.1 Considerações sobre a citogenética de peixes e a microdissecção cromossômica

Os estudos citogenéticos tiveram um grande desenvolvimento nos últimos anos, devido basicamente à utilização de novas técnicas para análise cromossômica, o que tem possibilitado à Citogenética contribuir mais efetivamente não só para estudos taxonômicos e filogenéticos como também para uma maior compreensão da estrutura cromossômica. Estes avanços técnicos têm se refletido também nos estudos citogenéticos em peixes, resultando numa expansão considerável do número de espécies estudadas nos últimos anos. Da região Neotropical já foram analisadas cerca de 1040 espécies de peixes de água doce, sendo 475 espécies da ordem Characiformes, 318 espécies de Siluriformes, 48 espécies de Gymnotiformes e 199 espécies que não pertencem a superordem Ostariophysi (revisão em Oliveira *et al.*, 2007). Este levantamento aponta ainda que cromossomos supranumerários foram descritos para 38 espécies e que cromossomos sexuais foram relatados para 62 espécies, sendo 40 espécies com heterogametia feminina e 22 espécies com heterogametia masculina. Estes resultados mostram um aumento substancial das informações cariotípicas se comparado ao levantamento realizado por Oliveira *et al.* (1988a). No entanto, esses dados são ainda incipientes se considerar que possam existir cerca de 6.000 espécies de peixes distribuídas nessa região biogeográfica (Reis *et al.*, 2003).

Em peixes, a crescente aplicação de técnicas de bandamento cromossômico, notadamente as de bandas C e bandas de endonucleases de restrição, o emprego de fluorocromos base específicos, como a Cromomicina A<sub>3</sub> e o DAPI, permitiram não só uma melhor caracterização da diversidade cariotípica, como também o entendimento das relações evolutivas existentes entre diferentes táxons (revisão em Almeida-Toledo *et al.*, 2000a). Ultimamente, o desenvolvimento de sondas específicas como as de genes ribossômicos e de histonas, constituídas por DNA de moderada repetitividade, ou as de DNA altamente repetitivo (DNA satélite) (Singer, 1982; Oliveira e Wright, 1998) e o advento da microdissecção cromossômica (Kao, 1990; Meltzer *et al.*, 1992), método que possibilita o isolamento direto de DNA de qualquer região citogeneticamente reconhecida, tem possibilitado a hibridização em cromossomos metafásicos, através da técnica denominada FISH (Hibridação Fluorescente *in situ*). Esse tipo de abordagem citogenética em nível

molecular permite, ao se estudar porções diferenciais da cromatina nos cromossomos, obter informações mais precisas acerca da presença ou não de determinadas sequências de DNA, detectar rearranjos cromossômicos, determinar a origem de cromossomos, construir mapas gênicos e até mesmo estabelecer relações filogenéticas (revisão em Phillips e Reed, 1996; Oliveira e Wright, 1998; Henning *et al.*, 2008a).

O estudo citogenético contínuo e sistemático de determinados grupos de peixes tem levado ao esclarecimento de questões taxonômicas, à identificação de espécies crípticas, assim como a um melhor entendimento tanto da estrutura e variabilidade cromossômica quanto dos processos evolutivos que envolvem o cariótipo dos peixes Neotropicais (Oliveira *et al.*, 2007). Esse tipo de abordagem tem sido aplicado, por exemplo, em peixes da Ordem Gymnotiformes, notadamente em espécies do gênero *Eigenmannia*. Análises citogenéticas realizadas nesse grupo, a partir do final da década de setenta, revelaram que, a despeito da ocorrência de uma única espécie, *Eigenmannia virescens*, para os rios de várias bacias brasileiras, na realidade trata-se de um complexo de espécies, com a ocorrência de cinco citótipos na bacia superior do rio Paraná, dois citótipos no rio São Francisco, três na região Amazônica, além de um extenso polimorfismo cromossômico na ilha de Marajó. Além de esclarecimentos citotaxonômicos, os estudos citogenéticos nesse grupo evidenciaram a ocorrência de distintos sistemas de cromossomos sexuais morfologicamente diferenciados na maioria dos citótipos (revisão em Almeida-Toledo e Foresti, 2001). A aplicação de técnicas moleculares em alguns desses citótipos, como a marcação pelos fluorocromos Cromomicina A<sub>3</sub> e Mitramicina, permitiram caracterizar em duas das espécies desse complexo, as regiões heterocromáticas ligadas aos cromossomos sexuais como sendo regiões ricas em pares de bases GC. Do mesmo modo, a aplicação de fluorocromos e endonucleases de restrição, aliada as técnicas de coloração convencional, trouxe esclarecimentos acerca dos mecanismos envolvidos na formação do cromossomo Y em *Eigenmannia* sp2, corroborando com uma hipótese anteriormente postulada, que sugeria que nessa espécie a diferenciação sexual estaria realmente relacionada a regiões cromossômicas GC positivas (Almeida-Toledo *et al.*, 2000b).

O estudo sistematizado de outros grupos de peixes, como os efetuados em *Hoplias malabaricus* (síntese em Bertollo *et al.*, 2000; Born e Bertollo, 2002), *Astyanax* (síntese em Kavalco, 2008), *Corydoras* (Oliveira *et al.*, 1988b; 1992), *Triportheus* (Artoni *et al.*, 2001; Artoni e Bertollo, 2002; Diniz *et al.*, 2008) dentre outros, também tem trazido importantes informações cariotípicas, muitas vezes esclarecedoras de questões genético-evolutivas relacionadas aos peixes Neotropicais.

A técnica de microdissecção cromossômica foi introduzida inicialmente em citogenética humana (Bates *et al.*, 1986), com a construção de uma biblioteca do cromossomo dois usando-se muitos fragmentos cromossômicos dissecados de metáfases não coradas ou bandeadas. Posteriormente, Ludecke *et al.* (1989) publicaram um procedimento de microdissecção no qual foi utilizada a técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) para amplificar as pequenas quantidades de DNA dos fragmentos cromossômicos dissecados. Esse método foi aperfeiçoado por Senger *et al.* (1990) que dissecaram com sucesso bandas específicas de cromossomos bandeados com a técnica GTG. No início da década de 90, Meltzer *et al.* (1992) e Deng *et al.* (1992) desenvolveram a técnica denominada micro-FISH, na qual a microdissecção cromossômica é seguida pela amplificação do material dissecado via PCR utilizando-se um *primer* degenerado (DOP - *Degenerated Oligonucleotide Primer*). O produto desses PCRs passou então a ser utilizado como sonda para FISH.

A técnica de micro-FISH permite a localização cromossômica de sequências específicas, a detecção de anormalidades cromossômicas e a “pintura” de cromossomos inteiros (Trask, 1991). Em humanos, esta técnica, aliada às metodologias de citogenética clássica tem sido uma poderosa ferramenta da genética clínica na caracterização de complexos rearranjos cromossômicos (Meltzer *et al.*, 1992; Wiltshire *et al.*, 2001; Nuntakarn *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 2004). No contexto da evolução cromossômica, a metodologia de micro-FISH tem sido utilizada na identificação dos rearranjos cromossômicos envolvidos no processo evolutivo de primatas (Neusser *et al.*, 2005), cervídeos (Li *et al.*, 2005), roedores (Marchal *et al.*, 2004) e insetos (Teruel *et al.*, 2009), entre outros.

A compactação do genoma dos vertebrados de sangue frio distingue-se consideravelmente quando comparada a dos vertebrados de sangue quente e essa diferença seria uma das dificuldades que impossibilitaria a obtenção de bandas longitudinais estruturais nos cromossomos dos peixes (Galetti Jr. e Martins, 2004). Essa impossibilidade ocasionou um *gap* em relação à nomenclatura, pareamento e descrição de processos estruturais que envolvem determinadas regiões cromossômicas em peixes (Paiva *et al.*, 2009). Levando-se em consideração que a pintura cromossômica tem sido amplamente utilizada em estudos citogenéticos e evolutivos em outros grupos, ela pode caracterizar-se como uma tecnologia muito promissora a ser empregada na análise de homologies e diferenciação cromossômica em peixes.

Os primeiros trabalhos envolvendo microdissecção cromossômica em citogenética de peixes Neotropicais envolveram os cromossomos sexuais de representantes do gênero *Eigenmannia* e *Triportheus*. Henning *et al.* (2008b), produziram sondas para hibridação *in*

*situ* fluorescente a partir do cromossomo sexual X de *Eigenmannia virescens* ( $2n=38$  cromossomos) e do Y de *Eigenmannia* sp2 ( $2n=31$ , 32 cromossomos). A hibridação *in situ* do cromossomo X de *E. virescens* em sua população mais próxima (também com 38 cromossomos, mas sem sistema cromossômico sexual diferenciado) mostrou que o cromossomo X é homólogo a um par de acrocêntricos, condizente com o modelo proposto para diferenciação dos cromossomos sexuais por acúmulo de heterocromatina. Já a hibridação desta mesma sonda em *Eigenmannia* sp2, que também possui sistema sexual múltiplo, mostrou apenas marcações em um par de cromossomos acrocêntricos. Por outro lado, a sonda produzida a partir do cromossomo Y de *Eigenmannia* sp2 e hibridada em *Eigenmannia virescens* ( $2n=38$ , XY), mostrou marcações em um par de metacêntricos e em um par de acrocêntricos. Em ambos os casos, os cromossomos sexuais não foram marcados pelas sondas, revelando a não existência de homologia entre os cromossomos sexuais destas espécies/citótipos. Estes dados revelam ainda que os sistemas XY em representantes do gênero *Eigenmannia* não são homólogos, mas que possivelmente deram suporte aos rearranjos cromossômicos propostos para explicar a origem dos cromossomos sexuais neste gênero (Henning *et al.*, 2008).

Em outro estudo, Diniz *et al.* (2008) utilizaram uma sonda elaborada após microdissecção do cromossomo Z de *Triporthus nematurus*, que foi hibridada sobre os cromossomos de várias outras espécies deste mesmo gênero (*T. trifurcatus*, *T. guentheri*, *T. cf. signatus*, *T. albus*, *T. angulatus*, *T. nematurus*). Nos machos, observou-se uma hibridação completa do cromossomo Z, ou seja, a sonda sintetizada teve homologia total entre estas espécies. Nas fêmeas, além da hibridação completa do cromossomo Z, o cromossomo W mostrou sinais reduzidos de hibridação distribuídos preferencialmente nos braços curtos e na região intersticial dos braços longos desse cromossomo, variando de acordo com a espécie analisada. Os testes de hibridação da sonda Z em outros gêneros de Characidae (*Chalceus* sp, *Brycon* sp, *Astyanax scabripinnis*, *Astyanax fasciatus* e *Salminus hilarii*) foram sempre negativos. A ausência de hibridação da sonda Z de *Triporthus* nos cromossomos das espécies dos demais gêneros testados, além de evidenciar claramente a independência na diferenciação dos cromossomos sexuais, reforça também a proposta de que o sistema ZZ/ZW deve representar, de fato, uma condição sinapomórfica característica no gênero *Triporthus*, possivelmente pré-datando a especiação neste grupo. Diante destes resultados, associados aos dados anteriormente obtidos (Artoni *et al.*, 2001; Artoni e Bertollo, 2002), a hipótese de que o cromossomo Z é conservado em *Triporthus* e que o cromossomo W das diferentes espécies



mostra-se em processo de diferenciação, tanto em relação ao tamanho quanto à distribuição da heterocromatina, foi confirmada.

Neste sentido, a microdissecção cromossômica caracteriza como um método confiável para o isolamento direto de DNA de qualquer região citogeneticamente reconhecida. O material dissecado pode ser usado para várias aplicações, incluindo o estabelecimento de sondas para FISH, construção de bibliotecas cromossômicas bandas-específicas e o mapeamento físico dos cromossomos para análise citogenética.

## **1.2 O gênero *Characidium*: características taxonômicas e citogenéticas**

O gênero *Characidium* é o mais especioso da subfamília Characidiinae (Crenuchidae) e é constituído por cerca de 50 espécies de peixes reconhecidas como válidas e com ampla distribuição na região Neotropical, ocorrendo desde o Panamá (*Characidium marshi*) até a Argentina (*Characidium rachovii*) (Buckup, 2003). A posição filogenética desse grupo tem-se apresentada problemática desde a descrição das primeiras espécies de Characidiinae, pois já foi considerado como membro de Hemiodontidae, como subfamília de Characidae e também como família independente. No entanto, alguns estudos utilizando a metodologia cladística sugerem que Characidiinae compõe, juntamente com Crenuchinae, a família Crenuchidae (Buckup, 1998).

Embora existam publicações acerca da taxonomia (Buckup e Reis, 1997; Buckup e Hahn, 2000) e sistemática (Buckup, 1993; Buckup, 1998) dos characidiíneos, os estudos citogenéticos neste grupo são escassos, restringindo-se somente a algumas espécies de *Characidium* (Miyazawa e Galetti Jr., 1994; Maistro *et al.*, 1998 e 2004; Centofante *et al.*, 2001 e 2003; Silva e Maistro, 2006; Vicari *et al.*, 2008 e Noletto *et al.*, 2009). As espécies analisadas até o momento apresentam macroestrutura cariotípica bastante conservada, com número diplóide constante de  $2n=50$  e predominância de cromossomos dos tipos meta e submetacêntricos. Por outro lado, a identificação de sistema ZZ-ZW de diferenciação sexual (Maistro *et al.*, 1998 e 2004; Centofante *et al.*, 2001 e 2003; Noletto *et al.*, 2009), a ocorrência de cromossomos supranumerários (Maistro *et al.*, 1998) e a presença de RONS (regiões organizadoras de nucléolo) em diferentes cromossomos do cariótipo (Maistro *et al.*, 1998; Vicari *et al.*, 2009) e até mesmo a ocorrência de indivíduos poliplóides (Centofante *et al.*, 2001), evidenciam a grande variabilidade existente na estrutura cromossômica de determinadas espécies de *Characidium*.

As variações cariotípicas observadas em diferentes espécies de *Characidium* estão relacionadas principalmente a eventos cromossômicos envolvendo a heterocromatina constitutiva e parecem convergir para a formação de dois grupos de espécies neste gênero. Um primeiro grupo caracteriza-se por apresentar heterocromatina restrita às regiões pericentroméricas e/ou teloméricas dos cromossomos e ausência de sistema cromossômico de diferenciação sexual, constituído por espécies capturadas em rios da bacia do Tietê, como *Characidium cf. zebra*, (Miyazawa e Galetti Jr., 1994), da bacia do Mogi-Guaçu, *Characidium cf. zebra*, *Characidium* sp. E *Characidium cf. lagsantensis* (Miyazawa e Galetti Jr., 1994), da bacia do rio Grande, *Characidium cf. zebra*, (Centofante *et al.*, 2001) e da bacia do rio Paraíba do Sul, *Characidium lauroi* (Centofante *et al.*, 2003). Por outro lado, espécies pertencentes a rios da bacia do Paranapanema, como *Characidium* sp. *aff. C. gomesi*, (Maistro *et al.*, 2004) e *Characidium cf. gomesi* (Vicari *et al.*, 2008), da bacia do rio Grande, *Characidium gomesi*, (Centofante *et al.*, 2001), da bacia do Paraíba do Sul, *Characidium* sp. *cf. C. alipioi*, (Centofante *et al.*, 2003) e dos rios costeiros, *Characidium lanei*, (Noletto *et al.*, 2009), constituem um segundo grupo, pois evidenciam, além da heterocromatina pericentromérica e telomérica observada nos representantes do primeiro grupo, também grandes blocos intersticiais e/ou terminais e sistema cromossômico de diferenciação sexual do tipo ZZ-ZW.

Neste último grupo, a heterocromatinização parcial ou até mesmo total observada em um dos cromossomos do par sexual, o cromossomo W, é uma característica comum a todas as espécies analisadas (Vicari *et al.*, 2008; Noletto *et al.*, 2009). No entanto, o padrão de distribuição dessa heterocromatina constitutiva neste cromossomo sexual, assim como em alguns pares de autossomos indica que possam ter ocorrido eventos de diferenciação cromossômica posteriores ao possível surgimento desse sistema cromossômico sexual ancestral. Estudos recentes têm sugerido que a formação dos sistemas cromossômicos de diferenciação sexual em peixes seja decorrente de eventos evolutivos independentes (Devlin & Nagahama, 2002), como observado em representantes do gênero *Eigenmannia* (Henning *et al.*, 2008b), *Oryzias* (Takehana *et al.*, 2007) e alguns gêneros de salmão (Phillips *et al.*, 2001) grupos nos quais não se observa homologia entre os cromossomos sexuais existentes, apontando para uma origem independente destes sistemas. Aparentemente, a origem e diferenciação do sistema de cromossomos sexuais em *Characidium* mostram-se similares à origem e a diferenciação do sistema sexual dos representantes do gênero *Triportheus*, no qual a presença de um sistema de cromossomos ZZ-ZW tem sido observada em todas as espécies analisadas, com a existência de um cromossomo W em distintos processos de diferenciação e

com o cromossomo Z apresentando significativa homologia em diferentes espécies (Artoni *et al.*, 2001; Diniz *et al.*, 2008).

Os estudos mais específicos da heterocromatina constitutiva em espécies de *Characidium* foram os realizados em *Characidium* sp. aff. *C. gomesi* (Maistro *et al.*, 1998; 2004) e *Characidium lanei* (Noletto *et al.*, 2009), espécies pertencentes ao segundo grupo deste gênero, como referido anteriormente. Em *Characidium lanei* (Noletto *et al.*, 2009) a heterocromatina dos cromossomos Z e W, evidenciada pelo fluorocromo DAPI, mostrou-se rica em pares de bases AT. No entanto, a utilização do fluorocromo CMA<sub>3</sub> evidencia nestes mesmos cromossomos sexuais, que regiões heterocromáticas ricas em AT co-existem com frações de DNA ricas em pares de bases GC. Na análise de Maistro *et al.* (1998 e 2004), a cromomicina A<sub>3</sub> marcou, além das RONS, as regiões terminais dos braços longos de pequenos cromossomos B. Estas marcações nos cromossomos supranumerários correspondem apenas a regiões ricas em pares de bases GC e não a RONS, corroborando resultados comumente obtidos nesse tipo de estudo em diversas espécies de peixes (Artoni *et al.*, 1999). O emprego de técnicas citogenéticas básicas, como a marcação pelo nitrato de prata e molecular, como a hibridização fluorescente *in situ* (FISH) com sondas de rDNA 18S, foram determinantes na identificação dessas marcações CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> dos cromossomos supranumerários como não relacionadas à cístrons ribossomais. Esses dados moleculares, resultantes da utilização de fluorocromos base-específicos e da técnica FISH, evidenciaram a existência de pelo menos duas porções heterocromáticas distintas nesta espécie: uma GC<sup>+</sup>, que se encontra restrita aos cromossomos B e também associada às RONS e outra porção GC<sup>-</sup>, encontrada nas regiões pericentroméricas dos autossomos e em toda a extensão do cromossomo W.

O estudo citogenético da heterocromatina constitutiva, comumente identificada através da técnica de banda C, tem evidenciado sua distribuição principalmente nas regiões centroméricas e teloméricas dos cromossomos de peixes e, menos frequentemente, na posição intersticial (Gold *et al.*, 1990). Contudo, estudos demonstram que em diversos gêneros e espécies da região Neotropical, essa porção cromatínica está amplamente distribuída pelos cromossomos e que pode ser muito abundante nos cariótipos de algumas espécies, indicando tratar-se de uma característica relativamente comum aos cromossomos de peixes desta região. (Margarido e Galetti Jr., 2000; Andreato *et al.*, 2006).

Embora novas informações tenham surgido ultimamente sobre a fisiologia do DNA que constitui a heterocromatina (Weiler e Wakimoto, 1995; Dimitri, 1997), de modo geral existem poucas evidências quanto ao papel funcional desse tipo de cromatina. No entanto, tem-se verificado que a heterocromatina constitutiva parece desempenhar papel de grande

importância no processo de especiação e, conseqüentemente, na diferenciação de várias taxa. Em peixes, essa relação foi observada em *Leporinus* (Galetti Jr. *et al.*, 1991a; 1991b), em *Otocinclus affinis* (Andreatta *et al.*, 1994), em *Corydoras* (Oliveira *et al.*, 1993) e em *Hisonotus leucofrenatus*, onde a identificação de padrões populacionais distintos de heterocromatina constitutiva parece constituir-se num fator de diferenciação que pode configurar um processo incipiente de especiação (Andreatta, 2002).

A utilização de fluorocromos base-específicos na caracterização da heterocromatina observada nos cromossomos de peixes tem fornecido valiosas informações acerca dessa porção cromatínica. A aplicação de Mitramicina nos cromossomos de *Leporinus desmotes* evidenciou a ocorrência de dois tipos de heterocromatina, dos quais, um deles, GC<sup>+</sup> e presente em grande quantidade no complemento cromossômico dessa espécie, poderia ter surgido a partir de ampliações de um segmento de DNA repetitivo encontrado associado às RONS (Margarido e Galetti Jr., 2000). A natureza heterogênica da heterocromatina constitutiva foi também observada nos cromossomos de *Liposarcus anisitsi* e *Leporinus elongatus* (Artoni *et al.*, 1999) e em *Astyanax scabripinnis*, onde foram observadas três diferentes porções dessa cromatina, distintas quanto à composição molecular: uma primeira, não marcada por fluorocromos GC ou AT específicos e que se encontra distribuída nas regiões pericentroméricas dos cromossomos; uma segunda, GC<sup>+</sup> e localizada associada às RONS e; uma última, que se mostra DAPI- quando o contracolorante utilizado é a Distamicina A, mas que se apresenta sem nenhuma diferenciação quando não há aplicação de contracolorantes, correspondentes a grandes blocos de heterocromatina constitutiva (Souza *et al.*, 1996). Esses dados evidenciam a variabilidade da heterocromatina constitutiva em peixes e podem refletir as diferentes alternativas evolutivas observadas nos cariótipos de peixes.

O estudo molecular da heterocromatina em outro grupo de peixes, em representantes do gênero *Eigenmannia*, permitiu evidenciar que o processo de translocação Robertsoniana, que deu origem ao neo-Y do sistema cromossômico X<sub>1</sub>X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>2</sub>-X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>Y, observado nas espécies *Eigenmannia* sp. 2 e *E. virescens*, envolveu regiões marcadas pelos fluorocromos Cromomicina A<sub>3</sub> e Mitramicina, indicando que a determinação do sexo nessas espécies envolve regiões ricas em pares de bases GC (Almeida Toledo *et al.*, 2000a). Contrariamente, *Poecilia sphenops* var. *melanistica* apresenta blocos ricos em pares de bases AT relacionados à determinação sexual (Haaf e Schmid, 1984).

O desenvolvimento de sondas de DNA repetitivo, com posterior hibridização *in situ* em cromossomos metafásicos (FISH) tem fornecido importantes informações acerca da evolução cariotípica. A identificação de sequências teloméricas (TTAGGG) em regiões

intersticiais e associadas à RONS nos cromossomos de *Salvelinus*, sugere que rearranjos do tipo translocação/fusão possam ter dado origem a esses cromossomos, assim como também evidencia uma possível atividade de transposição das RONS em representantes deste gênero (Reed e Phillips, 1995).

Do mesmo modo, a elaboração de sondas de DNA satélite altamente repetitivo constituinte de regiões heterocromáticas indicou que uma sequência satélite de *Oreochromis niloticus* denominada SATA, de aproximadamente 237 pares de bases, encontra-se presente em praticamente todas as regiões centroméricas dos cromossomos, enquanto uma outra sequência, SATB, de 1900 pares de bases, encontra-se bem menos representada no cariótipo desta espécie. No entanto, nem toda heterocromatina de *O. niloticus* identificada pela banda C hibridiza com essas duas sondas, indicando existir outros tipos de DNA satélite (Oliveira e Wright, 1998). A análise do DNA de outros ciclídeos indica que SATA é um satélite abundante e comum a várias espécies, ao passo que SATB restringe-se a apenas um grupo particular de espécies, indicando proximidade filogenética entre essas últimas (Franck e Wright, 1993; Franck *et al.*, 1994).

Em *Parodon hilarii*, a hibridização *in situ* da sonda de DNA repetitivo RI2004, de cerca de 200 pb, em cromossomos metafásicos permitiu identificar homologias entre o cromossomo sexual W e alguns autossomos (Vicente *et al.*, 2003). Já em *Prochilodus lineatus*, a localização cromossômica da sequência de DNA repetitivo denominada SATH1 foi observada na região pericentromérica de um grupo de cromossomos do complemento A, bem como distribuída nos cromossomos supranumerários, o que reforça a hipótese de origem dos cromossomos B, ao menos nesta espécie, a partir dos autossomos (Jesus *et al.*, 2003).

No gênero *Hisonotus*, a heterocromatina constitutiva exerce um papel fundamental na diversificação cromossômica de espécies e populações (Andreatta *et al.*, 2006). Populações de *Hisonotus leucofrenatus* apresentam cariótipos com grande quantidade e distribuição variável de heterocromatina, o que permitiu a identificação de seis citótipos. A análise molecular do DNA dessa espécie, através do isolamento, clonagem, sequenciamento e hibridação *in situ* fluorescente de uma sonda de DNA satélite, mostrou que esse segmento está localizado nas regiões de heterocromatina polimórfica que caracteriza os diferentes citótipos. A hibridação em membrana dessa sonda com o DNA de espécies relacionadas evidenciou que essa sequência é exclusiva dessa espécie, na qual exerce um papel preponderante no processo de diferenciação cromossômica (Andreatta *et al.*, 2006).

A aplicação das técnicas básicas de citogenética, notadamente a banda C, associadas às mais refinadas, denominadas moleculares, traz informações tanto acerca da estrutura e

organização cromossômica quanto esclarecimentos de questões genético-evolutivas do cariótipo de grupos de peixes.

Nesse sentido, o presente trabalho foi desenvolvido com objetivo de realizar estudos citogenético-moleculares, através desses dois conjuntos de técnicas de análise cromossômica, de espécies de *Characidium* pertencentes a diferentes bacias hidrográficas brasileiras, buscando-se determinar a extensão da ocorrência do sistema sexual ZZ-ZW e identificar a natureza da heterocromatina constitutiva, notadamente a relacionada aos cromossomos sexuais.

## 2 Objetivos

Os objetivos do presente trabalho consistiram em desenvolver a análise do cariótipo de espécies de peixes do gênero de *Characidium* que apresentam ou não sistema cromossômico de diferenciação sexual, enfocando os aspectos citogenéticos e moleculares, com a finalidade de:

- a) ampliar o conhecimento sobre este grupo de peixes, estabelecendo e comparando a constituição cariotípica de espécies que ocorram principalmente nos componentes das bacias hidrográficas da região Sul e Sudeste do Brasil;
- b) caracterizar, do ponto de vista molecular, a heterocromatina constitutiva, principalmente aquela relacionada aos cromossomos sexuais nas diferentes espécies, por meio da aplicação de fluorocromos base-específicos;
- c) caracterizar os polimorfismos cromossômicos relacionados ao sexo nas espécies deste grupo, identificando sua origem e os mecanismos determinantes da diversificação dos cromossomos sexuais em peixes;
- d) caracterizar a origem da porção cromatínica nestas espécies, através da obtenção de sondas de DNA repetitivo e da aplicação da técnica de FISH;
- e) contribuir com informações cariotípicas para a taxonomia desse grupo, bem como dos mecanismos envolvidos no processo de diversificação, no sentido de esclarecer possíveis relações evolutivas entre as espécies.

### 3. Materiais e métodos

#### 3.1 Materiais

No presente trabalho foram analisadas onze espécies de peixes do gênero *Characidium*, de ocorrência em componentes de diferentes bacias hidrográficas brasileiras, *Characidium cf. zebra*, *Characidium cf. gomesi*, *Characidium lanei*, *Characidium pterostictum*, *Characidium lauroi*, *Characidium oiticicai*, *Characidium schubarti*, *Characidium alipioi*, *Characidium sp1*, *Characidium sp2* e *Characidium sp3*. A espécie *Characidium cf. zebra* teve cinco populações analisadas, *Characidium cf. gomesi* teve quatro populações analisadas, *Characidium pterostictum* teve cinco populações analisadas e as demais espécies, uma única população analisada (Tabela 1). Os locais de coleta estão indicados na Figura 1.

#### 3.2 Métodos

Na análise citogenética convencional foram utilizados os métodos de estimulação de mitoses (Cole e Levans, 1971), preparação direta de células renais (Foresti *et al.*, 1981), marcação das Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONs) com nitrato de Prata (Howell e Black, 1980) e identificação da heterocromatina constitutiva (Sumner, 1972).

Na análise citogenética molecular foram utilizados os métodos de identificação de regiões cromossômicas ricas em GC, com o uso do fluorocromo Cromomicina A<sub>3</sub> (Schweizer, 1976); identificação de regiões cromossômicas ricas em AT pelo fluorocromo DAPI (Schweizer *et al.*, 1978) e localização cromossômica de DNAr 18S e 5S, localização do gene para histona H<sub>1</sub>, localização cromossômica das sequências teloméricas (TTAGGG)<sub>n</sub> e localização de sondas específicas para os cromossomos W e Bs, obtidas por microdissecção e pintura cromossômica.

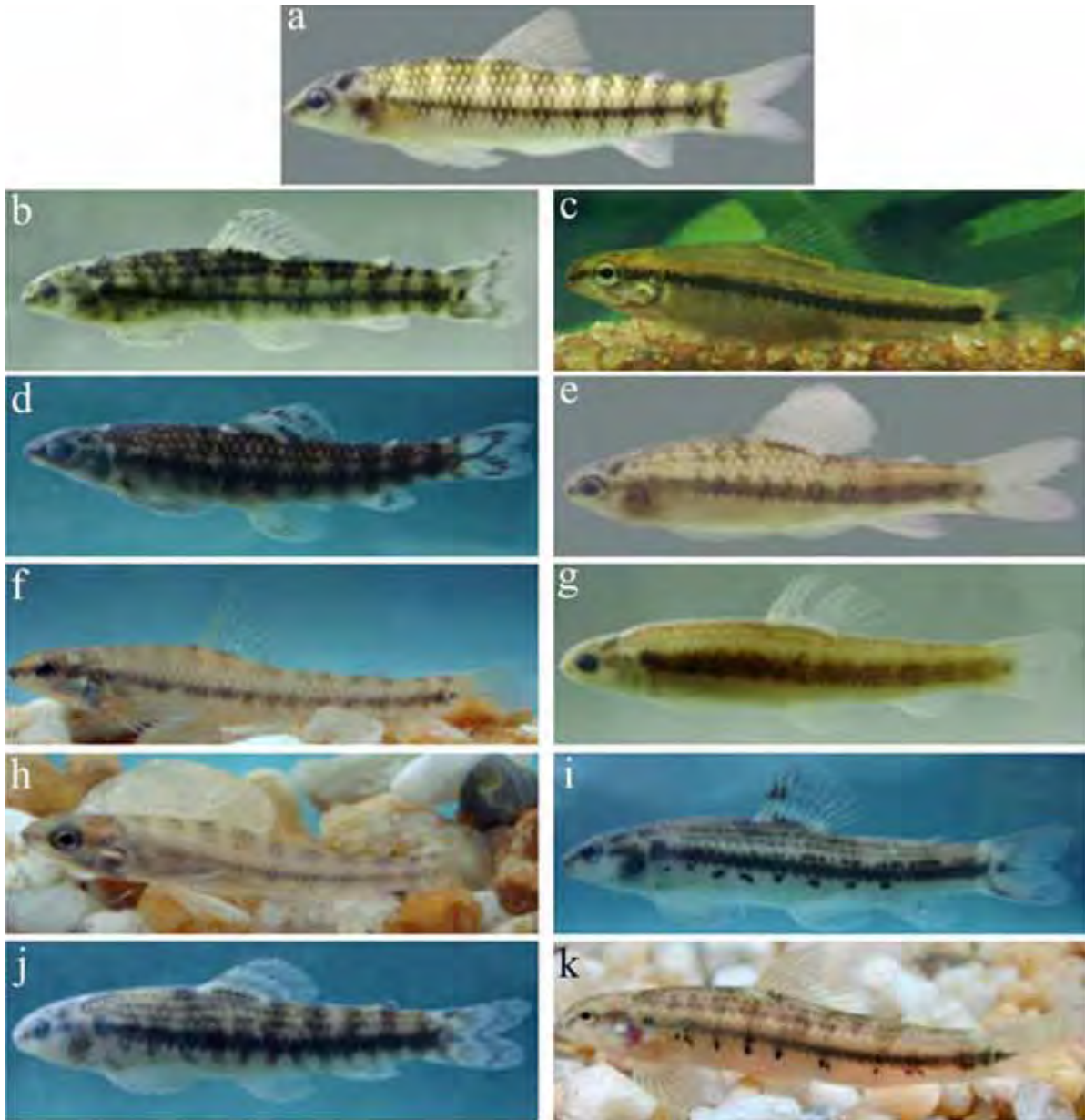
**Tabela 1** - Exemplos de *Characidium* analisados neste estudo. LBP: Coleção de Peixes Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, Instituto de Biociências, UNESP. F: fêmeas; M: machos.

Espécies	LBP	Localidade	F	M	Coordenadas
<i>C. cf. gomesi</i>	6723	Rio Alambari – Botucatu – SP	22	8	S 22°56'06 W 48°19'18
<i>C. cf. gomesi</i>	6733	Rio Novo – Avaré – SP	18	8	S 23°01'26 W 48°49'32
<i>C. cf. gomesi</i>	9021	Rio S. Domingos – Muzambinho – MG	6	4	S 21°20'47 W 46°28'08
<i>C. cf. gomesi</i>	9019	Rio Vermelho – Tangará da Serra – MT	8	5	S 14°35'25 W 57°42'35
<i>C. cf. zebra</i>	8704	Rio Paraitinga – Salesópolis – SP	15	7	S 23°30'40 W 45°51'32
<i>C. cf. zebra</i>	8714	Rio Alambari – Botucatu – SP	25	10	S 22°56'06 W 48°19'18
<i>C. cf. zebra</i>	6727	Rio Novo – Avaré – SP	10	4	S 23°01'26 W 48°49'32
<i>C. cf. zebra</i>	8715	Rio Araquá – Botucatu – SP	8	5	S 22°47'13 W 48°28'89
<i>C. cf. zebra</i>	8533	Rio Juba – Nova Fernandópolis – MT	6	5	S 14°58'23 W 57°44'40
<i>C. pterostictum</i>	8710	Rio Betari – Apiai – SP	15	5	S 24°33'73 W 48°40'16
<i>C. pterostictum</i>	6831	Rio Faú – Miracatu – SP	6	2	S 24°12'44 W 47°28'61
<i>C. pterostictum</i>	768	Rio Cari – Morretes – PR	8	4	S 25°29'19 W 48°49'97
<i>C. pterostictum</i>	8701	Rio Jacareí – Paranaguá – PR	8	3	S 25°32'23 W 48°41'19
<i>C. pterostictum</i>	737	Rio Cavalo – Jaraguá do Sul – SC	4	1	S 26°28'25 W 49°10'95
<i>C. lanei</i>	8700	Rio Cari – Morretes – PR	11	7	S 25°26'29 W 48°32'28
<i>C. schubarti</i>	8702	Rio Cinco Réis – Jaguariaiva – PR	10	7	S 25°17'46 W 49°44'56
<i>C. lauroi</i>	8741	Rio Grande – Ubatuba – SP	4	1	S 23°23'42 W 45°07'17
<i>C. oiticicai</i>	8703	Rio Paraitinga – Salesópolis – SP	15	5	S 23°30'40 W 45°51'32
<i>C. alipioi</i>	8378	Rio Pomba – Sta Bárbara Tugúrio - MG	7	3	S 21°14'79 W 43°34'12
<i>Characidium</i> sp1	6818	Rio Preto – Itanhaém – SP	18	8	S 24°10'39 W 46°50'56
<i>Characidium</i> sp2	9018	Rio Vermelho – Tangará da Serra – MT	6	2	S 14°35'25 W 57°42'35
<i>Characidium</i> sp3	8598	Rio Arinos – Nova Mutum – MT	6	-	S 13°48'03 W 56°01'38





**Figura 1** - Mapa indicando os locais de coleta de espécies e populações de *Characidium*. 1. Rio Arinos, Nova Mutum (MT) - *Characidium* sp3; 2. Rio Vermelho, Tangará da Serra (MT) - *Characidium* sp2 e *Characidium cf. gomesi*; 3. Rio Juba, Nova Fernandópolis (MT) - *Characidium cf. zebra*; 4. Rio Pomba, Santa Bárbara do Tugúrio (MG) - *Characidium alipioi*; 5. Rio São Domingos, Muzambinho (MG) *Characidium cf. gomesi*; 6. Ribeirão Cavallo, Jaraguá do Sul (SC), *Characidium pterostictum*; 7. Rio Grande, Ubatuba (SP) - *Characidium lauroi*; 8. Rio Paratinguinha, Salesópolis (SP) - *Characidium oiticicai* e *Characidium cf. zebra*; 9. Rio Preto, Itanhaém (SP) - *Characidium* sp1; 10. Rio Betari, Apiaí (SP) - *Characidium pterostictum*; 11. Riacho Cari, Morretes (PR) - *Characidium pterostictum* e *Characidium lanei*; 12. Rio Jacareí, Paranaguá (PR) - *Characidium pterostictum*; 13. Rio Cinco Réis, Jaguariaiva (PR) - *Characidium schubarti*; 14. Rio Novo, Avaré (SP) - *Characidium cf. gomesi* e *Characidium cf. zebra*; 15. Rio Alambari, Botucatu (SP) - *Characidium cf. gomesi* e *Characidium cf. zebra*; 16. Rio Araquá, Botucatu (SP) - *Characidium cf. zebra*; 17. Rio Faú, Miracatu (SP) - *Characidium pterostictum*.



**Figura 2** - Exemplos de *Characidium* estudados no presente trabalho. a) *Characidium cf. zebra*, 55 mm; b) *Characidium cf. gomesi*, 72 mm; c) *Characidium lanei*, 65 mm; d) *Characidium alipioi*, 71 mm; e) *Characidium sp1*, 60 mm; f) *Characidium sp2*, 65 mm; g) *Characidium oiticicai*, 62 mm; h) *Characidium sp3*, 36 mm; i) *Characidium schubarti*, 75 mm; j) *Characidium pterostictum*, 70 mm; k) *Characidium lauroi*, 68 mm.

### 3.2.1 Estimulação de Mitoses

Para obtenção de um maior número de mitoses foi utilizada a técnica de estimulação de divisão celular, por meio da inoculação intramuscular de fermento biológico, conforme técnica descrita por Cole e Levans (1971) para anfíbios e répteis e adaptada para peixes por Bertollo *et al.*, (1978) e Oliveira *et al.* (1988). O procedimento utilizado consiste em:

- 1) preparar uma solução de fermento biológico (Fleischmann) na seguinte proporção: 0,5 g de fermento, 0,5 g de açúcar e 7 ml de água destilada;
- 2) incubar a solução em uma estufa (37°C) por cerca de 10 min;
- 3) injetar a solução dorso-lateralmente no peixe na proporção de 1 ml por 100 g de peso do animal;
- 4) deixar o animal em aquário aquecido e bem aerado, por cerca de 48 horas.

Rim e brânquias foram utilizados para a obtenção de preparações cromossômicas, visando o estudo cariotípico das espécies.

### 3.2.2 Obtenção de Cromossomos Metafásicos

A técnica utilizada para obtenção de cromossomos metafásicos seguiu a descrição de Foresti *et al.* (1981), com algumas modificações. 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. O procedimento consiste em:

- 1) injetar, na região intra-abdominal, solução aquosa de colchicina (0,025%) na proporção de aproximadamente 1 ml / 100 g de peso do animal;
- 2) deixar o peixe em aquário bem aerado, por um período de 50 minutos;
- 3) sacrificar o animal, retirando o rim e as brânquias. Transferir o material para uma pequena cuba de vidro, contendo 6 ml de solução hipotônica de KCl (0,075M);
- 4) dissociar o material com o auxílio de pinças de dissecação, complementando esse processo com o auxílio de uma pipeta Pasteur, até obter uma solução aquosa homogênea;
- 5) transferir a suspensão obtida para um tubo de centrífuga e deixar o tubo no interior de uma estufa a 37°C por 21 min;

6) retirar da estufa, colocando 10 gotas de fixador gelado (metanol e ácido acético na proporção de 3:1, respectivamente); agitar levemente a mistura com uma pipeta Pasteur e deixar repousar por 5 min a temperatura ambiente;

7) adicionar cerca de 10 ml de fixador e novamente agitar a mistura; levar à centrífuga (1000 rpm) por 10 min;

8) retirar o sobrenadante e ressuspender o precipitado em 10 ml de fixador; centrifugar por 10 min a  $1.200 \pm 100$  rpm;

9) pingar o material em lâminas;

10) deixar secar ao ar.

As lâminas podem ser guardadas no congelador durante muito tempo, servindo, assim, para aplicação de várias técnicas de bandamento cromossômico.

### **3.2.3 Detecção das Regiões Organizadoras de Nucléolos (RONs) através da Impregnação com Nitrato de Prata ( $\text{AgNO}_3$ )**

Essa técnica caracteriza-se pela reação química da Prata metálica com as proteínas acídicas que compõem o complexo de proteínas nas Regiões Organizadoras de Nucléolos. O procedimento utilizado seguiu a técnica descrita originalmente por Howell e Black (1980), sendo utilizadas duas soluções:

- **Solução A (solução coloidal reveladora):** 1g de gelatina muito bem dissolvida em 50 ml de água destilada. Acrescenta-se 0,5 ml de ácido fórmico.

- **Solução B (solução de nitrato de Prata):** 1g de  $\text{AgNO}_3$  dissolvida em 2 ml de água destilada. Depois de preparadas essas soluções devem ser mantidas em frascos escuros, a 4°C.

O procedimento para a coloração das RONs é o seguinte:

1) hidrolisar o material por 3 min em HCl 1N a 60°C;

2) secar as lâminas. Pingar uma gota da solução A e duas gotas da solução B sobre o material na lâmina e cobrir com lamínula;

3) deixar as lâminas sobre um suporte, no interior de um banho-maria a 60°C. Em alguns minutos (aproximadamente 3), a mistura das soluções se torna marrom dourada. Lavar a lâmina em água destilada e deixar secar;

4) corar com Giemsa na proporção de 1:30 em tampão fosfato (pH = 6,7) por aproximadamente 10 segundos;

5) deixar secar ao ar.

### 3.2.4 Identificação da Heterocromatina Constitutiva

Essa técnica caracteriza-se pela ação sequencial de ácido, base e solução salina para eliminar seletivamente o DNA cromossômico, permanecendo intactas somente regiões de heterocromatina, mais compactadas. O procedimento foi seguido conforme descrito por Sumner (1972), com modificações, e consiste em:

- a) deixar a lâmina submersa em HCl 0,2 N por 25 minutos, a temperatura ambiente;
- b) lavar com água destilada, a temperatura ambiente;
- c) incubar a lâmina em solução de hidróxido de Bário 5%, a 60° C, por 5 a 15 segundos;
- d) lavar rapidamente em HCl 1 N, a 60° C, por alguns segundos;
- e) incubar a lâmina em 2xSSC, a 60° C, por 25 minutos;
- f) lavar com água destilada à temperatura ambiente;
- g) corar com Giemsa 5% por 10 minutos.

### 3.2.5 Identificação de Regiões Cromossômicas ricas em GC, pelo fluorocromo Cromomicina A<sub>3</sub>

Para a detecção das regiões cromossômicas ricas em pares de bases GC foi utilizada a técnica descrita por Schweizer (1976), com algumas modificações, empregando o fluorocromo CMA<sub>3</sub>. A técnica consiste em:

- a) incubar as lâminas em uma solução tampão McIlvaine + MgCl<sub>2</sub>, por 10 minutos;
- b) agitar a lâmina para retirar o excesso de tampão e pingar 2 ou 3 gotas de Cromomicina A<sub>3</sub> (0,5mg/ml). Cobrir com lamínula e deixar 15 minutos em câmara escura;
- c) lavar em tampão McIlvaine sem MgCl<sub>2</sub> para retirar a lamínula;
- d) incubar as lâminas em solução Metylgreen/Hepes-NaCl (12 mg/100ml), por 15 minutos;
- e) lavar as lâminas em solução Hepes-NaCl e, posteriormente, em H<sub>2</sub>O destilada;
- f) secar as lâminas no escuro e deixá-las em geladeira *overnight*;
- g) pingar uma gota de glicerol com 2,5% de propilgalato sobre cada gota de material;
- h) colocar lamínula e vedar as laterais com esmalte de unha;
- i) deixar as lâminas no escuro e em geladeira por 1 semana antes de analisar;
- j) observar e fotografar em microscopia de fluorescência.

### 3.2.6 Identificação de Regiões Cromossômicas ricas em AT, pelo fluorocromo DAPI

Para a detecção das regiões cromossômicas ricas em pares de bases AT foi usado o método descrito por Schweizer *et al.* (1978), que consiste em:

- a) colocar sobre as lâminas 150 µl de solução de Distamicina A recém preparada;
- b) cobrir com uma lamínula e deixar agindo por 15 minutos a temperatura ambiente;
- c) lavar a lâmina em tampão McIlvaine ( ou água destilada) para retirar a lamínula e deixar secar;
- d) mergulhar a lâmina em solução DAPI, recém preparada, por 15 minutos no escuro;
- e) lavar em tampão McIlvaine ou água destilada e deixar secar ao ar;
- f) pingar uma gota de glicerol com 2,5% de propilgalato sobre cada gota de material e colocar lamínula;
- g) observar e fotografar em microscopia de fluorescência.

### 3.2.7 Preparação das sondas de DNA para hibridação fluorescente *in situ* (FISH)

#### 3.2.7.1 Microdissecção

Os procedimentos para a microdissecção cromossômica (Mühlmann *et al.*, 1995) consistiram em:

1. Diluir uma alíquota da suspensão celular final no fixador (metanol: ácido acético na proporção 3:1), respectivamente.
2. Pingar a suspensão em lamínulas. Secar o material ao ar e corá-lo com solução Giemsa diluída a 5% em tampão fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,06M e  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,449M, pH 6.8) durante 8-10 minutos.
3. Lavar as lamínulas com água destilada e deixá-las secar ao ar.
4. Colocar a lamínula contendo a preparação celular num microscópio invertido (Axiovert 100 – Zeiss) e proceder a microdissecção dos cromossomos com o auxílio de uma agulha de vidro ligada a um micromanipulador mecânico (Eppendorf).
5. Colocar os cromossomos microdissecados num tubo de PCR.

### 3.2.7.2 DOP-PCR

Essa PCR consistiu numa amplificação inespecífica dos cromossomos microdissectados com o uso de um *primer* degenerado (DOP- *Degenerate Oligonucleotide Primer*) proposto por Telenius *et al.* (1992). A DOP-PCR compreendeu duas etapas de amplificação, uma de baixa estringência (primeira PCR) e outra de alta estringência (segunda PCR e PCR de marcação).

### 3.2.7.3 Primeira PCR

Na primeira amplificação, condições de baixas temperaturas permitem o anelamento do *primer* degenerado e a extensão de vários sítios no genoma.

Num tubo de 0,5ml, preparar um mix contendo os seguintes reagentes:

Água milli-Q autoclavada	6,0µL
Tampão Termosequenase (10x)	1,0µL
dNTP (2mM cada)	1,0µL
<i>Primer</i> DOP (10µM)	1,0µL

Após a adição dos cromossomos microdissectados ao tubo de 0,5mL, contendo 9,0µL mix de DOP-PCR, estes foram aquecidos 95°C por 10 min e centrifugados brevemente. Em seguida, acrescentou-se 1,0µL da enzima Termosequenase 4U/µl (Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit, USB). As amplificações foram realizadas num termociclador PTC-200<sup>TM</sup> Peltier Thermal Cycler (MJResearch, Inc) de acordo com as seguintes condições:

	94°C --3min
12 ciclos	94°C --1min e 30seg
	37°C --2min
	37°C --1min, subindo 0,2°C/seg até 72°C
	72°C --2min
30 ciclos	94°C --1min e 30 seg
	62°C --1min
	72°C --2min
	Manutenção a 4°C

Os produtos da reação de amplificação foram checados em gel de agarose a 1%.

### 3.2.7.4 Segunda PCR

A segunda amplificação foi preparada para um volume final de 50 $\mu$ L num tubo de 0,5mL, com os seguintes reagentes:

Água milli-Q autoclavada	30,0 $\mu$ L
Tampão da enzima (10x)	5,0 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	1,5 $\mu$ L
dNTP (2mM cada)	5,0 $\mu$ L
Primer DOP (10 $\mu$ M)	5,0 $\mu$ L
Taq (5U/ $\mu$ l)	0,5 $\mu$ L
DNA - Produto da 1 <sup>a</sup> PCR	3,0 $\mu$ l

Posteriormente, a amplificação foi realizada de acordo com as seguintes condições:

	90°C --3min	
30 ciclos	{	90°C --1min e 30 seg
		56°C --1min e 30seg
		72°C --1min e 30seg
		Manutenção a 4°C

Os produtos da reação de amplificação foram checados em gel de agarose a 1%.

### 3.2.7.5 PCR de marcação

Na PCR de marcação foram utilizados os reagentes descritos abaixo para um volume final de 50 $\mu$ L. As condições de amplificação foram as mesmas descritas para a segunda PCR.



Água milli-Q autoclavada	30,7µL
Tampão da enzima (10x)	5,0µL
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	1,5µL
dATP (2mM)	1,0µL
dCTP (2mM)	1,0µL
dGTP (2mM)	1,0µL
dTTP (2mM)	0,6µL
Digoxigenina-11-dUTP (1mM)	0,7µL
<i>Primer</i> DOP (10µM)	5,0µL
Taq (5U/µl)	0,5µL
DNA - Produto da 2ª PCR	3,0µL

Os produtos da reação de amplificação foram checados em gel de agarose a 1%.

### 3.2.7.6 Preparação da sonda telomérica

A sonda utilizada para detecção de sequências teloméricas foi amplificada e marcada por PCR, usando digoxigenina 11-dUTP (Roche Applied Science). Na ausência de DNA molde, foram usados *primers* (TTAGGG)<sub>5</sub> e (CCCTAA)<sub>5</sub>. A reação de amplificação foi preparada para um volume final de 50µL num tubo de 0,5mL, com os seguintes reagentes:

Água milli-Q autoclavada	37 µL
Tampão (10X)	5,0 µL
MgCl (50mM)	1,5 µL
dATP (2mM)	1,5 µL
dCTP (2mM)	1,5 µL
dGTP (2mM)	1,0 µL
dTTP (2mM)	0,7 µL
Digoxigenina-11-dUTP (1mM)	0,6 µL
<i>Primer</i> A (2µM)	1,0 µL
<i>Primer</i> B (2µM)	1,0 µL
Taq (5U/µL)	0,2 µL

A amplificação foi realizada num termociclador PTC-200™ Peltier Thermal Cycler (MJResearch, Inc) de acordo com as seguintes condições:

	95°C ---- 5min	
30 ciclos	{	95°C ---- 40seg
		50°C ---- 40seg
		72°C ---- 5 min
		15°C ----manutenção

Os produtos desta reação, checados em gel de agarose 1%, por serem grandes demais, foram cortados com DNase, em uma reação com volume final de 75 uL:

Produto – PCR	50,0 uL
Tampão (10X)	7,5 uL
DNase (0,1U/ uL)	1,0 uL
Água milli-Q autoclavada	16,5 uL

Os produtos gerados foram checados em gel de agarose 1%.

### 3.2.7.7 Preparação das sondas de DNAr 18S e 5S

Para o mapeamento dos sítios de DNAr 18S e 5S nos cromossomos metafásicos foram usadas a sonda de DNAr 18S obtida do peixe *Prochilodus argenteus* (Hatanaka e Galetti Jr., 2004) e sonda de DNAr 5S obtida a partir da espécie *Leporinus elongatus* (Martins e Galetti Jr., 1999). Para a amplificação, foram utilizados 2µl de DNA molde, 1,5µl de cada *primer*, juntamente com 5µl de tampão da enzima Taq polimerase (10X), 0,3µl de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 1,25µl de cada dNTPs (2mM cada), 0,5µl de Taq polimerase (5U/µL) e água Milli-Q q.s.p. 50 µl.

A sonda de DNAr 18S foi marcada com biotina 14-dATP por meio da reação de *nick translation* (BioNick Labeling System – Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante.

A sonda de DNAr 5S foi marcada com digoxigenina 11-dUTP (Roche Applied Science) por meio de uma reação de PCR e os parâmetros para marcação foram: 2µl de DNA molde, 1,5µl de cada *primer* (10µM), juntamente com 5µl de tampão da enzima Taq

polimerase (10X), 0,3µl de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 1,25µl de dATP, dCTP e dGTP e 0,8µl dTTP (2mM cada), 0,7µl de Digoxigenina-11-dUTP, 0,5µl de Taq polimerase (5U/µL) e água Milli-Q q.s.p. 50 µl.

### 3.2.7.8 Preparação da sonda para Histona H<sub>1</sub>

Para o isolamento e amplificação de sequências parciais do gene da histona H<sub>1</sub>, foram utilizados os *primers* degenerados *H<sub>1</sub> F* (5' ATG GCA GAA RYC GCM CCA GC 3') e *H<sub>1</sub> R* (5' TAC TTC TTC TTG GGS GCT GC 3'), cedidos pelo Msc Diogo Teruo Hashimoto e pelo Dr Fábio Porto Foresti do Laboratório de Genética de Peixes da UNESP de Bauru. Estes *primers* foram desenhados utilizando como molde sequências das espécies *Danio rerio* (número de acesso no Genbank CU855770) e *Oncorhynchus mykiss* (número de acesso no Genbank X02624), o que permitiu a obtenção de fragmentos gênicos de aproximadamente 630 pb para serem utilizados como sonda. A reação de amplificação foi preparada para um volume final de 25µL num tubo de 0,5mL, com os seguintes parâmetros: 1µl de DNA molde, 0,5µl de cada *primer*, juntamente com 2,5µl de tampão da enzima Taq polimerase (10X), 0,75µl de MgCl (50mM), 2,0µl de dNTPs (2mM), 0,2µl de Taq polimerase (5U/µL) e água Milli-Q q.s.p. 25µl. Os produtos gerados foram checados em gel de agarose.

A sonda para a Histona H<sub>1</sub> foi marcada com digoxigenina 11-dUTP (Roche Applied Science) por meio de uma reação de PCR com um volume final de 50µl, com os seguintes parâmetros: 2µl de DNA molde, 1µl de cada *primer*, juntamente com 5µl de tampão da enzima Taq polimerase (10X), 1,5µl de MgCl (50mM), 1,5µl de dATP, dCTP e dGTP e 0,8µl dTTP (2mM cada), 0,7µl de Digoxigenina-11-dUTP, 0,4µl de Taq polimerase (5U/µL) e água Milli-Q q.s.p. 50µl. Os produtos gerados foram checados em gel de agarose. As reações de PCR foram realizadas em um termociclador PTC-200<sup>TM</sup> Peltier Thermal Cycler (MJResearch, Inc) de acordo com as seguintes condições:

	95°C ---- 5min	
30 ciclos	{	95°C ---- 30seg
		52°C ---- 45seg
		72°C ---- 20seg
		72°C ---- 7min
	15°C ----manutenção	

### 3.2.7.9 Hibridação Fluorescente *in situ*

O mapeamento das sondas produzidas por microdissecção e DOP-PCR, sonda telomérica, Histona H<sub>1</sub> e DNAr 5S, marcadas com Digoxigenina-11-dUTP em cromossomos metafásicos, foi realizado por hibridação fluorescente *in situ* de acordo com o procedimento estabelecido por Pinkel *et al.* (1986), com modificações.

**Dia 1:** 3µL de sonda marcada foram diluídos em 12µL de solução de hibridação (10% sulfato dextrato, 50% formamida e 20xSSC e Água) e utilizados para cada lâmina. Essa solução foi desnaturada a 85°C por 10 minutos. Lâminas com preparações cromossômicas foram desnaturadas em solução de formamida 70% a 68°C por 3 minutos. As lâminas foram imediatamente lavadas em etanol 70% e desidratadas em série alcoólica (70%, 85% e 100%) a -20 °C. Após a série alcoólica e a desnaturação da solução, 15µL da solução de hibridação foram colocados sobre cada lâmina que foi coberta com lamínula de vidro (24x60) e incubadas em câmara úmida e escura a 37°C por toda a noite.

**Dia 2:** Após hibridação, as lâminas foram lavadas duas vezes em 0,4xSSC + 0,3% Triton a 68°C por 2 minutos. Em seguida, as lâminas foram novamente lavadas duas vezes em 2xSSC + 0,1 Triton por 2 minutos a temperatura ambiente. Após essas lavagens as lâminas foram cobertas com 20 µL de solução de bloqueio (Leite em pó, 20xSSC, e Água) por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida as lâminas foram brevemente lavadas em 2xSSC e receberam 30 µL de solução de bloqueio com anticorpo (24µL de solução de bloqueio e 6µL de antidigoxi -rodamina) e foram incubadas por 40 minutos em câmara úmida e escura a 37°C. Após essa incubação as lâminas foram lavadas brevemente em 2xSSC e lavadas duas vezes em 2xSSC + 0,1 Triton por 2 minutos a 43 °C. Após essa limpeza, as lâminas foram enxaguadas em 2xSSC e cobertas com 22µL de Vectashield® Mounting Medium com DAPI (Vector). As lâminas foram analisadas em um fotomicroscópio óptico de fluorescência (Olympus BX61) e as imagens metafásicas foram capturadas usando o programa Image Pro Plus, 6.0 software (MediaCybernetics).

Para uma hibridação com maior nível de estringência utilizando sondas teloméricas, as lavagens no segundo dia seguiram os passos: após hibridação, as lâminas foram lavadas duas vezes em formamida 50% em 2xSSC durante dois minutos à 43°C. Em seguida foram realizadas duas lavagens em 2xSSC por 2 minutos à 43°C. Após esse passo, foram realizadas tres enxágues em 2xSSC + 0,1 Triton por 2 minutos a 43 °C. Após essas lavagens as lâminas foram cobertas com 20µL de solução de bloqueio (Leite em pó, 20xSSC, e Água) por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida as lâminas foram brevemente

lavadas em 2xSSC e receberam 30 $\mu$ L de solução de bloqueio com anticorpo (24 $\mu$ L de solução de bloqueio e 6 $\mu$ L de antidigoxi -rodamina) e foram incubadas por 40 minutos em câmara úmida e escura a 37°C. Após essa incubação as lâminas foram lavadas brevemente em 2xSSC e lavadas mais duas vezes em 2xSSC + 0,1 Triton por 2 minutos a 43 °C. Após essa limpeza, as lâminas foram enxaguadas em 2xSSC e cobertas com 22 $\mu$ L de Vectashield® Mounting Medium com DAPI (Vector). As lâminas foram analisadas em um fotomicroscópio óptico de fluorescência (Olympus BX61) e as imagens metafásicas foram capturadas usando o programa Image Pro Plus, 6.0 software (MediaCybernetics).

O mapeamento da sonda de DNAr 18S marcada com biotina 14-dATP em cromossomos metafásicos foi realizado por hibridação fluorescente *in situ* de acordo com o procedimento estabelecido por Pinkel *et al.* (1986), com modificações.

**Dia 1:** 3 $\mu$ L de sonda marcada foram diluídos em 12 $\mu$ L de solução de hibridação (10% sulfato dextrato, 50% formamida e 20xSSC e Água) e utilizados para cada lâmina. Essa solução foi desnaturada a 85°C por 10 minutos. Lâminas com preparações cromossômicas foram desnaturadas em solução de formamida 70% a 68°C por 3 minutos. As lâminas foram imediatamente lavadas em etanol 70% e desidratadas em série alcoólica (70%, 85% e 100%) a -20 °C. Após a série alcoólica e a desnaturação da solução, 15 $\mu$ L da solução de hibridação foram colocados sobre cada lâmina que foi coberta com lamínula de vidro (24x60) e incubadas em câmara úmida e escura a 37°C por toda a noite.

**Dia 2:** Após hibridação, as lâminas foram lavadas duas vezes em 0,4xSSC + 0,3% Triton a 68°C por 2 minutos. Em seguida, as lâminas foram novamente lavadas duas vezes em 2xSSC + 0,1 Triton por 2 minutos a temperatura ambiente. Após essas lavagens as lâminas foram cobertas com 20 $\mu$ L de solução de bloqueio (Leite em pó, 20xSSC, e Água) por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida as lâminas foram brevemente lavadas em 2xSSC e receberam 30 $\mu$ L de solução de bloqueio com anticorpo (24 $\mu$ L de solução de bloqueio e 6 $\mu$ L de Avidina - FITC) e foram incubadas por 15 minutos em câmara úmida e escura a 37°C. Após essa incubação as lâminas foram lavadas brevemente em 2xSSC e lavadas mais duas vezes em 2xSSC + 0,1 Triton por 2 minutos a 43 °C. Após esse passo, foi agregada a lâmina anti-avidina biotilada (38 $\mu$ L de solução de bloqueio e 2 $\mu$ L de anti-avidina) e em seguida incubadas em câmara úmida e escura a 37°C por 15 minutos. Na sequência as lâminas foram enxaguadas em 2xSSC por 1 minuto seguidos de mais dois enxágues em 2xSSC + 0,1 Triton por 2 minutos a 43 °C. Foi agregada a lâmina novamente 30 $\mu$ L de solução de bloqueio com anticorpo (24 $\mu$ L de solução de bloqueio e 6 $\mu$ L de Avidina - FITC) e foram incubadas por 15 minutos em câmara úmida e escura a 37°C. Após essa incubação as lâminas foram lavadas

brevemente em 2xSSC e lavadas mais duas vezes em 2xSSC + 0,1 Triton por 2 minutos a 43 °C. Após essa limpeza, as lâminas foram enxaguadas em 2xSSC e cobertas com 22µL de Vectashield® Mounting Medium com DAPI (Vector). As lâminas foram analisadas em um fotomicroscópio óptico de fluorescência (Olympus BX61) e as imagens metafásicas foram capturadas usando o programa Image Pro Plus, 6.0 software (MediaCybernetics).

### 3. 2.8 Métodos Moleculares

A análise molecular foi realizada a partir de sequências parciais do gene mitocondrial Citocromo Oxidase subunidade 1 (CO I) amplificadas por PCR utilizando os *primers* Fish F<sub>1</sub>= 5' TCA ACC AAC CAC AAA GAC ATT GGC AC 3' e Fish R<sub>1</sub>= 5' TAG ACT TCT GGG TGG CCA AAG GAA TCA 3'. Para extração do DNA genômico de exemplares de *Characidium* foi utilizado o Kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega), conforme instruções do fabricante.

A amplificação gênica foi realizada seguindo as concentrações e o programa presentes na tabela 2. Após a amplificação o produto de PCR foi purificado usando ExoSap-IT® (USB Corporation) seguindo as instruções do fabricante. O produto da PCR purificado foi usado para montar uma reação de sequenciamento com o kit Big Dye™ Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems) submetido ao programa presente no manual do kit. O produto desta reação foi purificado com a adição, por reação, de 0,7 µl de acetato de sódio (3M), 0,7µl EDTA (125mM) e 17,5ml de etanol 100%. Essa mistura foi encubada por 15 minutos e seguidamente levada para uma centrifugação de 15 minutos a 13000 rpm à temperatura ambiente. Logo após, o sobrenadante foi retirado e foi adicionado 24µl de etanol 70%. Essa nova mistura foi submetida a uma centrifugação de 10 minutos à temperatura ambiente e após essa centrifugação o sobrenadante foi novamente descartado. O restante do álcool presente no tubo foi evaporado sob temperatura de 90°C por 2 minutos. Após essas etapas as sequências foram obtidas em um sequenciador automático por capilaridade ABI3130. Com o término do sequenciamento, as sequências foram analisadas no programa ATGC (Genetix Inc.) para a obtenção da sequência *contig* (sequência mais próxima da real) do COI. As sequências *contigs* de todas as amostras foram colocadas em um mesmo arquivo de texto que posteriormente passou por um processo de alinhamento pelo algoritmo MUSCLE disponível online no link “<http://www.ebi.ac.uk/Tools/muscle/index.html>”.

A análise de distância por UPGMA e Parcimônia foram realizadas no programa MEGA versão 4.0 (Tamura *et al.*, 2007). Uma tabela de distância foi gerada a partir dos dados obtidos na análise de UPGMA para estimar a divergência média entre os táxons.

Tabela 2: Reagentes e programa utilizados para amplificação gênica do DNAm Citocromo oxidase 1 (COI).

Reagentes por amostra			Programa		
<i>Reagente</i>	<i>Quantidades (µl)</i>	<i>Passo</i>	<i>Processo</i>	<i>Temperatura</i>	<i>Tempo</i>
		1	Desnaturação	94° C	3'
Go taq	6,25	2	Desnaturação	94°C	30"
H <sub>2</sub> O <sub>MQ</sub>	4,65	3	Anelamento	48-56°C	1'
Fish F1	0,3	4	Extensão	68°C	2'
Fish R1	0,3	5	Volta para o	-	35X
DNA genômico	1	6	Extensão	72°C	5'

### 3.2.9 Estudos Cariotípicos

As preparações cromossômicas convencionais, com fluorocromos e com hibridação *in situ* foram analisadas em fotomicroscópio óptico (Olympus BX61), estabelecendo-se o número diplóide modal (contagem mínima de 30 metáfases cromossômicas por espécime) presente em cada espécie/população amostrada no presente trabalho e as melhores metáfases foram capturadas com software Image Pro Plus, 6.0 (MediaCybernetics). Os fluorocromos foram capturados separadamente (utilizando filtros UV específicos) coloridos e sobrepostos no mesmo software Image Pro Plus, 6.0 (MediaCybernetics).

Os cromossomos foram recortados usando o software Adobe Photoshop versão 11.0 - Adobe System e organizados em pares de homólogos para a montagem dos cariótipos, sendo classificados em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a), com base no trabalho de Levan *et al.* (1964) e organizados em classes e ordem decrescente de tamanho.

## **4 Resultados e Discussão**

As informações obtidas dos estudos citogenéticos e moleculares efetuados em espécies e populações de *Characidium* resultaram em artigos científicos que são apresentados a seguir, na forma de capítulos.



## **Capítulo 1**

**Diversidade cromossômica interespecífica no gênero *Characidium*  
(Teleostei, Characiformes, Crenuchidae)**

**Resumo**

Os cariótipos de sete espécies de peixes do gênero *Characidium*, quatro estudados pela primeira vez, foram caracterizados com o uso das técnicas citogenéticas convencionais (Giemsa, Ag-RONs e bandamento-C). Todas as espécies apresentaram número diplóide de  $2n=50$  cromossomos, com predominância de cromossomos dos tipos meta e submetacêntricos. Nesse estudo foi também observada a presença de até três cromossomos B em células de duas espécies, *C. oiticicai* e *C. pterostictum*. O bandamento C e o tratamento com nitrato de prata revelaram significativas diferenças nos cariótipos das espécies analisadas. A espécie *Characidium cf. zebra* apresenta heterocromatina restrita às regiões pericentroméricas dos cromossomos e ausência de heteromorfismos cromossômicos relacionados à diferenciação sexual, enquanto as espécies *Characidium lanei*, *C. pterostictum*, *C. lauroi*, *C. oiticicai*, *C. schubarti* e *Characidium sp.*, evidenciaram, além de blocos pericentroméricos também observados em *Characidium cf. zebra*, grandes blocos heterocromáticos intersticiais e/ou terminais e sistema cromossômico de diferenciação sexual do tipo ZZ-ZW. A heterocromatina constitutiva parece exercer papel relevante no processo de diferenciação cromossômica destas espécies, principalmente em relação à diferenciação de cromossomos sexuais. O isolamento geográfico dos rios em que essas espécies foram amostradas, bem como o seu modo de vida restrito às regiões de cabeceira, podem ter favorecido o processo de diferenciação cromossômica e a fixação dos cariótipos particulares encontrados em cada uma das espécies analisadas.

## Introdução

Os peixes representam um grupo de organismos considerados como grupo irmão dos modernos vertebrados e a maioria das espécies é gonocorista, geralmente não apresentando cromossomos sexuais diferenciados (Devlin e Nagahama, 2002), ou hermafrodita. A determinação sexual do tipo poligênica deve ocorrer na maioria das espécies desse grupo e é considerada como um mecanismo mais primitivo em relação aos sistemas de cromossomos sexuais (Ohno, 1974). Entretanto, as espécies que apresentam cromossomos morfologicamente diferenciados, relacionados ao sexo dos indivíduos, demonstram uma grande variabilidade de sistemas, principalmente em peixes da região Neotropical (Oliveira *et al.*, 2007). Os cromossomos sexuais diferenciados provavelmente evoluíram de forma independente em muitas linhagens de peixes Neotropicais, pois sua ocorrência é esporádica e provavelmente recente em determinados grupos. Em famílias como Erythrinidae e Parodontidae, diferentes mecanismos cromossômicos de determinação sexual foram identificados entre seus representantes (Moreira-Filho *et al.*, 1993; Born e Bertollo, 2000).

O gênero *Characidium*, o mais especioso da subfamília Characidiinae (Crenuchidae), é constituído por cerca de 50 espécies de peixes reconhecidas como válidas e apresenta ampla distribuição na região Neotropical, ocorrendo do Panamá até a Argentina (Buckup, 2003). Contudo, a posição filogenética deste gênero tem-se apresentado problemática desde a descrição das primeiras espécies de Characidiinae, tendo já sido considerado como membro de Hemiodontidae, como subfamília de Characidae e também como família independente. Estudos utilizando a metodologia cladística sugerem que Characidiinae compõe, juntamente com Crenuchinae, a família Crenuchidae (Buckup, 1998).

Embora existam publicações acerca da taxonomia (Buckup e Reis, 1997; Buckup e Hahn, 2000) e sistemática (Buckup, 1993; Buckup, 1998) dos characidiíneos, os estudos citogenéticos neste grupo são ainda escassos e recentes, restringindo-se somente a algumas espécies de *Characidium* (Miyazawa e Galetti Jr., 1994; Maistro *et al.*, 1998 e 2004; Centofante *et al.*, 2001 e 2003; Silva e Maistro, 2006 e Vicari *et al.*, 2008). As espécies analisadas apresentam macroestrutura cariotípica bastante conservada, com número diplóide constante de  $2n=50$  cromossomos e predominância de cromossomos dos tipos meta e submetacêntricos. Por outro lado, a identificação de sistema ZZ-ZW de determinação sexual (Maistro *et al.*, 1998 e 2004; Centofante *et al.*, 2001 e 2003; Vicari *et al.*, 2008), a ocorrência de cromossomos supranumerários (Maistro *et al.*, 1998 e 2004), a presença de RONS em diferentes cromossomos do cariótipo (Maistro *et al.*, 1998 e 2004, Centofante *et al.*, 2003,

Vicari *et al.*, 2008) e até mesmo a ocorrência de indivíduos poliplóides (Centofante *et al.*, 2001), evidenciam a grande variabilidade existente na estrutura cromossômica de determinadas espécies de *Characidium*.

O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de ampliar o conhecimento citogenético em espécies do gênero *Characidium*, estabelecendo e comparando a constituição cariotípica de espécies que ocorrem principalmente nos componentes das bacias hidrográficas da região sul e sudeste do Brasil. As informações obtidas poderão ser úteis para o entendimento dos mecanismos envolvidos no processo de diferenciação cariotípica e de diversificação das espécies neste grupo.

### **Material e Métodos**

Foram analisadas sete espécies de peixes do gênero *Characidium* provenientes de componentes de diferentes bacias hidrográficas da região sul e sudeste do Brasil, indicadas na Figura 1 e na Tabela 1. Os exemplares analisados foram fixados em formol a 10% e conservados em álcool 70% e após identificação, foram depositados no Museu do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (LBP) da UNESP de Botucatu, São Paulo, Brasil (Tabela 1).

As preparações de cromossomos mitóticos foram obtidas de tecido renal e brânquias utilizando-se a técnica referida em Foresti *et al.* (1981). Os cromossomos metafásicos foram analisados em fotomicroscópio ótico (Olympus BX61) e as imagens foram capturadas com software Image Pro Plus, 6.0 (MediaCybernetics). A morfologia cromossômica foi determinada de acordo com a relação de braços estabelecida por Levan *et al.* (1964), os cromossomos foram classificados como metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a) e arranjados em ordem decrescente de tamanho no cariótipo. A marcação das RONS pelo nitrato de Prata seguiu a técnica proposta por Howell e Black (1980) e o bandamento C foi realizado seguindo o protocolo descrito por Sumner (1972).

*Characidium zebra* aparece como uma difundida e polimórfica espécie que geralmente é citada na literatura com o nome incorreto de *Characidium fasciatum*. Sua localidade tipo é a drenagem do Rio Branco (bacia Amazônica) e atualmente não existe nenhum estudo que defina os limites de sua ocorrência (Buckup e Reis, 1997). Neste trabalho, de maneira provisória, os indivíduos similares morfologicamente a *Characidium zebra* foram denominados *Characidium cf. zebra*.

## Resultados

A análise citogenética das sete espécies de *Characidium* evidenciou um número diplóide conservado de  $2n=50$  cromossomos, com predominância de cromossomos dos tipos meta e submetacêntricos (Figuras 2 a 5). Em *Characidium cf. zebra*, o primeiro par cromossômico metacêntrico apresentou-se como o maior do cariótipo e com acentuada diferença de tamanho em relação ao segundo par. Diferentemente, as demais espécies analisadas apresentaram os dois primeiros pares metacêntricos com tamanho similar e *C. pterostictum* apresentou também um par de cromossomos acrocêntricos, que não está presente nas demais. Com exceção de *C. cf. zebra*, todas as espécies analisadas apresentaram heteromorfismo cromossômico no par número 2 em exemplares fêmeas, enquanto que nos machos, esse par apresentou-se homomórfico. Em duas espécies foi observada a ocorrência de cromossomos B e a frequência desses cromossomos foi variável, tanto intra-individual como interindividual, sendo de zero a três em *C. oiticicai* e de zero a dois em *C. pterostictum* (Figuras 2c e 3).

O bandamento C revelou significativas diferenças nos padrões de heterocromatina entre as espécies analisadas. *C. cf. zebra* apresentou pequena quantidade de heterocromatina constitutiva restrita às regiões pericentroméricas de todos os cromossomos (Figura 2b). Já as espécies *C. lanei*, *C. pterostictum*, *C. lauroi*, *C. oiticicai*, *C. schubarti* e *Characidium sp.* evidenciaram, além da heterocromatina pericentromérica observada em *C. cf. zebra*, grandes blocos intersticiais e/ou terminais e sistema cromossômico de diferenciação sexual do tipo ZZ-ZW, representado pelo par cromossômico heteromórfico número 2, observado nos cariótipos dos indivíduos fêmeas destas espécies (Figuras 2d a 5d).

Os cromossomos acrocêntricos exclusivos de *C. pterostictum* apresentaram grandes blocos de heterocromatina em posição terminal de seus braços (Figura 3b). Já os cromossomos B de *C. oiticicai* e de *C. pterostictum*, apresentaram-se parcialmente heterocromáticos (Figuras 2d e 3b).

A impregnação pelo nitrato de Prata evidenciou que todas as espécies de *Characidium* analisadas possuem RONS simples (Tabela 2; destaque nas Figuras 2 a 5). *Characidium cf. zebra* apresentou duas marcações em posição final nos braços longos do par 23 (Figura 2a). As demais espécies apresentaram seus sítios ribossomais associados aos cromossomos sexuais, sendo que o cromossomo Z é portador de RONS em posição final dos braços curtos e o cromossomo W possui RONS em posição final dos braços longos (Figura 6). Os resultados encontram-se sumarizados na Tabela 2.

## Discussão

No presente estudo, entre as sete espécies estudadas, tiveram os cariótipos caracterizados pela primeira vez *C. oiticicai*, *C. schubarti*, e *Characidium* sp., aumentando o número de espécies de *Characidium* cariotipadas para dez. As espécies de *Characidium* analisadas neste trabalho, corroborando uma característica observada para o gênero, apresentaram macroestrutura cariotípica bastante conservada, notadamente em relação ao seu número diplóide e à presença de cromossomos meta e submetacêntricos. No entanto, a presença de cromossomos B em *C. pterostictum* e *C. oiticicai*, de cromossomos sexuais na maioria das espécies analisadas, de RONS associadas aos cromossomos sexuais, além da ocorrência de um par de cromossomos acrocêntricos em *C. pterostictum* (Tabela 2), reforçam as evidências já postuladas para algumas espécies de *Characidium*, que apontam para a existência de uma grande variabilidade na estrutura cromossômica entre os representantes deste gênero (Maistro *et al.*, 1998 e 2004; Centofante *et al.*, 2001 e 2003; Vicari *et al.*, 2008).

Morfologicamente, a espécie *Characidium zebra* é considerada basal na filogenia de *Characidium*, apresentando diversos caracteres plesiomórficos (Buckup, 1993). Nesse sentido, o cariótipo apresentado por esta espécie poderia caracterizar-se como o mais basal para o gênero em estudo e as variações cromossômicas observadas nas outras espécies poderiam ser explicadas pela ocorrência de rearranjos cromossômicos estruturais. O par acrocêntrico de *C. pterostictum* poderia ter sua origem determinada pela ocorrência de uma inversão pericêntrica em um par de submetacêntricos, seguida de um acúmulo de heterocromatina na região onde ocorreu o rearranjo. Já a variação de tamanho observada entre os pares cromossômicos 1 e 2 de *Characidium cf. zebra* e não observada nas demais espécies, poderia estar relacionada à formação dos cromossomos sexuais identificados como sendo o segundo par nestas espécies, no qual o processo de heterocromatinização do Z e do W possivelmente resultou no aumento de tamanho desses cromossomos.

Sistemas de cromossomos sexuais do tipo ZZ-ZW já foram relatados para outras espécies de *Characidium*. Maistro *et al.* (1998 e 2004) descreveram o primeiro caso de heteromorfismo cromossômico relacionado ao sexo nesse gênero, em análise realizada em duas populações de *Characidium* sp. aff. *C. gomesi*, citadas como *Characidium cf. fasciatum*, coletadas em riachos da bacia do rio Paranapanema. Nos indivíduos destas populações, os cromossomos sexuais são representados pelos cromossomos submetacêntricos do par 19 e possuem tamanho e morfologia idênticas, sendo que o cromossomo Z possui um bloco de heterocromatina pericentromérica, enquanto que o W é totalmente heterocromático.

Centofante *et al.* (2001) relataram um segundo caso de heteromorfismo cromossômico em exemplares de *Characidium gomesi* capturados no córrego Paiol Grande, na serra da Mantiqueira, bacia do rio Grande. Nessa espécie o cromossomo Z é um metacêntrico do par número 2, com heterocromatina pericentromérica, enquanto que o cromossomo W é caracterizado como um pequeno cromossomo submetacêntrico completamente heterocromático. Já em *Characidium* sp. cf. *C. alipioi* (Centofante *et al.*, 2003), o cromossomo Z possui heterocromatina pericentromérica e telomérica e o W é totalmente heterocromático. Nessa espécie, os cromossomos sexuais correspondem ao par número 1 do cariótipo e apresentaram o mesmo tamanho e morfologia. Em análise realizada nos exemplares de uma população de *Characidium* cf. *gomesi* do rio Quebra Perna, bacia do Tibagi, Vicari *et al.* (2008) registraram mais um caso de ocorrência do sistema ZZ/ZW de cromossomos sexuais para o gênero, sendo o Z representado por um cromossomo metacêntrico com heterocromatina pericentromérica e o W por um cromossomo subteloicêntrico totalmente heterocromático.

A ocorrência de sistema simples de determinação sexual, decorrente de processos de heterocromatinização diferencial em um dos cromossomos sexuais é bastante comum em peixes (Oliveira *et al.*, 2007). A evolução dos mecanismos de determinação sexual parece estar intimamente relacionada à evolução de cromossomos morfologicamente diferenciados. O processo de heterocromatinização, através da inserção de elementos genéticos de transposição e/ou amplificação de seqüências repetitivas em regiões eucromáticas, é considerado um mecanismo primário na diferenciação de cromossomos sexuais. Esse mecanismo inicial de heterocromatinização, quando observado em um dos cromossomos de um par homomórfico, em uma região próxima às seqüências determinantes do sexo, pode promover a supressão de eventos de recombinação e favorecer a evolução independente desse cromossomo e/ou região cromossômica (John, 1988; Rice, 1996; Steinemann e Steinemann, 1992 e 2001). A identificação e análise dos cromossomos sexuais em *C. lanei*, *C. pterostictum*, *C. lauroi*, *C. oiticicai*, *C. schubarti* e *C. sp.* no presente estudo, que caracterizam os cromossomos heteromórficos Z e o W em estágios distintos de diferenciação, reforçam a idéia de que eventos de heterocromatinização poderiam ter ocorrido no ancestral dessas espécies e se diferenciado independentemente ao longo do processo de diversificação, corroborando as hipóteses propostas por Centofante *et al.* (2001 e 2003) e Vicari *et al.* (2008).

A presença de segmentos de DNAr em cromossomos sexuais tem sido observada em vários grupos de organismos. Os cístrons de genes ribossômicos 5,8S, 18S e 28S, que formam as regiões organizadoras nucleolares em animais, as quais são geralmente marcadas pelo

nitrito de Prata, e de genes 17S de plantas, foram observados em cromossomos sexuais de insetos, como em *Drosophila* (Pellegrini *et al.*, 1977), besouro (Juan *et al.*, 1993) e mosca (Parise-Maltempi e Avancini, 2001); de mamíferos (Yonenaga-Yassuda *et al.*, 1983; Oshida *et al.*, 1999) e de plantas (Nakayama *et al.*, 2001). Em peixes, os relatos de RONS em cromossomos sexuais se restringem a *Fundulus diaphanus* (Howell e Black, 1979), *Salvelinus alpinus* (Reed e Phillips, 1997), *Hoplias malabaricus* (Born e Bertollo, 2000), *Triportheus guentheri* (Artoni e Bertollo, 2002) e *Triportheus venezuelensis* (Nirchio *et al.*, 2007). Na truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, que apresenta sistema de determinação sexual do tipo XX/XY, o DNA ribossomal 5S, cujas seqüências não participam da formação das RONS, foi também observado no cromossomo X dessa espécie (Moran *et al.*, 1996).

O surgimento das RONS nos cromossomos Z e W de *C. lauroi*, *C. oiticicai*, *C. lanei*, *C. pterostictum*, *C. schubarti* e *C. sp.* teria possivelmente ocorrido antes do processo de diferenciação dos cromossomos sexuais nessas espécies, sendo anterior até mesmo aos eventos de heterocromatinização deste par de cromossomos. Outro grupo de espécies, contudo, formado por *Characidium sp. cf. C. alipioi* (Centofante *et al.*, 2003), *Characidium gomesi* (Centofante *et al.*, 2001) e *Characidium sp. aff. C. gomesi*, (Maistro *et al.*, 1998 e 2004) e *Characidium cf. gomesi* (Vicari *et al.*, 2008) apresenta características distintas, nas quais as RONS não estão relacionadas aos cromossomos sexuais e se localizam geralmente em posição terminal dos braços longos de um grande par submetacêntrico ou de forma múltipla, amplamente distribuídas pelo cariótipo. A existência de diferentes fenótipos relacionados às RONS para o gênero *Characidium* pode também estar relacionada com os eventos de diferenciação que modificaram estruturalmente os cromossomos Z e W. O processo de heterocromatinização, seguido de rearranjos estruturais, modificou o posicionamento das RONS, originando os padrões atuais. Já nas espécies cujas RONS não estão nos cromossomos sexuais, o mesmo processo de heterocromatinização possivelmente determinou o deslocamento desses cistrons ribossômicos de suas posições originais, evitando sua inativação.

A variação no número diplóide observada em *C. pterostictum* e *C. oiticicai*, devido à presença de cromossomos B, já foi relatada para outras duas espécies desse gênero. Miyazawa e Galetti Jr. (1994), registraram a presença de um cromossomo B acrocêntrico em *Characidium cf. zebra* do rio Passa Cinco, Ipeúna, SP. No entanto, na análise de 28 exemplares, esse elemento genômico extra foi encontrado em apenas um indivíduo e apresentou-se eucromático. Maistro *et al.* (1998 e 2004) descreveram a presença frequente de 1 a 4 cromossomos B acrocêntricos em *Characidium sp. aff. C. gomesi* e estes se mostraram



totalmente heterocromáticos. Os cromossomos B de *C. pterostictum* e *C. oiticicai* identificados no presente estudo apresentaram em sua estrutura um padrão de distribuição irregular para a heterocromatina constitutiva, o que poderia caracterizar um processo intermediário de heterocromatinização ou ainda ser indicativo da ocorrência de modificações nestes cromossomos durante o processo de diversificação.

Vários mecanismos têm sido propostos para explicar a origem, a diferenciação e a manutenção dos cromossomos B em diferentes organismos (Jones e Rees, 1982). No entanto, a existência de cromossomos B totalmente heterocromáticos parece caracterizar o processo de heterocromatinização como um evento bastante comum e característico da maioria dos casos relatados (Venere *et al.*, 1999). Nesse sentido, as diferenças morfológicas e os padrões de heterocromatina observados nos cromossomos B das espécies de *Characidium* parecem sugerir processos independentes de origem para estes elementos cromossômicos, seguidos de modificações internas específicas. Os cromossomos parcialmente heterocromáticos de *C. oiticicai* e *C. pterostictum* teriam se originado em eventos mais recentes, a partir de elementos eucromáticos, seguidos de posterior heterocromatinização, em relação aos cromossomos totalmente heterocromáticos de *Characidium* sp. aff. *C. gomesi*. Por outro lado, a heterocromatina constitutiva parece não ter participação na origem e desenvolvimento do cromossomo extra observado em *Characidium* cf. *zebra*, que se apresenta eucromático (Venere *et al.*, 1999).

Centofante *et al.* (2001 e 2003) e Vicari *et al.* (2008), postularam que a evolução dos sistemas de cromossomos sexuais no gênero *Characidium* estaria intimamente associada à existência de barreiras biogeográficas. Segundo Weitzman *et al.* (1988), os principais rios da região sul e sudeste do Brasil estão atualmente separados por barreiras que impedem a dispersão de espécies e populações, favorecendo a ocorrência de eventos vicariantes nos grupos isolados. Nesse contexto, constituições cariotípicas exclusivas e diferentes sistemas de cromossomos sexuais em peixes poderiam se fixar de maneira independente em membros de um grupo de espécies de um mesmo gênero ou entre gêneros de uma família, contribuindo para o processo de especiação. Para o gênero *Characidium*, que geralmente apresenta espécies homogaméticas ou com sistema ZZ/ZW de cromossomos sexuais vivendo em simpatria, uma hipótese provável para explicar a diversidade estrutural cromossômica encontrada, associada à conservação cariotípica dentro do gênero *Characidium* seria o fato de eventos de captura de cabeceiras terem contribuído para a redistribuição das espécies, determinando as condições atualmente existentes.

Embora diferentes eventos possam ter atuado no processo de diversificação cariotípica do gênero *Characidium*, a heterocromatina constitutiva parece exercer papel preponderante no processo de diferenciação cromossômica das espécies analisadas e o estudo dessa porção cromatínica, com o uso de técnicas moleculares, poderia trazer importantes informações e possibilitar um melhor entendimento das relações evolutivas existentes nesse grupo de organismos.

### **Referências Bibliográficas**

As referências correspondentes a este capítulo encontram-se no final desta tese.

Tabela 1: Exemplares de *Characidium* analisados neste estudo. LBP: Coleção de Peixes do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, Instituto de Biociências, UNESP. F: fêmeas e M: machos

Espécies	LBP	Localidade	F	M	Coordenadas
<i>Characidium lanei</i>	8700	córrego Cari - Morretes - PR	11	7	S 25°26'29" W 48°32'28"
<i>Characidium lauroi</i>	8741	rio Grande - Ubatuba - SP	4	1	S 23°23'42" W 45°07'17"
<i>Characidium oiticicai</i>	8703	rio Paraitinga - Salesópolis - SP	15	5	S 23°30'40" W 45°51'32"
<i>Characidium pterostictum</i>	7367	rio Betari - Apiaí - SP	15	5	S 24°33'03" W 48°40'49"
<i>Characidium schubarti</i>	8702	rio Cinco Réis - Jaguariaiva - PR	10	7	S 25°17'46" W 49°44'56"
<i>Characidium cf. zebra</i>	8704	rio Paraitinga - Salesópolis - SP	12	7	S 23°30'40" W 45°51'32"
<i>Characidium</i> sp.	6818	rio Preto - Itanhaém - SP	18	8	S 24°10'39" W 46°50'56"

Tabela 2: Dados citogenéticos disponíveis para o gênero *Characidium*

Espécie	Proveniência	CS	Pares portadores das RONS	Sistema Hidrográfico	CB	Fórmula Cariotípica	Ref.
<i>C. cf. zebra</i>	Reserva Jataí - SP	-	25 (T)	Ribeira do Iguape	-	♂ 32m + 18sm ♀ 32m + 18sm	1
<i>C. cf. zebra</i>	Rio Passa Cinco - SP	-	25 (T)	Tietê	1	♂ 32m + 18sm ♀ 32m + 18sm	1
<i>C. cf. zebra</i>	Rio Piracicaba - SP	-	25 (T)	Tietê	-	♂ 32m + 18sm ♀ 32m + 18sm	1
<i>C. lagosantensis</i>	Rio Mogi-Guaçu - SP	-	-	Mogi-Guaçu	-	♂ 32m + 18sm ♀ 32m + 18sm	1
<i>C. pterostictum</i>	Reserva Jataí - SP	-	-	Ribeira do Iguape	-	♂ 32m+16sm+2st ♀ 32m+16sm+2st	1
<i>Characidium</i> sp. <i>aff. C. gomesi</i>	Rio Pardo - SP	ZZ/ZW	17 (T)	Paranapanema	1-4	♂ 32m + 18sm ♀ 32m + 18sm	2
<i>C. sp. aff. C. gomesi</i>	Rio da Quinta - SP	ZZ/ZW	17 (T)	Paranapanema	1-4	♂ 32m + 18sm ♀ 32m + 18sm	2
<i>C. cf. zebra</i>	Rio Machado - MG	-	23 (T)	Grande	-	♂ 32m + 18sm ♀ 32m + 18sm	3
<i>C. gomesi</i>	Rio Machado - MG	-	17 (T)	Grande	-	♂ 32m + 18sm ♀ 32m + 18sm	3
<i>C. cf. zebra</i>	Córrego Paiol Grande – SP	-	23 (I)	Grande	-	♂ 32m + 18sm ♀ 32m + 18sm	4
<i>C. gomesi</i>	Córrego Paiol Grande – SP	ZZ/ZW	18 (I)	Grande	-	♂ 32m + 18sm ♀ 31m + 19sm	4
<i>C. lauroi</i>	Córrego Ribeirão Grande - SP	-	5 e 23	Paraíba do Sul	-	♂ 24m+24sm+2st ♀ 24m+24sm+2st	5
<i>C. sp. cf. C. alipioi</i>	Córrego Ribeirão Grande - SP	ZZ/ZW	16 (T)	Paraíba do Sul	-	♂ 30m+20sm ♀ 30m+20sm	5
<i>C. cf. gomesi</i>	Rio Quebra Perna - PR	ZZ/ZW	vários	Tibagi	-	♂ 32m + 18sm ♀ 31m+18sm+1st	6
<i>C. cf. zebra</i>	Rio Paraitinga - Salesópolis - SP	-	23 (I)	Alto Tietê	-	♂ 32m + 18sm ♀ 32m + 18sm	7
<i>C. lanei</i>	Riacho Cari - Morretes - PR	ZZ/ZW	2 (T)	Rios Costeiros	-	♂ 32m + 18sm ♀ 31m + 19sm	7
<i>C. lauroi</i>	Afluente do rio Grande - Ubatuba - SP	ZZ/ZW	2 (T)	Alto Tietê	-	♂ 32m + 18sm ♀ 31m + 18sm + 1a	7
<i>C. oiticicai</i>	Rio Paraitinga - Salesópolis - SP	ZZ/ZW	2 (T)	Rios Costeiros	1-3	♂ 32m + 18sm ♀ 31m + 19sm	7
<i>C. schubarti</i>	Rio Cinco Réis - Jaguariaiva - PR	ZZ/ZW	2 (T)	Paranapanema	-	♂ 32m + 18sm ♀ 32m + 18sm	7
<i>C. pterostictum</i>	Rio Betari - Apiaí - SP	ZZ/ZW	2 (T)	Ribeira do Iguape	1-2	♂ 32m + 16sm + 2a ♀ 32m + 16sm + 2a	7
<i>Characidium</i> sp.	Afluente do rio Preto - Itanhaém - SP	ZZ/ZW	2 (T)	Rios Costeiros	-	♂ 32m + 18sm ♀ 32m + 18sm	7
<i>C. lanei</i>	córrego Cari – PR	ZZ/ZW	2 (T)	Rios Costeiros	-	♂ 32m+ 18sm ♀ 31m+ 19sm	8

Referências: 1. Miyazawa & Galetti Jr. (1994); 2. Maistro *et al.* (1998, 2004); 3. Silva e Maistro (2006); 4. Centofante *et al.* (2001); 5. Centofante *et al.* (2003); 6. Vicari *et al.* (2008), 7. Presente estudo; 8. Noletto *et al.* (2009).

CS= Cromossomos Sexuais; CB= Cromossomos B; T= RONS em posição terminal; I= RONS em posição intersticial; Ref. = Referências

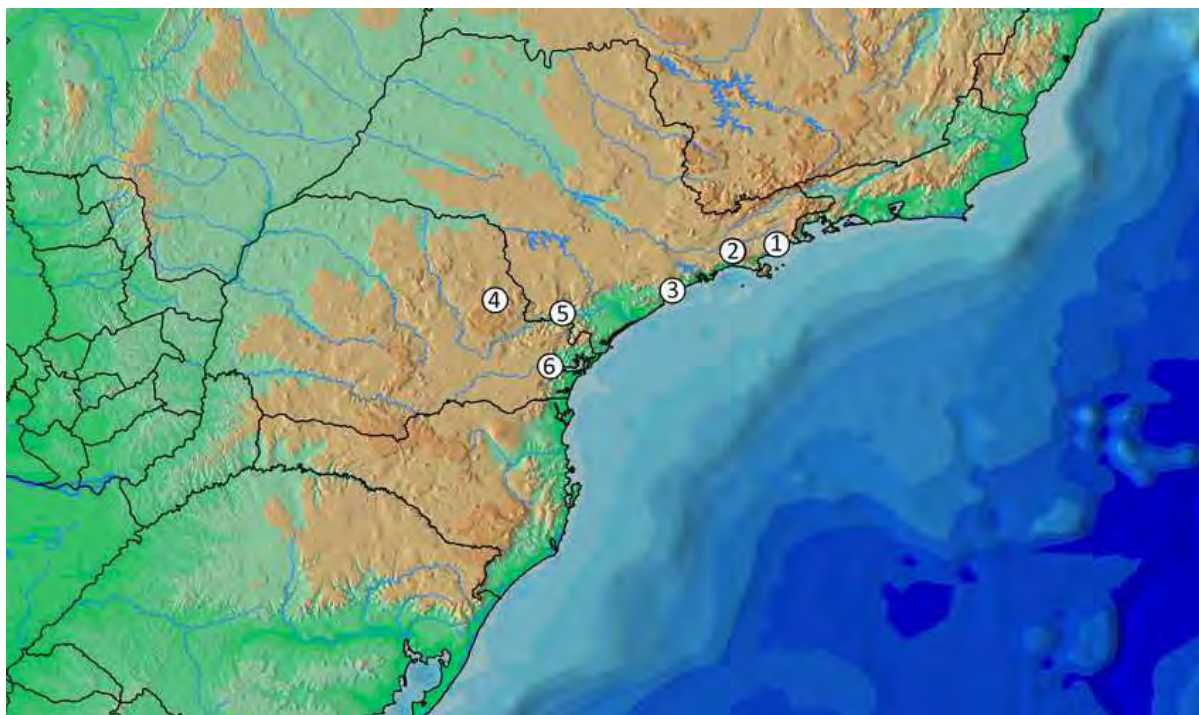


Figura 1: Locais de coleta das espécies de *Characidium*. 1. Ubatuba-SP (*Characidium lauroi*), 2. Salesópolis-SP (*Characidium oiticicai* e *Characidium cf. zebra*), 3. Itanhaém-SP (*Characidium* sp.), 4. Jaguariaíva-PR (*Characidium schubarti*), 5. Apiáí-SP (*Characidium pterostictum*), 6. Morretes-PR (*Characidium lanei*).

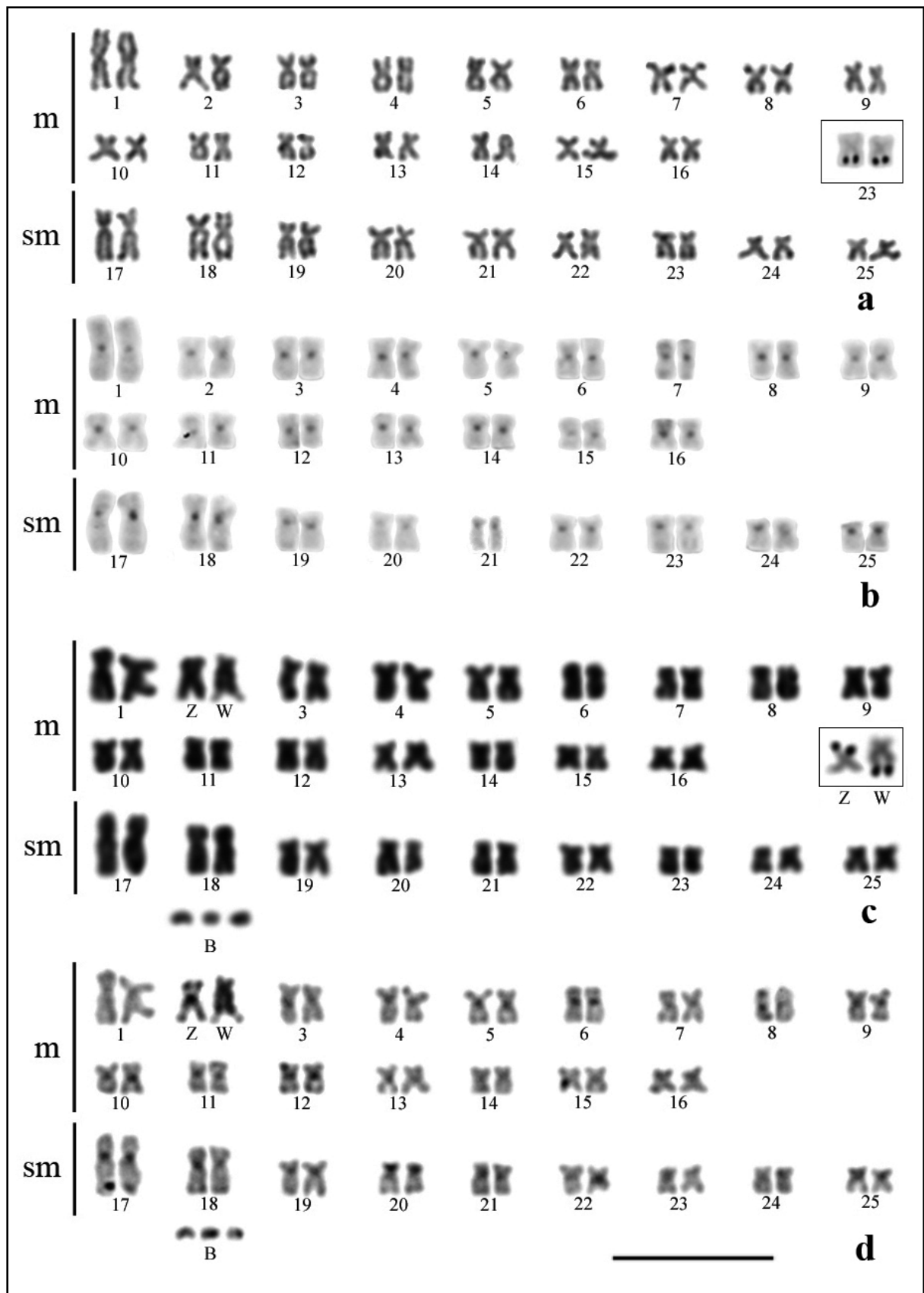


Figura 2: Cariótipos de exemplar fêmea de *Characidium cf. zebra* e *Characidium oiticicai* de Salesópolis após coloração convencional por Giemsa (a,c) e bandamento C (b,d). Em destaque os cromossomos portadores das RONS. A barra equivale a 10  $\mu$ m.

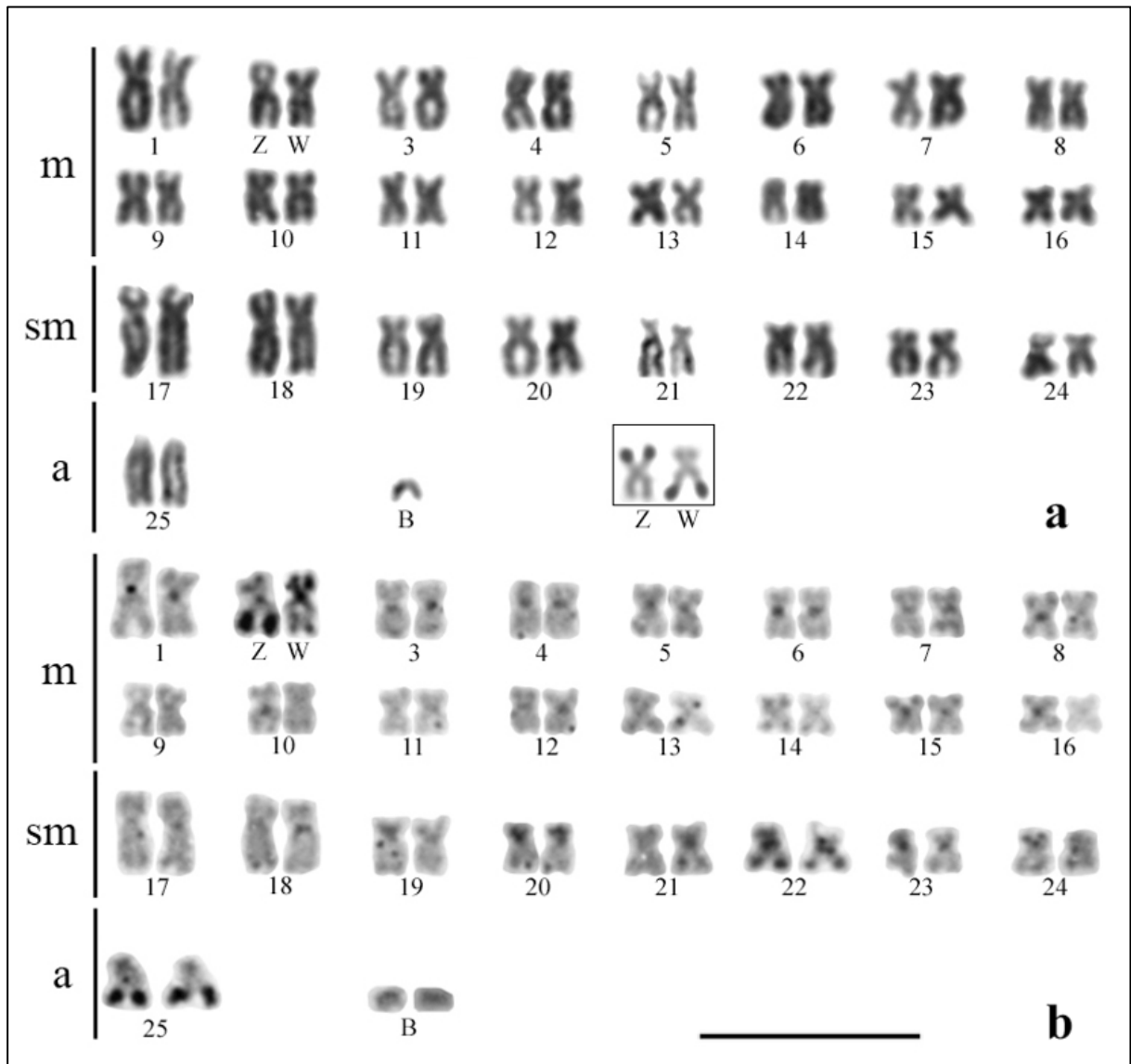


Figura 3: Cariótipos de exemplar fêmea de *Characidium pterostictum* de Apiaí após coloração convencional por Giemsa (a) e bandamento C (b). Em destaque os cromossomos Z e W com as RONS em posição invertida. A barra equivale a 10  $\mu$ m

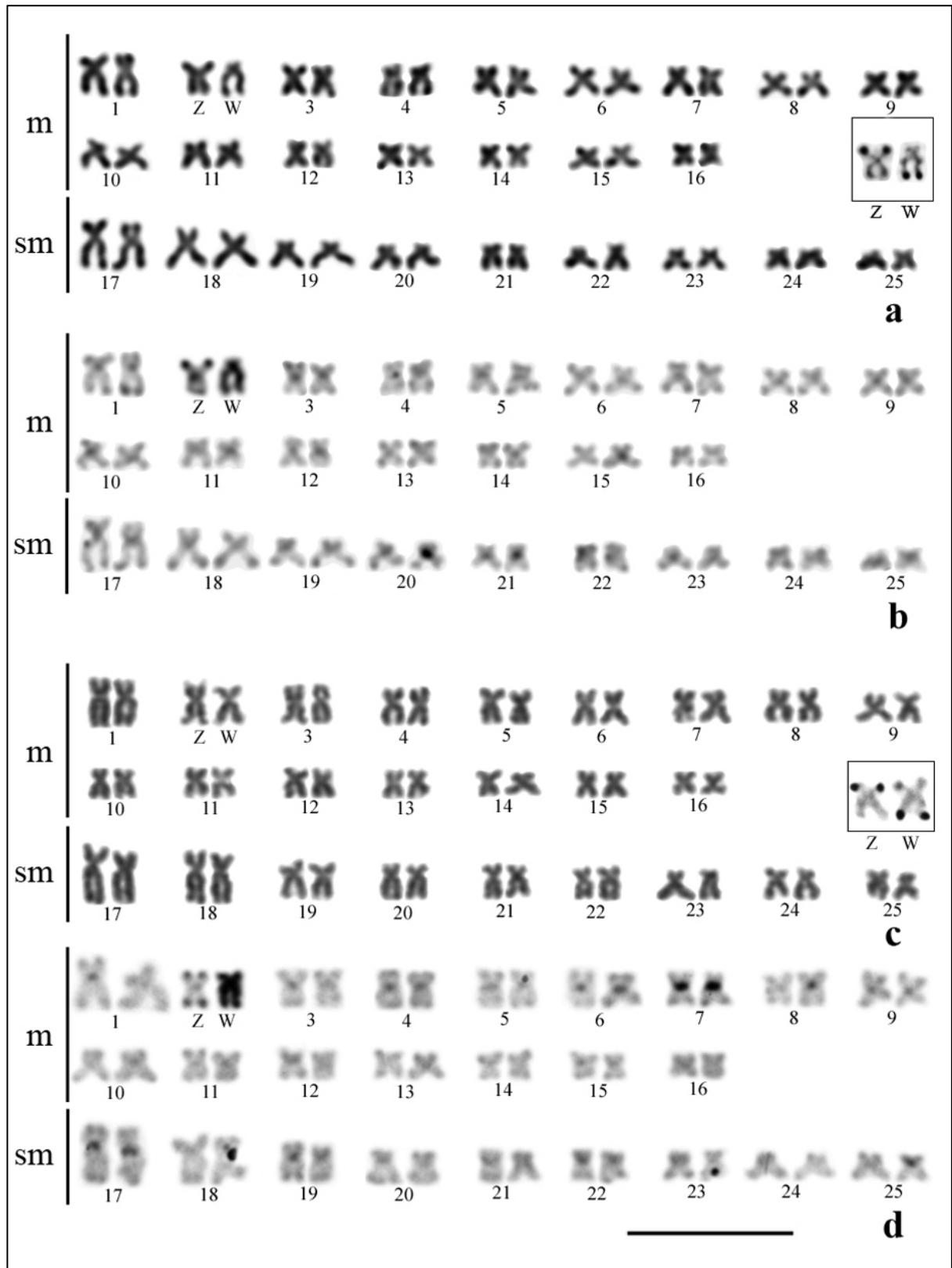


Figura 4: Cariótipos de exemplar fêmea de *Characidium lauroi* de Ubatuba e *Characidium lanei* de Morretes, após coloração convencional por Giemsa (a, c) e bandamento C (b, d). Em destaque os cromossomos Z e W com as RONS em posição invertida. A barra equivale a 10  $\mu\text{m}$ .



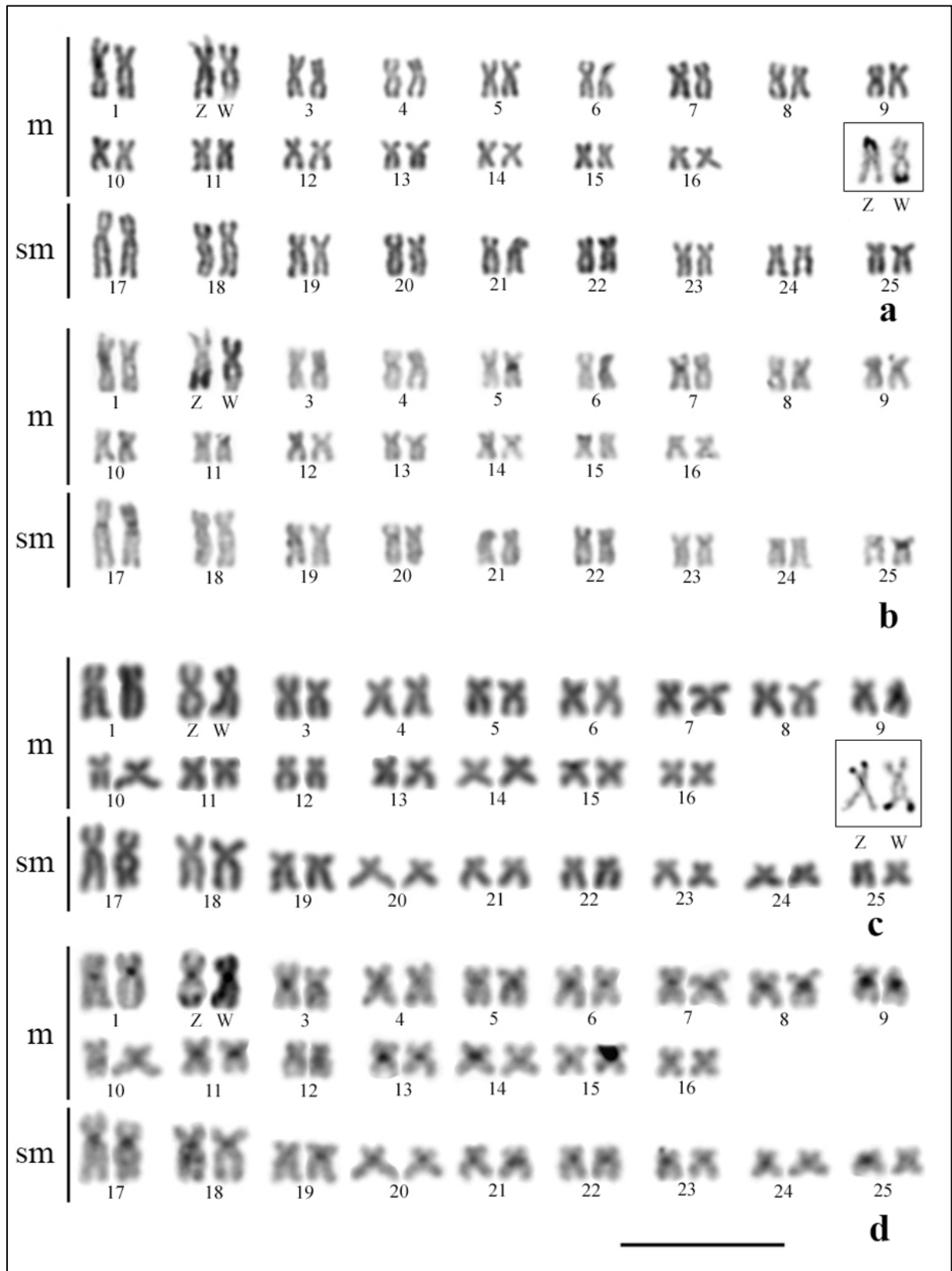


Figura 5: Cariótipos de exemplar fêmea de *Characidium* sp. de Itanhaém e *Characidium schubarti* de Jaguariava após coloração convencional por Giemsa (a, c) e bandamento C (b, d). Em destaque os cromossomos Z e W com as RONS em posição invertida. A barra equivale a 10 μm.

Z W	Z W	Z W	Z W	Z W	Z W
(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	(f)

Figura 6: Cromossomos sexuais das espécies de *Characidium* analisadas no presente trabalho, após bandamento C (primeira fileira) e tratamento com nitrato de Prata (segunda fileira). Em (a) *C. schubarti*, (b), *Characidium* sp., (c) *C. pterostictum*, (d) *C. oiticicai*, (e) *C. lanei*, (f) *C. lauroi*.

## **Capítulo 2**

**Diversificação cromossômica em populações de *Characidium cf. gomesi* (Characiformes, Crenuchidae). Aspectos evolutivos da diferenciação alopátrica**

**Resumo**

Estudos citogenéticos comparativos efetuados em duas populações de *Characidium cf. gomesi* da região de Botucatu, SP, revelaram que ambas apresentam a mesma estrutura cariotípica, com  $2n=50$  cromossomos, com fórmulas cariotípicas de  $32m+18sm$  para os machos e  $31m+19sm$  para as fêmeas, bem como um sistema de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW. No entanto, entre essas duas populações também foram observadas divergências quanto à localização das regiões organizadoras de nucléolo, quanto à ocorrência de cromossomos B e quanto à distribuição dos sítios de DNAr 5S. *Characidium cf. gomesi* do ribeirão Alambari, bacia do Tietê, apresenta seus sítios de DNAr 18S alocados nos cromossomos Z e W, enquanto que na população da bacia do rio Paranapanema esses genes estão presentes em cromossomos autossômicos. Já os sítios de DNAr 5S foram localizados em um único par cromossômico (par 25) nos indivíduos da população do Paranapanema e em dois pares nos da população do rio Tietê (pares 20 e 25). Além disso, a população do rio Paranapanema apresentou uma variação cromossômica intra e interindividual, com a presença de até quatro cromossomos supranumerários heterocromáticos. As características particulares observadas nestas populações, bem como o modo de vida geralmente restrito às cabeceiras dos rios, com a formação de agrupamentos locais, poderiam ter contribuído para a ocorrência dos polimorfismos cromossômicos visualizados. Tais resultados apontam também para o alto grau de diferenciação cariotípica que ocorre entre as duas populações de *Characidium cf. gomesi* nestes ambientes. Estes resultados corroboram a hipótese da ocorrência de divergências cariotípicas interpopulacionais em *Characidium cf. gomesi* em vias de diferenciação alopátrica.

## Introdução

Os peixes representam o grupo de organismos mais diversificado entre os vertebrados e também o que apresenta a maior diversidade de sistemas de diferenciação sexual (Schartl, 2004). A determinação sexual do tipo poligênica deve ocorrer na maioria das espécies desse grupo e é considerada como um mecanismo mais primitivo em relação aos sistemas de cromossomos sexuais diferenciados (Ohno, 1974). Entretanto, as espécies que apresentam cromossomos morfologicamente diferenciados demonstram uma grande variabilidade de sistemas, principalmente entre os peixes da região Neotropical (Oliveira *et al.*, 2007). Na família Crenuchidae, a subfamília Characidiinae é formada por nove gêneros e constitui um grupo bastante interessante do ponto de vista cariotípico. O gênero *Characidium*, o mais especioso dessa subfamília, é formado por cerca de 50 espécies reconhecidas como válidas e apresenta ampla distribuição na região Neotropical, ocorrendo do Panamá até a Argentina (Buckup, 2003).

As variações cariotípicas observadas em diferentes espécies de *Characidium* estão relacionadas principalmente a eventos cromossômicos envolvendo a distribuição da heterocromatina constitutiva e parecem convergir para a formação de dois grupos de espécies nesse gênero. Em um primeiro grupo, as espécies apresentam heterocromatina restrita às regiões pericentroméricas e/ou teloméricas dos cromossomos e ausência de sistema cromossômico de diferenciação sexual; em um segundo grupo, as espécies evidenciam, além da heterocromatina pericentromérica e telomérica observada nos cromossomos dos representantes do primeiro grupo, também grandes blocos intersticiais e/ou terminais heterocromáticos e um sistema cromossômico de diferenciação sexual do tipo ZZ-ZW (Capítulo 1).

Nesse último grupo, a heterocromatinização parcial ou até mesmo total observada em um dos cromossomos do par sexual, o cromossomo W, parece ser uma característica comum a todas as espécies analisadas (Maistro *et al.*, 1998; 2004; Centofante *et al.*, 2001; 2003; Noleto *et al.*, 2009; Capítulo 1). No entanto, o padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva observada neste cromossomo sexual, assim como em alguns pares de autossomos indica que possam ter ocorrido eventos de diferenciação cromossômica posteriores ao surgimento do sistema cromossômico sexual ancestral (Vicari *et al.*, 2008; Capítulo 1). Algumas espécies de *Characidium* possuem sítios de DNAr 45S nos cromossomos sexuais Z e W (Noleto *et al.*, 2009; Capítulo 1), enquanto outras possuem sítios de DNAr 45S em cromossomos

autossômicos e ausentes do par sexual ZW (Centofante *et al.*, 2001; 2003; Maistro *et al.*, 2004; Vicari *et al.*, 2008).

O presente trabalho tem por objetivos analisar citogeneticamente duas populações de *Characidium cf. gomesi*, buscando um melhor entendimento tanto acerca da estrutura e organização cromossômica dos representantes deste gênero, quanto esclarecimentos de questões genético-evolutivas do sistema de cromossomos sexuais ZW apresentado por algumas populações de *Characidium cf. gomesi*.

### Material e Métodos

Foram analisados indivíduos representantes de duas populações de *Characidium cf. gomesi* provenientes de riachos do sistema hidrográfico do rio Paraná (Figura 1), sendo 30 exemplares (22 fêmeas e 8 machos) do ribeirão Alambari, bacia do rio Tietê (Botucatu, SP - S 22° 56' 06.99"/W 48° 19' 18.23") e 26 exemplares (18 fêmeas e 8 machos) do rio Novo, bacia do rio Paranapanema (Avaré, SP - S 22° 59' 59.41"/W 48° 50' 19.75"). Os exemplares analisados foram fixados em formol a 10% e conservados em álcool 70% e após identificação, foram depositados no Museu do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes da UNESP de Botucatu, São Paulo, com os números LBP 6723, 6725, 6730 e 6733 (*Characidium cf. gomesi* – Ribeirão Alambari) e LBP 6733 e 8709 (*Characidium cf. gomesi* – Rio Novo).

As preparações de cromossomos mitóticos foram obtidas de tecido renal e brânquias utilizando-se a técnica referida em Foresti *et al.* (1981). A marcação das RONS pelo nitrato de Prata seguiu a técnica proposta por Howell e Black (1980) e o bandamento C foi realizado seguindo o protocolo descrito por Sumner (1972).

Foi realizada também a hibridação fluorescente *in situ* (FISH) para a localização dos genes de DNAr nos cromossomos. Foram utilizadas sondas de DNAr 18S obtida do peixe *Prochilodus argenteus* (Hatanaka e Galetti Jr., 2004) e de DNAr 5S obtida da espécie *Leporinus elongatus* (Martins e Galetti Jr., 1999). A sonda 18S foi marcada com biotina 14-dATP por “nick translation”, seguindo as instruções do fabricante (Bionick Labelling System – Invitrogen). A detecção e amplificação do sinal de hibridização foram realizadas usando Avidina-fluoresceína conjugada (FITC) e anticorpo anti-avidina biotinilado. A sonda 5S foi marcada com digoxigenina 11-dUTP (Roche Applied Science) por PCR (Polymerase Chain Reaction) e os sinais de hibridização foram detectados usando anti-digoxigenina-rodamina. Os cromossomos metafásicos foram tratados de acordo com o procedimento descrito por Pinkel

*et al.* (1986), com modificações, contracolorados com DAPI e analisados em fotomicroscópio óptico (Olympus BX61). As imagens metafásicas foram capturadas usando o programa Image Pro Plus, 6.0 software (MediaCybernetics).

A morfologia cromossômica foi determinada de acordo com a relação de braços estabelecida por Levan *et al.* (1964), sendo os cromossomos classificados como metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a) e arranjados no cariótipo em ordem decrescente de tamanho.

## Resultados

A análise citogenética dos indivíduos das duas populações de *Characidium cf. gomesi* evidenciou um número diplóide constante de  $2n=50$  cromossomos, com número fundamental de braços (NF) igual a 100 para ambos os sexos (Figuras 2, 3 e 4). No entanto, uma variação de zero a quatro cromossomos B foi observada nos indivíduos da população do rio Paranapanema. Estes cromossomos mostraram-se pequenos, acrocêntricos ou subtelocêntricos e com frequência variável, tanto intra quanto inter-individual (Figuras 3 e 4). Os cariótipos dos representantes destas populações apresentaram 31 cromossomos metacêntricos e 19 submetacêntricos para as fêmeas e por 32 metacêntricos e 18 submetacêntricos para os machos.

A análise da distribuição da heterocromatina constitutiva revelou padrões de bandas similares entre as populações. O bandamento-C revelou a presença de blocos de heterocromatina nas regiões pericentroméricas da maioria dos cromossomos. No entanto, nos machos, observou-se ainda grandes blocos heterocromáticos na região proximal do braço longo do par número 2, enquanto que nas fêmeas, este par apresentou-se heteromórfico, com um cromossomo metacêntrico apresentando um grande bloco proximal do braço longo e outro cromossomo submetacêntrico totalmente heterocromático, confirmando a ocorrência do sistema ZZ/ZW de cromossomos sexuais (Figuras 2b, 3b e 4b). Os cromossomos B apresentaram-se quase totalmente heterocromáticos (Figuras 3b e 4b).

A impregnação pelo nitrato de Prata em preparações de *Characidium cf. gomesi* evidenciou nos indivíduos da população da bacia do rio Tietê sítios ribossomais associados aos cromossomos sexuais, com marcações na posição terminal dos braços longos dos cromossomos Z e W (Figura 2). A hibridação fluorescente *in situ* utilizando a sonda de DNAr 18S confirmou os resultados obtidos pela impregnação com Prata, enquanto os sítios de DNAr 5S foram localizados em dois pares cromossômicos, nos pares 20 e 25 (Figuras 2). Já

nos indivíduos da população de *Characidium cf. gomesi* da bacia do rio Paranapanema, as RONS foram identificadas em posição terminal no braço longo do par submetacêntrico número 18. Em algumas metáfases, além deste par, um terceiro cromossomo foi observado portando marcações detectadas pela prata. A hibridação fluorescente *in situ* utilizando a sonda de DNAr 18S confirmou os resultados obtidos pela impregnação com Prata no par número 18, enquanto os sítios de DNAr 5S foram localizados apenas no par cromossômico 25 (Figuras 3 e 4).

A análise sequencial pelas técnicas de bandamento C e de impregnação pelo nitrato de Prata confirmaram a localização das regiões heterocromáticas e o posicionamento das RONS nos cromossomos desta espécie (Figura 5).

### **Discussão**

Os estudos cromossômicos no gênero *Characidium* têm evidenciado características particulares para cada espécie e/ou população analisada. Apesar dos dados citogenéticos disponíveis indicarem uma conservação do número diplóide ( $2n=50$  cromossomos), observa-se uma extensa variação cariotípica entre as espécies, seja no posicionamento das RONS, existência de cromossomos sexuais, presença de cromossomos B e até de casos de poliploidia (Maistro *et al.*, 1998 e 2004; Centofante *et al.*, 2001 e 2003; Vicari *et al.*, 2008, Noletto *et al.*, 2009; Capítulo 1). Os indivíduos das duas populações de *Characidium cf. gomesi* analisadas no presente trabalho possuem  $2n=50$  cromossomos dos tipos meta e submetacêntricos e o mesmo sistema ZZ/ZW de cromossomos sexuais. Apesar de compartilharem uma mesma estrutura cariotípica, também apresentam características distintas, principalmente quanto à localização dos sítios de DNAr 5S, à existência de cromossomos B e à presença dos genes de DNAr 18S associados aos cromossomos sexuais. As características particulares existentes nessas populações de *Characidium cf. gomesi* poderiam estar relacionadas ao isolamento reprodutivo dessas populações que, encontradas predominantemente em ambientes de cabeceiras de riachos, constituem agrupamentos com baixa vagilidade e, portanto, com poucas possibilidades de compartilhamento de modificações estruturais particulares dos cromossomos.

Em peixes Neotropicais é frequente a ocorrência de distintos mecanismos cromossômicos de diferenciação sexual em grupos filogeneticamente relacionados. Esse aspecto é evidenciado em várias famílias e ordens de peixes como em Parodontidae (Moreira-Filho *et al.*, 1993; Jesus *et al.*, 1999; Bellafronte *et al.*, 2009), em Erythrinidae (Bertollo *et al.*,



1983; Dergan e Bertollo, 1990; Born e Bertollo, 2000) e em Gymnotiformes (Almeida-Toledo e Foresti, 2001; Almeida-Toledo *et al.*, 2000a e 2001).

A formação de sistemas simples de determinação sexual em peixes é geralmente decorrente de processos de heterocromatinização diferencial dos cromossomos sexuais (Oliveira *et al.*, 2007). Por outro lado, a formação desses elementos relacionados ao sexo a partir de alterações cromossômicas estruturais, é menos frequentemente observada. Beçak (1983) exemplifica vários casos em Serpentes nos quais inversões pericêntricas, associadas ou não a eventos de duplicação, deleção ou inversão seriam os mecanismos primários no estabelecimento de cromossomos sexuais morfologicamente diferenciados nesse grupo. Em peixes, duas espécies da família Loricariidae que apresentam o mesmo sistema de determinação sexual ZZ/ZW, evidenciaram processos similares na formação do cromossomo W. Em *Loricariichthys platymetopon*, o surgimento do cromossomo W parece ter sido decorrente de uma inversão pericêntrica em um dos cromossomos de um par homomórfico (Scavone e Julio Jr., 1995). Em *Hypostomus* sp., o cromossomo W, um metacêntrico menor que o cromossomo Z que é acrocêntrico, pode ter-se originado a partir da ocorrência do mesmo evento anterior, seguido da deleção de um grande bloco de heterocromatina constitutiva (Artoni *et al.*, 1998).

Ambas as populações de *Characidium cf. gomesi* analisadas, da bacia do rio Tietê e da bacia do rio Paranapanema, apresentaram um mesmo sistema cromossômico de diferenciação sexual do tipo ZZ/ZW. No entanto, na população da bacia do rio Tietê, este sistema heteromórfico é portador da região organizadora nucleolar, contendo o segmento de DNAr 45S, que pode ser evidenciado tanto pela técnica de impregnação por prata, como pela hibridação com a sonda de DNAr 18S. A análise em outras espécies de *Characidium* (Capítulo 1) aponta que a presença das RONS nos cromossomos Z e W poderia ser a condição ancestral a partir da qual se estabeleceu a diferenciação deste par cromossômico em *Characidium* e, então, modificações posteriores, como a heterocromatinização e eventos de alteração da morfologia estariam atuando na diversificação do par de cromossomos sexuais (Figura 6). Reforçando esta idéia, verifica-se que as populações de *Characidium cf. gomesi* da bacia do rio Paranapanema relacionada no presente estudo, de *Characidium* sp. aff. *C. gomesi* da bacia do rio Paranapanema, (Maistro *et al.*, 1998 e 2004), *Characidium gomesi* da bacia do rio Grande (Centofante *et al.*, 2001) e *Characidium cf. gomesi* da bacia do rio Tibagi (Vicari *et al.*, 2008) apresentam características distintas, nas quais as RONS não estão presentes nos cromossomos sexuais e se localizam geralmente em posição terminal dos braços longos de um grande par submetacêntrico ou de forma múltipla, distribuídas pelo cariótipo.

O sistema cromossômico sexual ZZ/ZW identificado em *Characidium cf. gomesi* parece ter sua formação envolvida com a ocorrência de mecanismos de alterações cromossômicas estruturais em um único par de cromossomos homomórficos ancestral. Vicari *et al.* (2008) propuseram a ocorrência de um *proto* cromossomo sexual para explicar a diferenciação do sistema heteromórfico ZZ/ZW em algumas espécies de *Characidium* em comparação àquelas homomórficas em relação ao sexo. No presente estudo, esses cromossomos ancestrais seriam morfologicamente similares aos cromossomos Z observados em exemplares machos da população do rio Alambari. Na população do rio Paranapanema, esse par ancestral poderia ter sofrido uma transposição da RON para um par submetacêntrico grande, ou até mesmo para outros cromossomos (Figura 6), resultando no surgimento de RONS múltiplas, como observadas nos representantes das bacias do rio Paranapanema e do Tibagi (presente estudo, Maistro *et al.*, 1998 e 2004; Vicari *et al.*, 2008).

As espécies de *Characidium* que apresentam DNAr associadas aos cromossomos Z e W não possuem RONS múltiplas, em situação distinta da observada na população de *Hoplias malabaricus* analisada por Born e Bertollo (2000), que além de possuir um sistema cromossômico do tipo XX/XY com DNA ribossômico no cromossomo X, geralmente possui RONS polimórficas. Tal situação pode reforçar a idéia de que as RONS autossômicas observadas em *Characidium cf. gomesi* da bacia do rio Paranapanema (presente estudo), em *Characidium gomesi* da bacia do rio Grande (Centofante *et al.*, 2001) e em *Characidium cf. gomesi* da bacia do rio Tibagi (Vicari *et al.*, 2008) inicialmente faziam parte dos cromossomos sexuais dessas espécies e que, no decorrer do processo evolutivo, foram espalhadas para outros cromossomos do cariótipo por processos de transposição.

Em algumas espécies de *Characidium*, as RONS estão localizadas em cromossomos sexuais quase totalmente heterocromatinizados (Noletto *et al.*, 2009; Capítulo 1), o que poderia favorecer a ocorrência de alterações estruturais levando à formação dos sistemas cromossômicos de diferenciação sexual observados. A presença de heterocromatina constitutiva está muitas vezes relacionada à ocorrência de rearranjos cromossômicos envolvendo as RONS e esta porção do genoma tem sido associada à formação de polimorfismos dessas regiões, como observado em *Salmo salar* (Hartley, 1988) e em *Diplodus bellottii* (Amores *et al.*, 1993). Neste sentido, a presença dos sítios ribossomais nos cromossomos Z e W de algumas espécies de *Characidium*, contribuiria para o pareamento destes cromossomos e, conseqüentemente, para a manutenção de permutas cromossômicas. Os modelos de evolução cromossômica sexual frequentemente colocam a supressão de recombinação entre os genes controladores do sexo como um passo primordial no processo de

diferenciação cromossômica (Charlesworth, 1991; Rice, 1996). A ocorrência tanto de eventos de heterocromatinização quanto de rearranjos cromossômicos estruturais em um dos cromossomos de um par homomórfico ancestral se constituiria em mecanismos de impedimento de trocas cromossômicas durante a meiose (Beçak e Beçak, 1969; Singh *et al.*, 1980). Nesse sentido, a transposição dos cístrons ribossomais dos cromossomos Z e W das populações de *Characidium cf. gomesi* do rio Paranapanema teria um efeito direto na supressão de recombinação entre os cromossomos Z e W, o que poderia favorecer o processo de evolução independente desses cromossomos sexuais. Assim, considerando o processo de heterocromatinização, o cromossomo W, ou pelo menos parte dele, estaria sujeito a pressões seletivas diferentes das impostas ao cromossomo Z, ainda recombinante. Diferentemente dessa situação, os cromossomos sexuais portadores de RONS da população do rio Alambari promoveriam ainda trocas cromossômicas, estando então sujeitos às mesmas condições de seleção.

No gênero *Characidium*, Vicari *et al.* (2008) compararam citogeneticamente três populações identificadas como pertencentes à espécie *C. gomesi* por não apresentarem caracteres morfológicos suficientes para diagnosticá-las como entidades diferentes. No presente estudo, mais duas populações relacionadas à *C. gomesi* foram analisadas cariotipicamente. Todas as populações analisadas apresentam os cromossomos Z e W em estados particulares de diferenciação, além de outras diferenças cariotípicas nos sítios de DNAr e presença de cromossomos B. Nesse sentido, o atual estado de diferenciação de cada sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW destas populações parece ser resultante da falta de fluxo gênico entre elas e poderia representar um importante mecanismo de isolamento reprodutivo, constituindo-se numa possível via de especiação alopátrica para cada população, embora morfológicamente semelhante.

A hibridação *in situ* com o gene ribossômico 5S evidenciou características específicas para as populações estudadas. A população da bacia do Paranapanema apresentou apenas 2 sítios para essa família multigênica, enquanto a população da bacia do Tietê apresentou 4 sítios com DNAr 5S (Figuras 2c e 3c). Vicari *et al.* (2008), na análise de uma população de *Characidium cf. gomesi* do rio Quebra Perna, bacia do Tibagi, PR, observou a existência do gene 5S em um único par cromossômico metacêntrico. A ocorrência de sítios de DNAr 5S dispersos tem sido detectadas em diversas espécies de peixes (Moran *et al.*, 1996; Fujiwara, *et al.*, 1998; Martins e Galetti Jr., 1999). A não conservação do padrão de distribuição desses sítios ribossômicos entre essas populações poderia estar associada à perda ou ganho desses genes entre diferentes espécies e/ou populações. Considera-se, pois, que a análise de outros

representantes desse grupo poderá resultar em informações que permitam estabelecer, de forma definitiva, a trajetória evolutiva desses genes no gênero *Characidium*.

Na população de *Characidium cf. gomesi* da bacia do rio Paranapanema, a variação no número diplóide observada devido à presença de cromossomos B, já havia sido relatada para outras espécies desse gênero (Miyazawa e Galetti Jr., 1994; Maistro *et al.*, 1998 e 2004; Capítulo 1). Vários mecanismos têm sido propostos para explicar a origem, a diferenciação e a manutenção dos cromossomos B em diferentes organismos (Jones e Rees, 1982). No entanto, a existência de cromossomos B totalmente heterocromáticos parece caracterizar o processo de heterocromatinização como um evento bastante comum e característico para a maioria dos casos relatados (Venere *et al.*, 1999). Em *Characidium cf. zebra* (Miyazawa e Galetti Jr., 1994), o cromossomo B observado é acrocêntrico, de tamanho médio e apresenta-se eucromático. Já em *C. pterostictum* e *C. oiticicai* (Capítulo 1), estes elementos genômicos extras são pequenos e apresentam-se parcialmente heterocromáticos. Por outro lado, os cromossomos B de *Characidium cf. gomesi* (Maistro *et al.*, 1998 e 2004 e presente estudo) são maiores do que os apresentados por *C. pterostictum* e *C. oiticicai* e apresentam-se quase totalmente heterocromáticos. A variação na morfologia, no tamanho e no padrão de distribuição da heterocromatina nestes elementos cromossômicos poderiam ser indicativos de origem distinta e independente entre eles (Capítulo 1). Nesse sentido, o tamanho maior e o padrão de heterocromatinização dos cromossomos B das populações de *Characidium cf. gomesi* poderiam indicar que essa espécie apresenta-se em uma etapa mais adiantada de diversificação.

Os dados citogenéticos evidenciam que, embora as populações de *Characidium cf. gomesi* estudadas apresentem uma mesma macroestrutura cariotípica e um mesmo sistema cromossômico de diferenciação sexual, os cromossomos B e a ausência de DNAr nos cromossomos Z e W nos indivíduos da população do rio Paranapanema poderiam ser indicativos de que esta população encontrar-se-ia em um processo evolutivo mais avançado de diferenciação do que o identificado na população do rio Alambari. Ainda, as divergências cromossômicas interpopulacionais observadas reforçariam a hipótese da atuação do processo de diferenciação cariotípica em populações de *Characidium cf. gomesi* isoladas nos ambientes de cabeceira de rios de diferentes sistemas hidrográficos.

### **Referências Bibliográficas**

As referências correspondentes a este capítulo encontram-se no final desta tese.

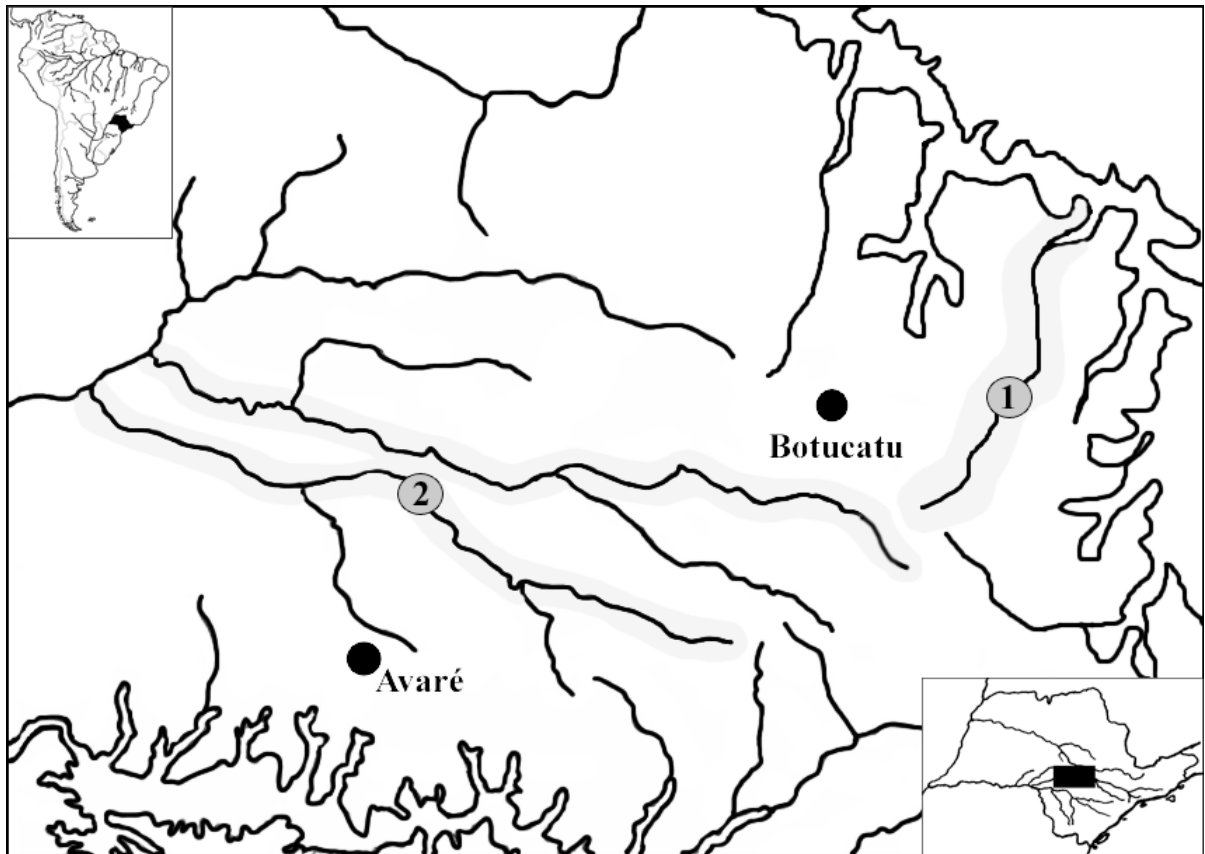


Figura 1: Mapa indicando os locais de coleta de exemplares das populações de *Characidium cf. gomesi*. Ponto 1 - Ribeirão Alambari, Botucatu, SP - bacia do rio Tietê. Ponto 2 – Rio Novo, Avaré, SP - bacia do rio Paranapanema.

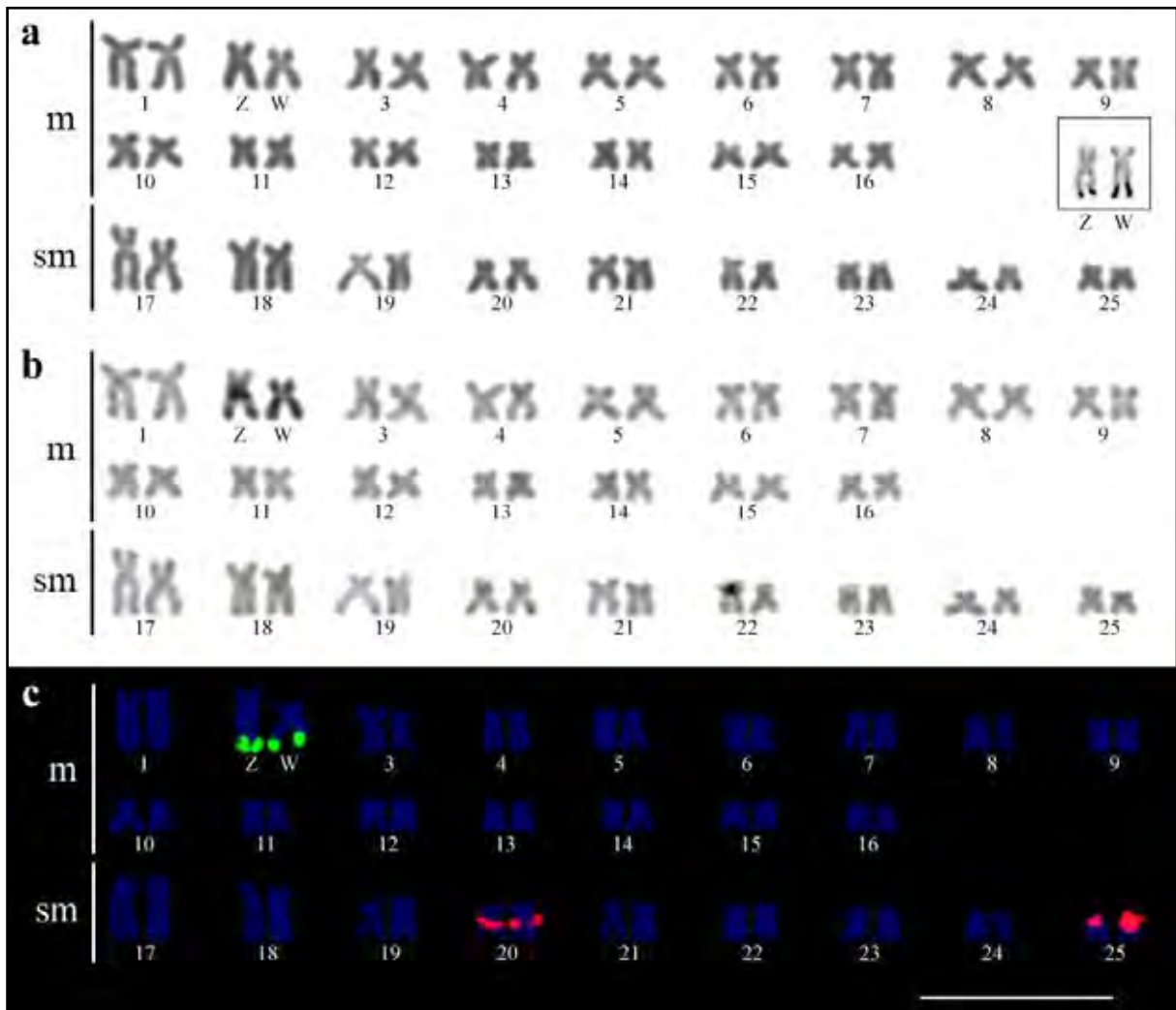


Figura 2: Cariótipos de exemplar fêmea de *Characidium cf. gomesi* do ribeirão Alambari, Botucatu – SP. Em a, coloração convencional por Giemsa; em b, bandamento C e em c, cariótipo mostrando os sítios de DNAr 18S corados com avidina FITC e presentes nos cromossomos Z e W e os sítios de DNAr 5S, corados com anti digoxigenina rodamina nos pares 20 e 25. A barra equivale a 10  $\mu$ m.

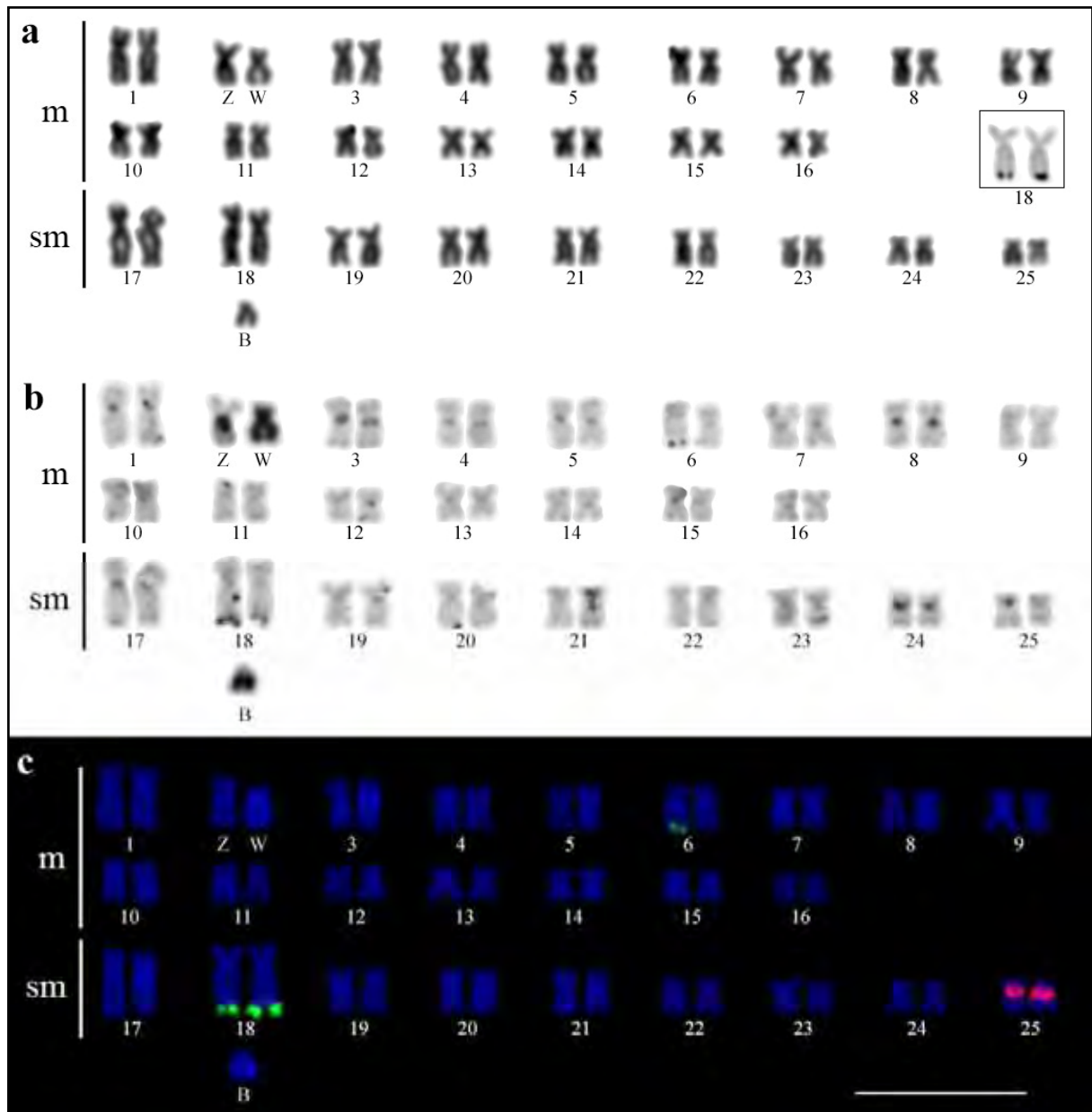


Figura 3: Cariótipos de exemplar fêmea de *Characidium cf. gomesi* do rio Novo, Avaré – SP. Em a, coloração convencional por Giemsa; em b, bandamento C e em c, cariótipo mostrando os sítios de DNAr 18S corados com avidina FITC e presentes no par 18 e os sítios de DNAr 5S corados com anti digoxigenina rodamina no par 25. A barra equivale a 10  $\mu$ m.

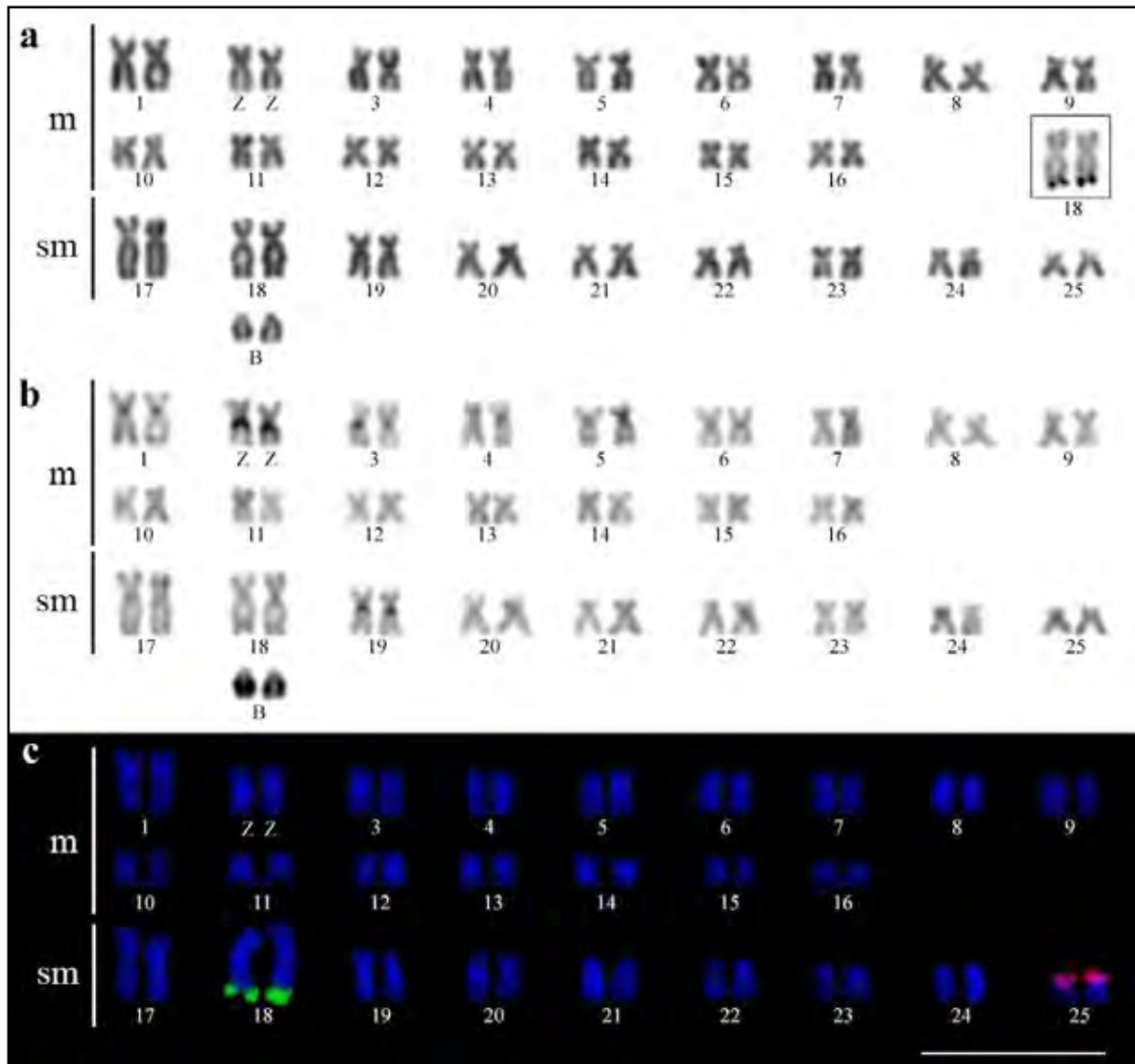


Figura 4: Cariótipos de exemplar macho de *Characidium cf. gomesi* do rio Novo, Avaré – SP. Em a, coloração convencional por Giemsa; em b, bandamento C e em c, cariótipo mostrando os sítios de DNAr 18S corados com avidina FITC e presentes no par 18 e os sítios de DNAr 5S corados com anti digoxigenina rodamina no par 25. A barra equivale a 10  $\mu$ m.



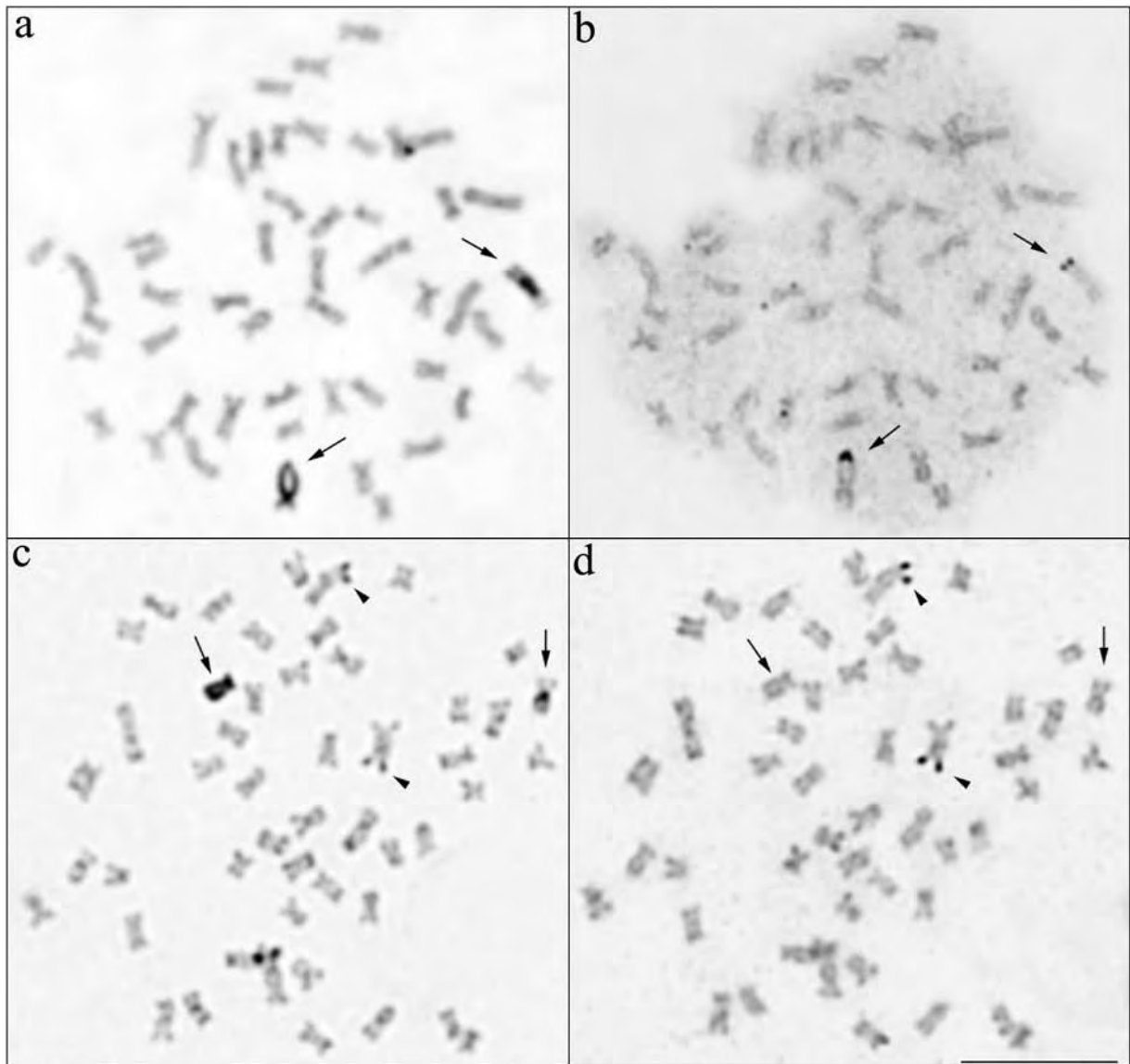


Figura 5: Metáfases sequenciais BC/RONs evidenciando a relação dos cromossomos sexuais com as regiões organizadoras de nucléolo em *Characidium cf. gomesi*. Em a e b, metáfases de exemplares da população do ribeirão Alambari após bandamento C e tratamento com nitrato de prata. As setas indicam os cromossomos sexuais portadores das RONS. Em c e d metáfases de exemplares da população do rio Novo após bandamento C e tratamento com nitrato de prata. As setas indicam os cromossomos sexuais e as cabeças de seta indicam os cromossomos portadores das RONS. A barra equivale a 10  $\mu$ m.

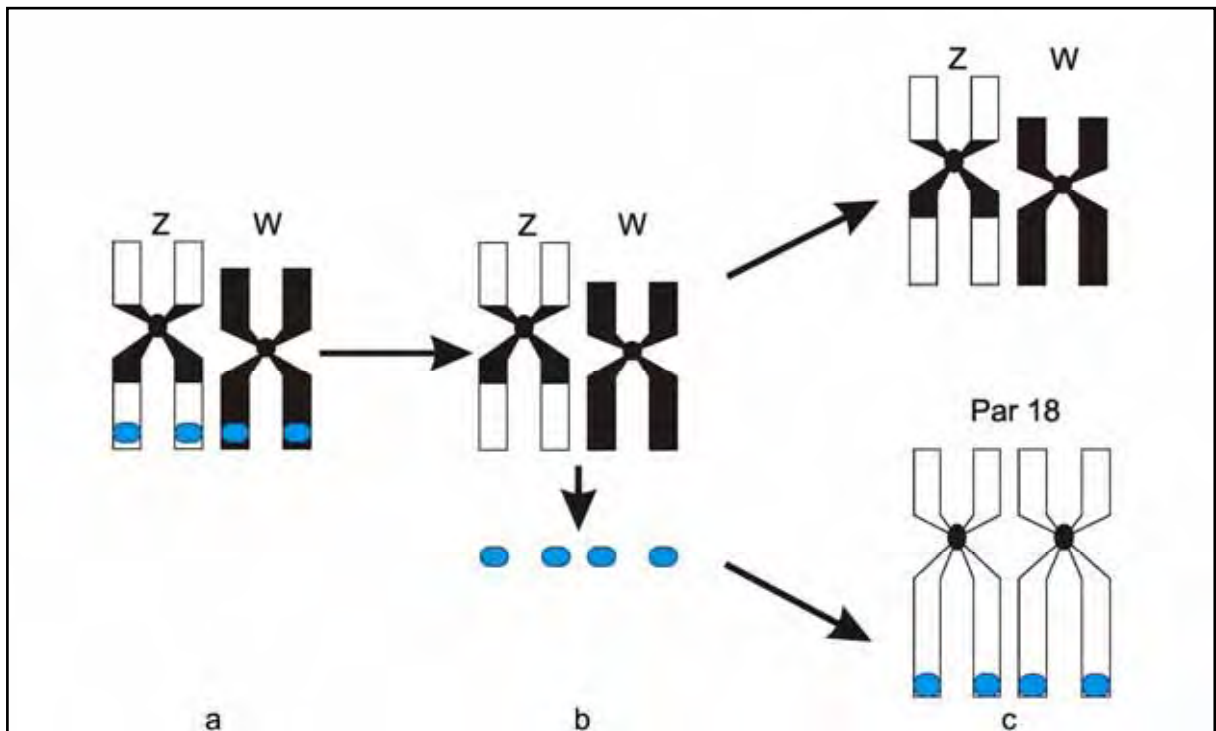


Figura 6: Esquema hipotético da possível diferenciação dos cromossomos Z e W nas populações de *Characidium cf. gomesi* analisadas. Em a, cromossomos Z e W portadores das RONS da população do ribeirão Alambari. Em b, possível perda das RONS pelos cromossomos Z e W ocorrida na população do rio Novo. Em c, fenótipo atual dos cromossomos Z e W e localização das RONS nos cromossomos do par 18 em *Characidium cf. gomesi* do rio Novo.

### **Capítulo 3**

**Conservação cariotípica em populações de *Characidium cf. zebra* (Teleostei, Characiformes, Crenuchidae): mapeamento físico dos genes ribossomais e ocorrência de triploidia natural**

**Resumo**

Foi realizada a análise citogenética de indivíduos representantes de cinco populações de *Characidium cf. zebra* capturados em componentes da bacia hidrográfica superior do Rio Paraná, utilizando técnicas citogenéticas básicas (Giemsa, RONS e bandamento C) e moleculares (marcação por fluorocromos base-específicos e hibridação *in situ* fluorescente com sondas de DNAr 18S e 5S). O número diplóide modal verificado para os exemplares de todas as amostras analisadas foi de  $2n=50$  cromossomos, sendo os cariótipos constituídos por 32 cromossomos metacêntricos e 18 submetacêntricos, com número fundamental (número de braços cromossômicos - NF) igual a 100 em indivíduos de ambos os sexos. Blocos de heterocromatina constitutiva foram observados nas regiões pericentroméricas de todos os cromossomos, exceto nos do par 23, que também apresentaram blocos heterocromáticos intersticiais nos braços longos, em todas as amostras. As regiões organizadoras de nucléolo (RONS), evidenciadas pela reação com nitrato de Prata, pela CMA<sub>3</sub> e pela sonda de DNAr 18S, foram caracterizadas em posição terminal do braço longo nos cromossomos do par 23, enquanto a hibridação fluorescente *in situ* com a sonda de DNAr 5S evidenciou uma ampla variação quanto à localização desse gene nos indivíduos das amostras analisadas. A amostra do rio Paraitinguinha apresentou DNAr 5S em posição intersticial de cinco cromossomos, nos pares um, seis e em um dos homólogos do par dezessete. Nas amostras do rio Novo, Alambari e Araquá, esse gene ribossomal foi localizado intersticialmente no par dezessete. Já na população do rio Juba, o DNAr 5S foi observado intersticialmente em cinco pares cromossômicos, os pares um, seis, nove, dezessete e dezoito. Um exemplar da população do rio Alambari, apresentou nas preparações cromossômicas células com 77 cromossomos, caracterizando a ocorrência de um caso de triploidia natural. Neste exemplar, o bandamento C evidenciou blocos de heterocromatina na região pericentromérica de todos os cromossomos, além da presença de blocos intersticiais em três deles. Por outro lado, as RONS identificadas pela prata e as marcações pela CMA<sub>3</sub> e pela sonda de DNAr 18S, foram observadas em apenas dois cromossomos. A grande similaridade cariotípica entre as amostras de *Characidium cf. zebra* estudadas sugere uma estreita relação entre elas. No entanto, os diferentes padrões de distribuição do DNAr 5S apresentados pelos indivíduos das amostras dos rios Paraitinguinha e rio Juba provavelmente decorrem da restrição do fluxo gênico entre estas populações durante sua história evolutiva. Aspectos relacionados à diversidade da

microestrutura cromossômica e à manutenção da macroestrutura cariotípica nas diferentes populações desta espécie são discutidos.

### **Introdução**

O gênero *Characidium* é o mais especioso da subfamília Characidiinae (Crenuchidae) e é constituído por cerca de 50 espécies de peixes reconhecidas como válidas e com ampla distribuição na região Neotropical, ocorrendo desde o Panamá até a Argentina (Buckup, 2003). A posição filogenética desse grupo tem-se apresentada problemática desde a descrição das primeiras espécies de Characidiinae, pois este grupo já foi considerado como membro de Hemiodontidae, como subfamília de Characidae e também como família independente. No entanto, alguns estudos utilizando a metodologia cladística sugerem que Characidiinae compõe, juntamente com Crenuchinae, a família Crenuchidae (Buckup, 1998).

No gênero *Characidium*, *Characidium zebra* caracteriza-se como uma difundida e polimórfica espécie que geralmente é citada na literatura com o nome incorreto de *Characidium fasciatum* (Buckup e Reis, 1997). Esta espécie caracteriza-se principalmente pela presença de peito e istmo completamente preenchidos por escamas. Morfologicamente, é considerada primitiva em relação às demais espécies do gênero e ocupa uma posição basal na filogenia de *Characidium*, pois apresenta diversos caracteres plesiomórficos (Buckup, 1993). A localidade tipo de *Characidium zebra* está situada na drenagem Amazônica, mas atualmente não existe nenhum estudo que defina os limites de sua ocorrência (Buckup e Reis, 1997). Devido ao seu posicionamento filogenético, a análise citogenética de espécies relacionadas à *Characidium zebra* caracteriza-se como um ponto de partida significativo para o entendimento de quaisquer eventos relacionados à evolução cariotípica dentro do gênero *Characidium*.

Neste sentido, no presente estudo foram analisados os cariótipos de cinco populações de *Characidium cf. zebra* provenientes de três importantes bacias brasileiras (Tietê, Paranapanema e Paraguai) com o objetivo de caracterizar citogeneticamente estas populações e estabelecer as possíveis relações evolutivas entre elas, contribuindo para o entendimento dos mecanismos envolvidos no processo de diferenciação cariotípica e de diversificação de espécies dentro do gênero *Characidium*.

## Material e Métodos

Foram analisados indivíduos amostrados em cinco populações de *Characidium cf. zebra*, provenientes de componentes de diferentes bacias hidrográficas brasileiras, indicadas na Tabela 1 e Figura 1. Os exemplares analisados foram fixados em formol a 10% e conservados em álcool 70% e após identificação, foram depositados no Museu do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes da UNESP de Botucatu, São Paulo.

As preparações de cromossomos mitóticos foram obtidas de tecido renal e brânquias utilizando-se a técnica referida em Foresti *et al.* (1981). A marcação das RONS pelo nitrato de Prata seguiu a técnica proposta por Howell e Black (1980) e o bandamento C, o protocolo descrito por Sumner (1972).

Na análise citogenética molecular foram utilizados os métodos de identificação de regiões cromossômicas ricas em GC, através do fluorocromo Cromomicina A<sub>3</sub> (Schweizer, 1976) e a identificação de regiões cromossômicas ricas em AT, através do fluorocromo DAPI (Schweizer *et al.*, 1978). O mapeamento dos sítios de DNAr 18S e 5S nos cromossomos metafásicos foi realizado pela aplicação da técnica de hibridação fluorescente *in situ*, de acordo com o procedimento estabelecido por Pinkel *et al.* (1986), com modificações, usando sonda de DNAr 18S obtida do peixe *Prochilodus argenteus* (Hatanaka & Galetti Jr., 2004) e sonda de DNAr 5S obtida da espécie *Leporinus elongatus* (Martins e Galetti Jr., 1999). A sonda 18S foi marcada com biotina 14-dATP por “nick translation”, seguindo as instruções do fabricante (Bionick Labelling System – Invitrogen). A detecção e amplificação do sinal de hibridização foram realizadas usando Avidina-fluoresceína conjugada (FITC) e anticorpo anti-avidina biotilado. A sonda 5S foi marcada com digoxigenina 11-dUTP (Roche Applied Science) por PCR (Polymerase Chain Reaction) e os sinais de hibridação foram detectados usando anti-digoxigenina-rodamina.

Os cromossomos metafásicos foram contracolorados com DAPI e analisados em fotomicroscópio óptico (Olympus BX61). As imagens foram capturadas usando o programa Image Pro Plus, 6.0 softwares (MediaCybernetics). Para o exemplar triplóide, os cromossomos foram contracolorados com iodeto de propídio. A morfologia cromossômica foi determinada de acordo com a relação de braços estabelecida por Levan *et al.* (1964), sendo os cromossomos classificados como metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a) e arranjados no cariótipo em ordem decrescente de tamanho.

## Resultados

A análise citogenética em indivíduos amostrados nas cinco populações de *Characidium cf. zebra* analisadas evidenciou um número diplóide constante de  $2n=50$  cromossomos, sendo os cariótipos constituídos por 32 cromossomos metacêntricos e 18 submetacêntricos. A heterocromatina constitutiva foi identificada de modo restrito na região pericentromérica de todos os cromossomos em indivíduos de ambos os sexos, exceto no par 23, que também apresentou blocos heterocromáticos em posição intersticial nos braços longos, em coincidência com as RONS (Figuras 2, 3, 4 e 5). Não foi observada a existência de heteromorfismo cromossômico de diferenciação sexual. As RONS, identificadas pela prata, pela CMA<sub>3</sub> e pelo DNAr 18S foram observadas em posição intersticial do par 23 (Figura 7).

A marcação com o fluorocromo Cromomicina A<sub>3</sub> mostrou que, para todas as populações, além das RONS corresponderem a frações de DNA ricas em pares de bases GC, elas são, como esperado, DAPI negativas (Figura 6).

A hibridação fluorescente *in situ* com o DNAr 5S evidenciou que os indivíduos da população do rio Paraitinguinha possuem sítios de DNAr 5S em posição intersticial de cinco cromossomos, nos pares um, seis e em um dos homólogos do par dezessete. Nas populações do rio Novo, Alambari e Araquá, esse gene ribossomal foi localizado em posição intersticial nos cromossomos do par dezessete. Já na população do rio Juba, o DNAr 5S foi observado em posição intersticial em cinco pares cromossômicos, nos pares um, seis, nove, dezessete e dezoito (Figura 8).

Foi observado ainda que um dos exemplares capturados no rio Alambari, apresentou células com 77 cromossomos, caracterizando um caso de triploidia natural. Neste exemplar, além dos cromossomos normais do lote triplóide, foi constatada a presença de dois cromossomos extras. O bandamento C evidenciou blocos de heterocromatina na região pericentromérica em todos os cromossomos, além da presença de blocos intersticiais em dois deles (Figura 9), tanto nos indivíduos diplóides quanto no triplóide. Os cromossomos extras mostraram-se eucromáticos. Contudo, as RONS desse exemplar, identificadas pela reação com o nitrato de Prata, pela CMA<sub>3</sub> e pela sonda de DNAr 18S, foram observadas em apenas dois cromossomos (Figura 10).

## Discussão

O estudo cromossômico de representantes das cinco populações de *Characidium cf. zebra* evidenciou um número diplóide constante de  $2n=50$  cromossomos e constituição cariotípica bastante similar, sendo o cariótipo formado por cromossomos dos tipos metacêntrico e submetacêntrico. Nestas populações, o primeiro par cromossômico apresenta-se como o maior do cariótipo e com acentuada diferença de tamanho em relação ao par número dois, constituindo-se em um importante marcador para a espécie. Diferentemente, em espécies como *Characidium cf. gomesi* (Centofante *et al.*, 2001; Maistro *et al.*, 1998, Capítulo 2), *Characidium lanei* (Noletto *et al.*, 2009, Capítulo 1) e *Characidium schubarti*, (Capítulo 1), os maiores cromossomos do cariótipo são representados pelo par submetacêntrico dezessete. A presença deste par cromossômico exclusivo no cariótipo, além dos padrões similares quanto à distribuição da heterocromatina constitutiva e das RONS, sugerem a existência de uma estreita relação entre estas populações de *Characidium cf. zebra*.

Considerando o posicionamento filogenético de *Characidium zebra* proposto por Buckup (1993), a ausência de um sistema de cromossomos sexuais diferenciado em representantes desta espécie caracterizaria uma condição plesiomórfica para o gênero *Characidium*, enquanto a presença do sistema exclusivo para alguns representantes deste gênero representaria uma sinapomorfia (Centofante *et al.*, 2003). Ainda segundo Centofante *et al.* (2003), a distribuição do sistema cromossômico sexual ZW com o cromossomo W heterocromático poderia caracterizar um mecanismo relativamente restrito a um pequeno conjunto de espécies estritamente relacionadas com *Characidium gomesi*. No entanto, das dez espécies de *Characidium* com dados citogenéticos atualmente conhecidos (Miyazawa e Galetti Jr., 1994; Maistro *et al.*, 1998; Centofante *et al.*, 2001; 2003 e Capítulo 1), apenas *Characidium cf. zebra* e *C. lagosantensis* não apresentam sistema ZZ-ZW de cromossomos sexuais, evidenciando que este sistema sexual está distribuído por um conjunto de espécies muito mais amplo.

O par cromossômico portador das regiões organizadoras de nucléolo (RONS, sítios de DNAr 18S e sítios CMA<sub>3</sub> positivos), identificado como sendo o par 23, mostrou identidade em todas as cinco populações de *Characidium cf. zebra* estudadas. Estes mesmos cromossomos evidenciam uma região DAPI negativa coincidente com o sítio das RONS, reforçando sua constituição rica em pares de bases GC e, alternativamente, pobre em bases AT. Entre os peixes (Pendás *et al.*, 1993; Vicari *et al.*, 2005) e anfíbios (Schmid, 1982), as



RONs apresentam-se geralmente como sítios positivos para os fluorocromos GC específicos, como a cromomicina e a mitramicina. No entanto, alguns segmentos de heterocromatina, que não são relacionados a sítios de RONs, também podem apresentar fluorescência e sinais brilhantes após a coloração com estes fluorocromos GC específicos (Artoni *et al.*, 1999).

No gênero *Characidium*, a hibridação *in situ* com o gene ribossômico 5S em cromossomos metafásicos tem evidenciado uma interessante distribuição cariotípica dessas sequências. Vicari *et al.* (2008), analisando uma população de *Characidium cf. gomesi* da bacia do Rio Tibagi, caracterizou o gene 5S em posição intersticial em um único par de cromossomos metacêntricos. Contudo, na análise realizada em indivíduos de outras duas populações de *Characidium cf. gomesi* (Capítulo 2) observou-se a presença dessa família multigênica em posição intersticial do par submetacêntrico 25 em representantes da população da bacia do Paranapanema e em posição intersticial dos pares 20 e 25 nos representantes da população da bacia do Tietê. No presente trabalho, as populações de *Characidium cf. zebra* do rio Alambari, Araquá e Novo apresentaram seus sítios de DNAr 5S em posição intersticial no par 17. Já as populações do rio Juba e Paraitinguinha, apresentaram estes sítios de DNAr amplamente distribuídos pelo cariótipo, indicando que, apesar da existência de uma estreita relação de origem entre estas populações, a restrição do fluxo gênico durante sua história evolutiva possivelmente originou os padrões existentes atualmente. Considerando que os sinais de hibridação com a sonda de DNAr 5S estão diretamente relacionados aos blocos de heterocromatina pericentromérica, é possível ainda supor que alguns desses sinais nas populações do rio Juba e Paraitinguinha correspondam a pseudogenes, que apresentariam uma sequência muito semelhante a do RNAr 5S, mas que estariam inativos, como sugerido ocorrer em *Centropyge aurantonotus* (Affonso e Galetti Jr., 2005). De qualquer forma, em todas as espécies e populações analisadas, o DNAr 5S foi localizado em compartimentos cromossômicos distintos do DNAr 18S, corroborando a situação mais frequentemente observada em vertebrados, na qual esses dois genes possivelmente seguem padrões evolutivos independentes (Lucchini *et al.*, 1993; Suzuki *et al.*, 1996).

No presente estudo, a ocorrência de triploidia natural em um exemplar de *Characidium cf. zebra* do rio Alambari poderia estar associada às características geográficas e climáticas da região de Botucatu, onde outros casos de triploidia natural já foram relatados (Maistro *et al.*, 1994). Em peixes, a ocorrência de fecundação externa e o fato da segunda divisão meiótica só terminar após a desova, associados às variações de temperatura do

Tabela 1: Exemplos de *Characidium pterostictum* analisados neste estudo. LBP: Coleção de Peixes Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, Instituto de Biociências, UNESP. F: fêmeas e M: machos

Espécie	LBP	Localidade	F	M	Coordenadas
<i>C. pterostictum</i>	7367	rio Betari – Apiaí – SP	15	5	S 24°33'73" W 48°40'16"
<i>C. pterostictum</i>	6831	rio Faú – Miracatu – SP	6	2	S 24°12'44" W 47°28'61"
<i>C. pterostictum</i>	768	rio Cari – Morretes – PR	8	4	S 25°29'19" W 48°49'97"
<i>C. pterostictum</i>	8701	rio Jacareí –Paranaguá – PR	8	3	S 25°32'23" W 48°41'19"
<i>C. pterostictum</i>	737	rio Itapocu – Jaraguá do Sul – SC	4	1	S 26°28'25" W 49°10'95"

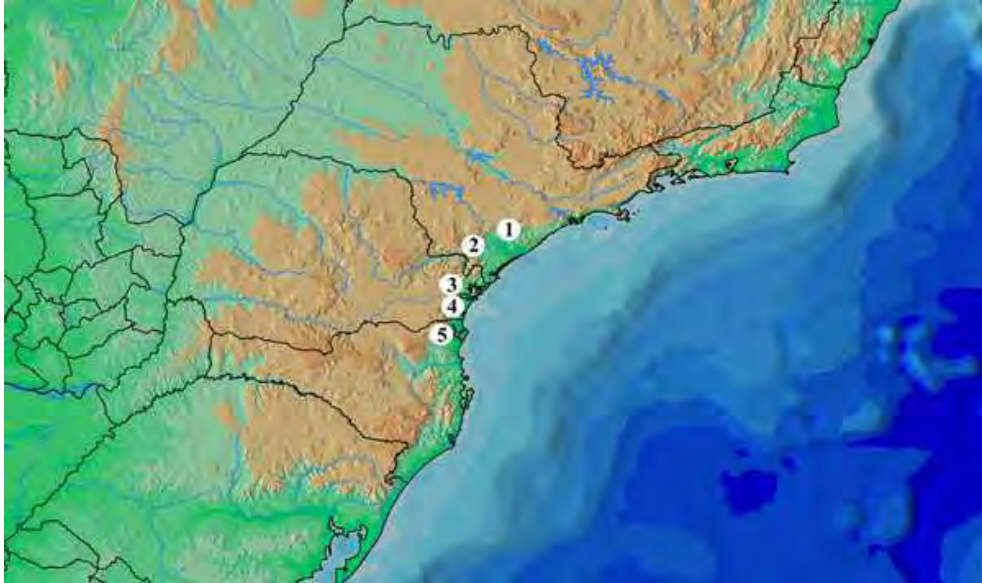


Figura 1: Mapa indicando os locais de coleta das populações de *Characidium pterostictum*. 1. Rio Faú, Miracatu, SP; 2. Rio Betari, Apiaí, SP; 3. Córrego Cari, Morretes, PR; 4. Rio Jacareí, Paranaguá, PR; 5. Rio Itapocu, Jaraguá do Sul, SC.

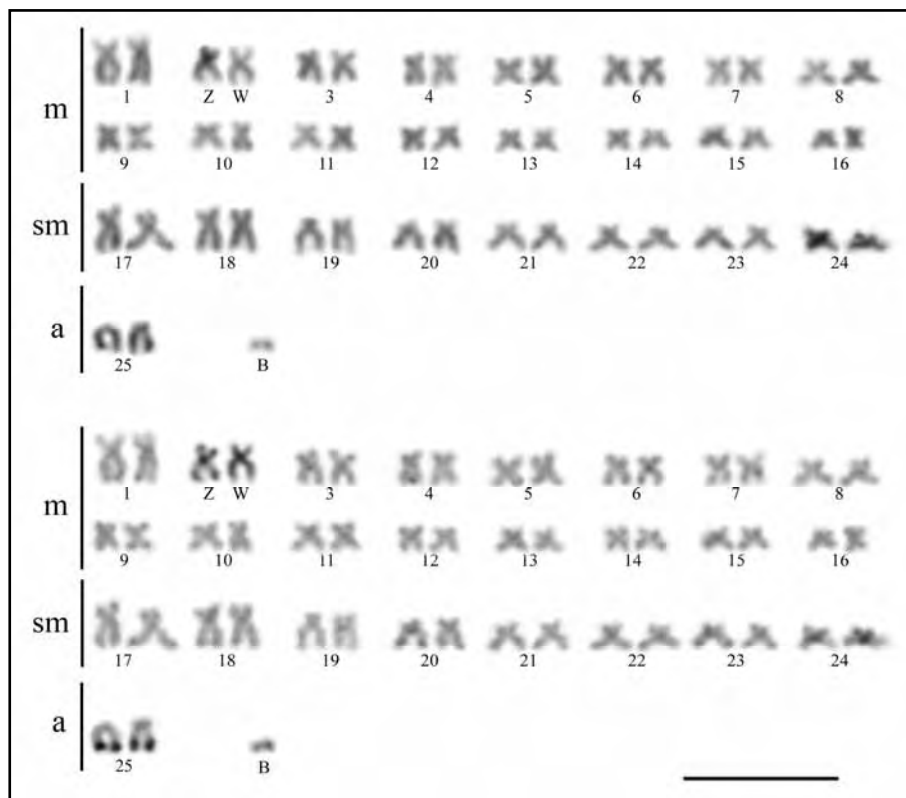


Figura 2: Cariótipos de exemplar macho de *Characidium pterostictum* de Apiaí com par de cromossomos acrocêntricos heteromórficos (par 25). Em a, cariótipo após coloração com Giemsa e em b, após o bandamento C. A barra equivale a 10 µm.

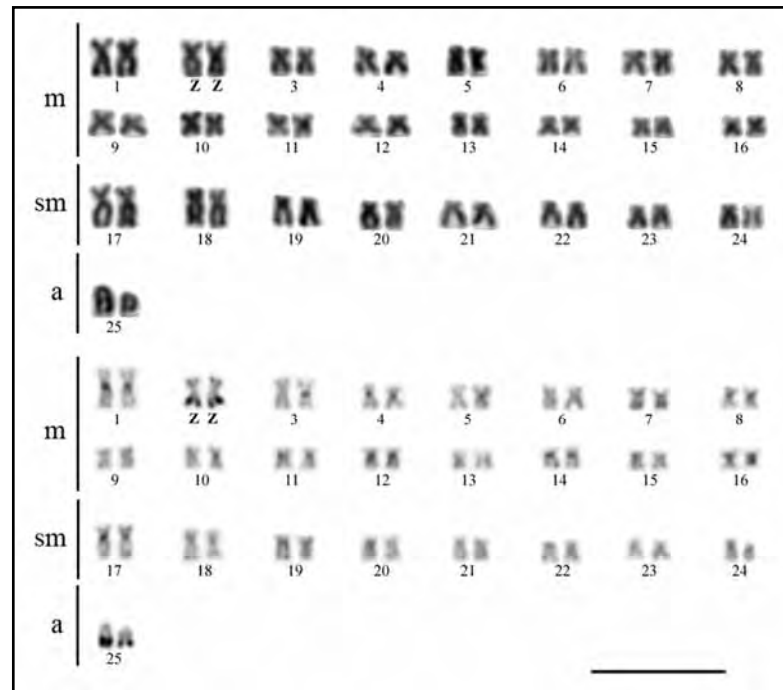


Figura 3: Cariótipos de exemplar macho de *Characidium pterostictum* de Apiaí com par de cromossomos acrocêntricos heteromórficos (par 25). Em a, cariótipo após coloração com Giemsa e em b, após o bandamento C. A barra equivale a 10  $\mu$ m.

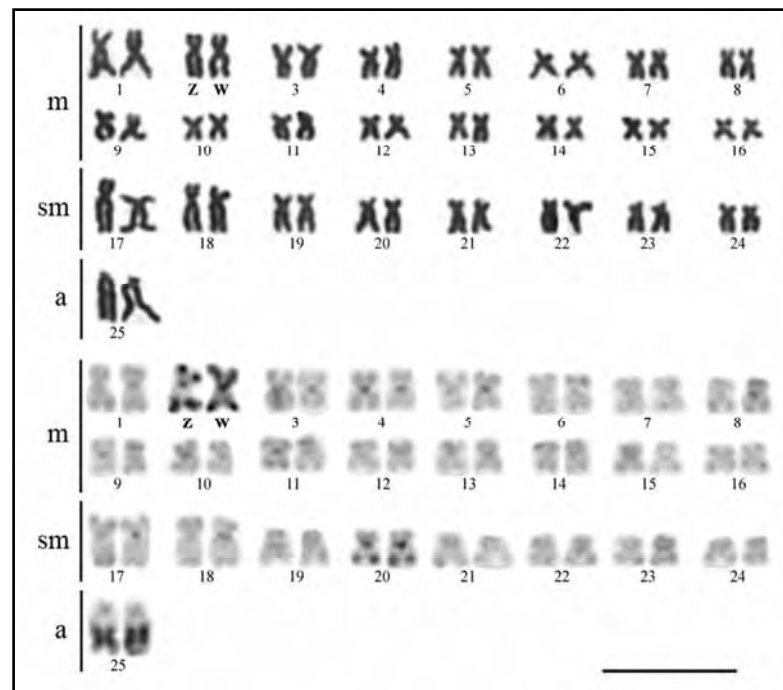


Figura 4: Cariótipos de exemplar fêmea de *Characidium pterostictum* de Jaraguá do Sul com par de cromossomos subtelo-cêntricos que apresentam blocos de heterocromatina duplicados (par 25). Em a, cariótipo após coloração com Giemsa e em b, após o bandamento C. A barra equivale a 10  $\mu$ m.

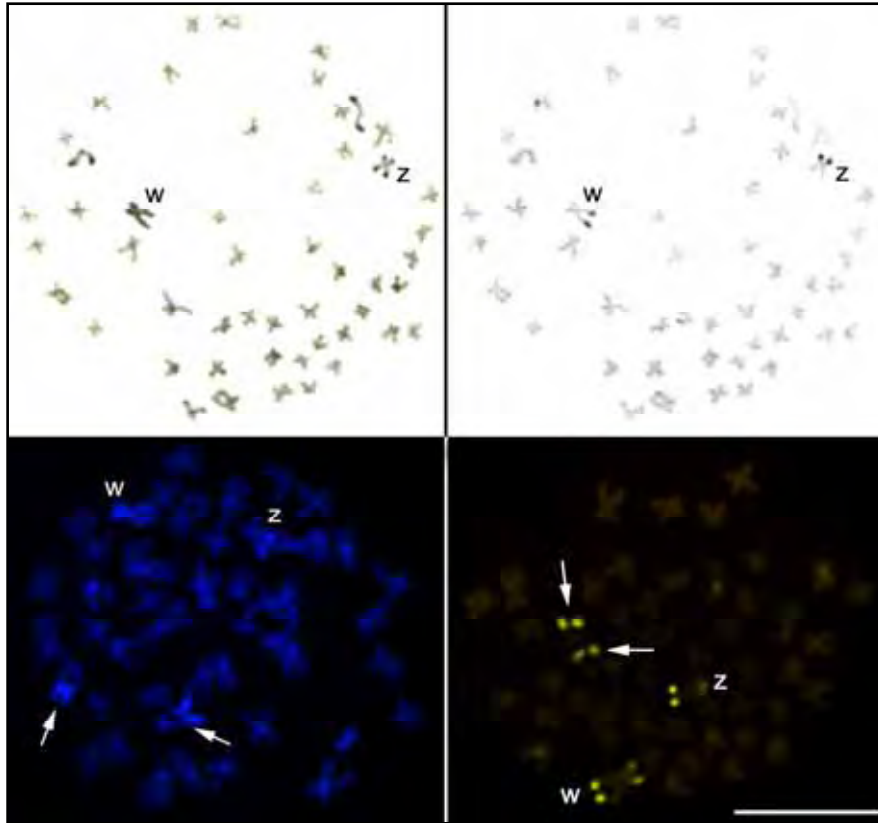


Figura 5: Metáfases de *Characidium pterostictum*. Em a e b, cromossomos sequencialmente marcados pela técnica de banda C (a) e Ag-RONs (b). Destaque para os cromossomos Z e W portadores de RONS. Em c e d, cromossomos marcados pelo fluorocromo DAPI (c) e pelo fluorocromo CMA<sub>3</sub> (d). Destaque para os cromossomos sexuais e para os cromossomos acrocêntricos (setas). A barra equivale a 10  $\mu$ m.

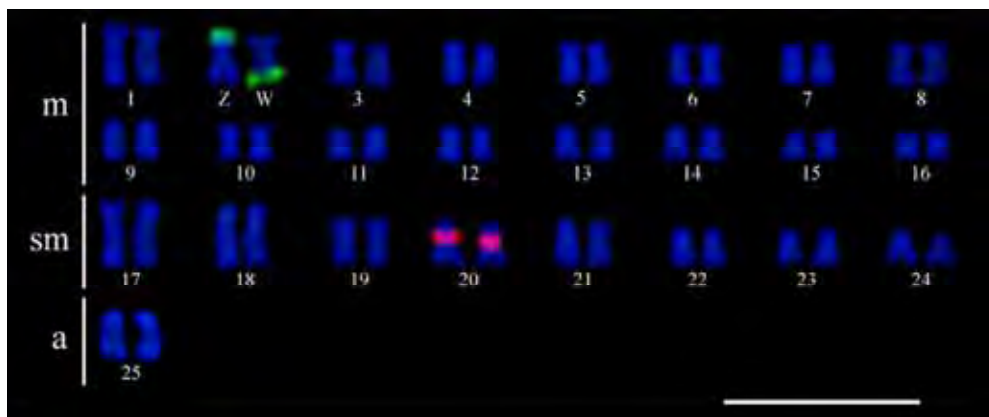


Figura 6: Cariótipo de exemplar fêmea de *Characidium pterostictum*, mostrando os sítios de DNAr 18S corados com avidina FITC e presentes nos cromossomos Z e W e os sítios de DNAr 5S, corados com anti digoxigenina rodamina presentes no par 20. A barra equivale a 10  $\mu$ m.

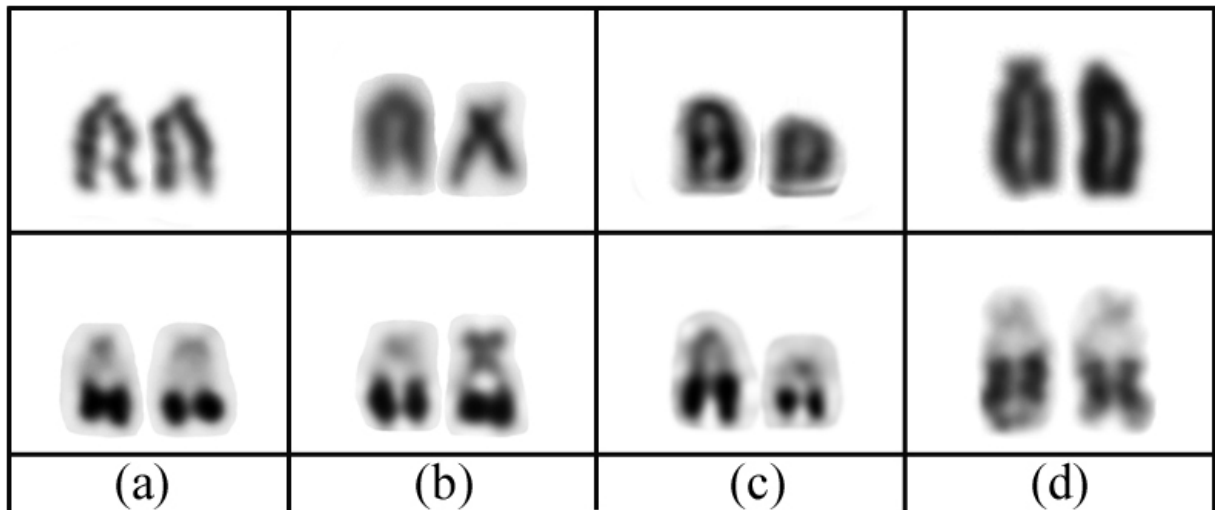


Figura 7: Cromossomos subtelocêntricos/acrocêntricos evidenciados nas populações de *Characidium pterostictum* analisadas, após coloração com Giemsa (fileira superior) e bandamento C (fileira inferior). Em a, padrão apresentado pelas populações de Miracatu, Morretes e Paranaguá. Em b e c, padrões apresentados pela população de Apiaí. Em d, padrão apresentado pela população de Jaraguá do Sul.

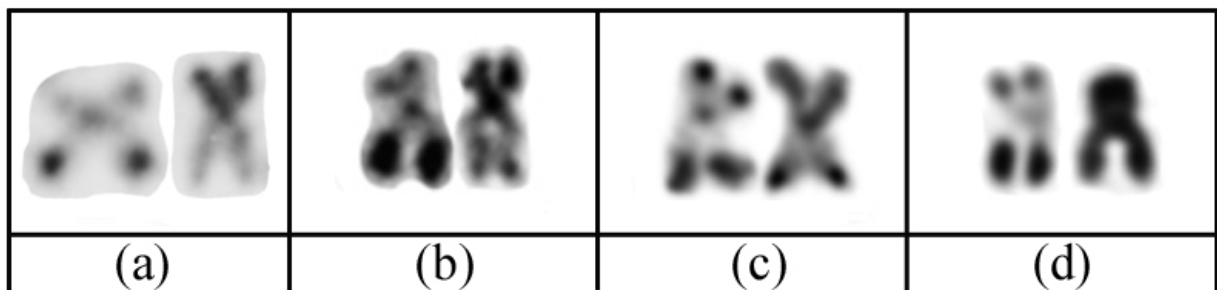


Figura 8: Cromossomos sexuais ZW apresentados pelas populações analisadas. Enquanto os cromossomos Z apresentam o mesmo padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva, o W apresenta-se mais heterocromático em algumas populações. Em a, cromossomos sexuais da população de Miracatu. Em b, Apiaí, em c, Jaraguá do Sul e em d, cromossomos sexuais apresentados pelas populações de Morretes e Paranaguá.

## **Capítulo 5**

**Distribuição das sequências teloméricas (TTAGGG)<sub>n</sub> em três espécies de peixes do gênero *Characidium***

**Resumo**

Estudos citogenéticos envolvendo a distribuição cromossômica das conservadas sequências teloméricas (TTAGGG)<sub>n</sub> em vertebrados foram realizados com a aplicação da técnica de hibridação fluorescente *in situ* (FISH) em três espécies de peixes do gênero *Characidium*, *Characidium cf. zebra*, *Characidium pterostictum* e *Characidium cf. gomesi*. Estas espécies apresentam 2n=50 cromossomos, mas *Characidium pterostictum* apresenta, em adição aos cromossomos metacêntricos e submetacêntricos comuns para o gênero, um exclusivo e ambíguo par de cromossomos subtelo-cêntricos/acrocêntricos. Neste sentido, a análise e identificação da distribuição dessas sequências teloméricas poderiam trazer informações sobre o processo de diversificação cromossômica e evolução cariotípica destas espécies. De maneira esperada, sinais de hibridação foram observados na porção final de todos os cromossomos nas três espécies, inclusive nos cromossomos B de *Characidium cf. gomesi*. No entanto, o padrão de hibridação demonstra que estas sequências estão organizadas de maneira distinta no cariótipo dos representantes deste grupo. Enquanto *Characidium cf. zebra* e *Characidium cf. gomesi* possuem apenas marcações finais, o cariótipo de *Characidium pterostictum* apresenta vários sítios teloméricos intersticiais (ITS). Comparando esses sítios teloméricos intersticiais com o padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva nesta espécie, evidencia-se uma correspondência das marcações intersticiais com as sondas teloméricas com regiões heterocromáticas. Por outro lado, o par acrocêntrico de *Characidium pterostictum* não apresentou nenhum sinal de hibridação em regiões intersticiais, dando indicações de que outros mecanismos de modificação estrutural dos cromossomos, como inversões pericêntricas, poderiam estar envolvidos na formação deste par cromossômico. A estabilidade na macroestrutura cromossômica apresentada pelo gênero *Characidium*, bem como a relação dos sítios não teloméricos com blocos heterocromáticos, sugerem que os sítios intersticiais teloméricos em *Characidium pterostictum* não indicariam necessariamente a ocorrência de eventos de fusão dos cromossomos e sim que sequências homólogas às teloméricas poderiam fazer parte do DNA repetitivo presente em alguns cromossomos.



## Introdução

O DNA telomérico está presente em praticamente todos os eucariotos e se localiza na porção terminal dos cromossomos numa região denominada telômero. Esse DNA é composto de um número variável de repetições (TTAGGG)<sub>n</sub> em cadeia e sua função está relacionada à manutenção da estrutura cromossômica, resolvendo um problema funcional relacionado à replicação de moléculas lineares de DNA que constituem os cromossomos (Griffiths *et al.*, 2001). Essa seqüência (TTAGGG)<sub>n</sub> foi inicialmente identificada em posição final de cromossomos humanos (Moyzis *et al.*, 1998) e posteriormente reconhecidas como autênticas seqüências teloméricas devido a sua distribuição e localização conservada em todos os vertebrados analisados (Meyne *et al.*, 1990).

Vários estudos realizados em diferentes espécies de vertebrados usando a técnica de hibridação fluorescente *in situ* com sonda de DNA telomérico (TTAGGG)<sub>n</sub> têm revelado que seqüências teloméricas não ocorrem somente em posição final dos cromossomos, mas também em diferentes sítios intersticiais, entre os braços cromossômicos e em posição pericentromérica (Meyne *et al.*, 1990; Garagna *et al.*, 1997; Pagnozzi *et al.*, 2002; Nanda *et al.*, 2002 e 2008). Seqüências teloméricas encontradas em regiões pericentroméricas podem indicar a ocorrência de eventos de fusão cromossômica durante o processo de evolução cariotípica entre as espécies. No entanto, estas mesmas seqüências podem existir como um componente do DNA satélite que geralmente é encontrado nos centrômeros (Nanda *et al.*, 2008).

A subfamília de peixes Characidiinae é formada por nove gêneros e constitui um grupo bastante interessante do ponto de vista cariotípico. O gênero *Characidium*, o mais specioso dessa subfamília, é formado por cerca de 50 espécies reconhecidas como válidas e apresenta ampla distribuição na região Neotropical, ocorrendo do Panamá até a Argentina (Buckup, 2003).

Os estudos cromossômicos no gênero *Characidium* têm evidenciado características particulares para cada espécie e/ou população analisada. Apesar dos dados citogenéticos disponíveis indicarem a manutenção no número diplóide (2n=50 cromossomos), observa-se extensa variação cariotípica entre as espécies, seja na estrutura e morfologia dos cromossomos, no posicionamento das RONS, na existência de cromossomos sexuais, na presença de cromossomos B e até na ocorrência de casos de poliploidia (Maistro *et al.*, 1998 e 2004; Centofante *et al.*, 2001 e 2003; Vicari *et al.*, 2008; Capítulo 1, 2 e 3).

No presente trabalho foram aprofundados os estudos cariotípicos em três espécies do gênero *Characidium* pela análise da distribuição de sequências teloméricas nos cromossomos, que forneceram informações de interesse para uma melhor compreensão do processo de diversificação cromossômica e de evolução cariotípica neste grupo de organismos.

### **Material e Métodos**

Neste estudo foram utilizadas três espécies de peixes do gênero *Characidium*, *Characidium cf. zebra*, *Characidium cf. gomesi* e *Characidium pterostictum*. Os indivíduos da população de *Characidium cf. zebra* estudados foram capturados no rio Paraitinga, bacia do rio Tietê (Salesópolis, SP - S 23°30'40 / W 45°51'32); os da população de *Characidium cf. gomesi* foram capturados no rio Novo, bacia do rio Paranapanema (Avaré, SP - S 23°01'26 / W 48°49'32) e os da população de *Characidium pterostictum* foram capturados no Rio Betari, bacia do rio Ribeira (Apiáí, SP - S 24°33'03 / W 48°40'49). Os exemplares analisados foram fixados em formol a 10% e conservados em álcool 70% e após identificação, foram depositados no Museu do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes da UNESP de Botucatu, São Paulo, Brasil.

Nas preparações para obtenção de cromossomos mitóticos foram utilizados fragmentos de tecido renal e brânquias, seguindo-se a técnica utilizada por Foresti *et al.* (1981). O bandamento C foi realizado seguindo o protocolo descrito por Sumner (1972).

A sonda utilizada para detecção das sequências teloméricas foi amplificada por PCR (Polymerase Chain Reaction), usando *primers* (TTAGGG)<sub>5</sub> e (CCCTAA)<sub>5</sub>. Ela foi marcada com digoxigenina 11-dUTP (Roche Applied Science) por PCR e os sinais de hibridação foram detectados usando anti-digoxigenina-rodamina. Os cromossomos metafásicos foram tratados de acordo com o procedimento descrito por Pinkel *et al.* (1986), com modificações, contracolorados com Vectashield® Mounting Medium com DAPI e analisados em fotomicroscópio óptico (Olympus BX61). As imagens metafásicas foram capturadas separadamente e sobrepostas usando o programa Image Pro Plus, 6.0 software (MediaCybernetics).

A morfologia cromossômica foi determinada de acordo com a relação de braços estabelecida por Levan *et al.*, (1964). Os cromossomos foram classificados como metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a) e arranjados no cariótipo em ordem decrescente de tamanho.

Para comparar a distribuição dos ITS em *Characidium pterostictum* com o padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva, as imagens coloridas após a hibridação *in situ*, foram convertidas para o modo cinza “grayscale” e depois invertidas para branco e preto usando o software Adobe Photoshop versão 11.0 - Adobe System, para processar imagem.

## Resultados

As três espécies de *Characidium* analisadas no presente estudo, *Characidium cf. zebra*, *Characidium cf. gomesi* e *Characidium pterostictum* apresentaram cariótipo com  $2n=50$  cromossomos, conforme apresentado nos Capítulos 1 e 2. *C. cf. zebra* e *C. cf. gomesi* possuem apenas cromossomos dos tipos meta e submetacêntricos em seu complemento cromossômico A, além de até quatro cromossomos B em *C. cf. gomesi*, enquanto *C. pterostictum* apresenta em seu cariótipo um exclusivo par de cromossomos acrocêntricos, conforme apresentado nos Capítulos 1 e 2.

A aplicação da técnica FISH com a sonda telomérica (TTAGGG)<sub>n</sub> evidenciou sinais de hibridação em posição final de todos os cromossomos das três espécies, inclusive nos cromossomos B de *Characidium cf. gomesi* (Figuras 1 e 2). No entanto, o padrão de hibridização demonstra que estas sequências estão organizadas de maneira distinta no cariótipo destas espécies. Enquanto *Characidium cf. gomesi* e *Characidium cf. zebra* possuem apenas marcações nas regiões terminais dos cromossomos, o cariótipo de *Characidium pterostictum* apresenta um número elevado de sítios com marcação intersticial, provavelmente ITS, que foram observadas correspondentes em algumas regiões pericentroméricas heterocromáticas. A aplicação da técnica de FISH mesmo com solução de hibridação de menor estríngência, não revelou a presença de sítios intersticiais em *Characidium cf. gomesi* e em *Characidium cf. zebra* (Figuras 1 e 2). Por outro lado, em *Characidium pterostictum*, os ITS estiveram sempre presentes em 8 cromossomos autossômicos mesmo em condições de hibridação de alta especificidade (Figuras 1c e 2c), na forma de blocos fluorescentes conspícuos. Não foram observados sinais de hibridação em sítios intersticiais nos cromossomos sexuais e nos cromossomos acrocêntricos e os cromossomos B apresentaram as terminações de ambos os braços marcadas.

A distribuição de heterocromatina constitutiva entre estas três espécies apresenta padrões distintos. Enquanto *C. cf. gomesi* e *C. pterostictum* apresentam cromossomos B e cromossomos sexuais heterocromáticos e em distintos níveis de diferenciação, *C. cf. zebra*

não apresenta cromossomos sexuais morfologicamente diferenciados, bem como heterocromatina restrita apenas às regiões pericentroméricas dos cromossomos (Figura 3).

### Discussão

Estudos citogenéticos recentes em espécies de peixes do gênero *Characidium* têm demonstrado presença de uma macroestrutura cariotípica bastante conservada (capítulos 1 e 2), caracterizada pela uniformidade no número diplóide de  $2n=50$  cromossomos, no tamanho e na morfologia dos cromossomos dos representantes deste grupo. Tal situação poderia ser indicativa da ocorrência de poucos eventos ligados a rearranjos cromossômicos como fissões ou fusões cêntricas, determinantes de alterações cromossômicas em grande escala durante o processo de evolução cariotípica das espécies. No entanto, *Characidium pterostictum*, espécie que ocorre em riachos litorâneos das regiões sul e sudeste do Brasil, apresenta um exclusivo par de cromossomos acrocêntricos, característica que não é compartilhada com as demais espécies já cariotipadas (Capítulos 1 e 4).

A aplicação da técnica de hibridização fluorescente *in situ*, com a sonda para a conservada sequência telomérica  $(TTAGGG)_n$  revelou sinais de hibridação nas extremidades de todos os cromossomos em todas as espécies analisadas (Figuras 1 e 2). No entanto, o padrão de hibridação das sequências teloméricas em *C. pterostictum* (Figura 1e e 2c) é notavelmente diferente do padrão observado nas outras espécies de *Characidium*. Um número elevado de sítios não teloméricos, marcados com a sonda  $(TTAGGG)_n$ , foram visualizados em todas as metáfases analisadas desta espécie, mesmo em condições de alta estringência. Além disso, dos oito pares cromossômicos que apresentam ITS, os pares 6, 8 e 11 caracterizam-se por apresentar grandes blocos pericentroméricos, que poderiam indicar diferenças nas repetições das sequências teloméricas nestes sítios não teloméricos.

Sítios intersticiais teloméricos caracterizam-se como grandes blocos de DNA telomérico que se localizam principalmente em regiões centromérica e pericentromérica dos cromossomos (Meyne *et al.*, 1990). Desde a primeira análise citogenética realizada por Meyne *et al.* (1990) em 100 espécies de vertebrados, ITS foram localizados e descritos em vários mamíferos, como primatas do gênero *Eulemur* (Garagna *et al.*, 1997; Go *et al.*, 2000), roedores (Bertoni *et al.*, 1996; Fagundes e Yonenaga-Yassuda, 1998; Castiglia *et al.*, 2006, Ventura *et al.*, 2006), marsupiais (Pagnozzi *et al.*, 2000; Metcalfe *et al.*, 2007), carnívoros (Wurster-Hill *et al.*, 1989), cetartiodactyla (Scherthan, 1990, Lee *et al.*, 1993; Vermeesch *et al.*, 1996), perissodactyla (Santani *et al.*, 2002), quirópteros (Finato *et al.*, 2000) bem como

nos anfíbios (Wiley *et al.*, 1992; Nanda *et al.*, 2008), répteis (Schmid *et al.*, 1994; Pellegrino *et al.*, 1999), peixes (Abuín *et al.*, 1996) e aves (Nanda *et al.*, 2002).

Os sítios teloméricos intersticiais já foram considerados restos ancestrais de rearranjos cromossômicos produzidos durante a evolução do cariótipo em diferentes taxa (Lee *et al.*, 1993; Thomsen *et al.*, 1996; Vermeesch *et al.*, 1996; Fagundes e Yonenaga-Yassuda, 1998; Metcalfe *et al.*, 2007; Pellegrino *et al.*, 1999; Finato *et al.*, 2000; Go *et al.*, 2000). Rearranjos cromossômicos como inversões, translocações, fusões e fissões podem contribuir para a reorganização da arquitetura do genoma, oferecendo novas formas cromossômicas na qual a seleção natural pode atuar. Este é o quadro evolutivo no qual sequências teloméricas localizadas intersticialmente nos cromossomos podem desempenhar um papel importante, identificando a ocorrência de processos de modificação da morfologia cromossômica. Na verdade, tem sido postulado que rearranjos cromossômicos como fusões Robertsonianas desempenham um papel significativo no processo de especiação. Esta hipótese foi exemplificada pelo *Monobrachial Fusion Model* postulado por Baker e Bickham (1986), segundo o qual fusões cêntricas cromossômicas podem ser fixadas de maneira isolada em populações com o mínimo de problemas meióticos quando combinados em heterozigose. Slijepcevic (1998) analisou os possíveis mecanismos subjacentes a formação de vários tipos de fusões Robertsonianas em relação à presença/ausência de sequências teloméricas no cromossomo resultante. Considerando que os telômeros estão relacionados à manutenção da estrutura cromossômica, com a função de proteger e “selar” as extremidades dos cromossomos, fusões Robertsonianas exigiriam a eliminação ou inativação dos telômeros antes da ocorrência do rearranjo. Quando os telômeros são eliminados por quebra cromossômica, as sequências teloméricas intersticiais estariam ausentes no local de fusão. Tal situação foi demonstrada em camundongos selvagens após fusões cromossômicas Robertsonianas (Garagna *et al.*, 2001). Já nos casos em que sequências teloméricas não são perdidas, os cromossomos resultantes a partir da fusão apresentariam ITS em regiões pericentroméricas. Um grande conjunto de evidências sugere que estes ITS são regiões instáveis onde fissões e inversões podem ocorrer durante a evolução cariotípica. Neste contexto, ITS representariam pontos possíveis de cisão em que novos telômeros poderiam surgir, sendo semeados pelas repetições teloméricas pré-existentes, estabilizando o cromossomo rearranjado durante a evolução (Ruiz-Herrera *et al.*, 2008).

Ruiz-Herrera *et al.* (2008), depois de analisar diversos padrões observados em espécies de mamíferos nas quais ITS têm sido descritas, sugeriram um mecanismo de quatro etapas para explicar a presença deste tipo de repetições teloméricas intracromossômicas como

resultado da reorganização cromossômica na evolução: (1) ocorrência de eventos iniciais de fusão; (2) amplificação e/ou degeneração de repetições teloméricas; (3) reorganizações posteriores e (4) ruptura/cisão da estrutura existente. Na primeira etapa, a sequência telomérica cromossômica poderia ser mantida após um evento de fusão, resultando em diferentes padrões de distribuição de sinais teloméricos intersticiais, localizados nas regiões pericentroméricas dos cromossomos na maioria dos casos. Este seria o caso de espécies de mamíferos com uma história evolutiva cromossômica caracterizada por eventos de fusão, tais como alguns roedores (*Mus minutoides*, Castiglia *et al.*, 2006) e lêmures (várias espécies de *Eulemur* e *Hapalemur*, Garagna *et al.*, 1997; Go *et al.*, 2000). Uma segunda etapa envolveria a ampliação do número de repetições teloméricas através de vários mecanismos, tais como a ocorrência de crossing-over desigual e o deslizamento da DNA polimerase causando a expansão das matrizes teloméricas intersticiais, como ocorre para outras sequências repetidas em *tandem* (Elder e Turner, 1995). Já uma terceira etapa, caracterizar-se-ia pela colocalização dos sítios teloméricos intersticiais com regiões de quebras cromossômicas espontâneas e induzidas, como relatado ocorrer para o hamster chinês (Alvarez *et al.*, 1993; Bolzan e Bianchi, 2006), apoiando a hipótese de que grandes blocos de repetições teloméricas podem conferir fragilidade na região onde estão inseridos. Por fim, numa quarta etapa, se a ruptura ocorrer em qualquer região com ITS, a presença de repetições teloméricas proporcionaria a oportunidade para a montagem de um novo telômero estável (Flint *et al.*, 1994; Sprung *et al.*, 1999).

A presença de sequências teloméricas intersticiais em *Characidium pterostictum* poderia apontar como uma assinatura de fusões cromossômicas. Contudo, dada a homogeneidade entre os cariótipos das espécies de *Characidium* é pouco consistente assumir que a origem destes ITS seria decorrente deste tipo de rearranjo cromossômico. Tal situação poderia ser aceita se fosse observada uma diferença acentuada na estrutura cariotípica das espécies deste grupo. Por outro lado, a análise do bandamento C em cromossomos metafásicos de *C. pterostictum* revelou diversas regiões heterocromáticas em posição pericentromérica que correspondem claramente aos sítios teloméricos intersticiais. Nesse sentido, o argumento mais parcimonioso para explicar a presença de sequências teloméricas em sítios intersticiais seria que a sequência (TTAGGG)<sub>n</sub> constituiria uma fração do DNA repetitivo do genoma de algumas espécies de *Characidium*. Considerando que as espécies de *Characidium* que apresentam sistema ZZ-ZW de cromossomos sexuais são mais relacionadas entre si do que espécies que não apresentam tal sistema (Centofante *et al.*, 2003), bem como o fato de *C. cf. gomesi* e *C. pterostictum* apresentarem um padrão homogêneo de distribuição da

heterocromatina constitutiva (Figuras 3d, f), seria plausível apontar que *C. cf. gomesi* e *C. pterostictum* apresentariam um padrão mais similar de distribuição das sequências teloméricas, principalmente quando comparados a *C. cf. zebra* (Figura 3b). No entanto, a ausência de ITS em *C. cf. zebra* e *C. cf. gomesi* caracterizam a origem e a expansão dessas sequências (TTAGGG)<sub>n</sub> repetidas ocorrendo exclusivamente em *C. pterostictum* como um evento que necessita de novas investigações.

A presença do exclusivo par de cromossomos subtelo/acrocêntrico em *C. pterostictum* poderia ter sua origem relacionada com a presença destes ITS. Diante da fragilidade conferida à região cromossômica onde os ITS estão localizados (Ruiz-Herrera *et al.*, 2008), um rearranjo cromossômico estrutural do tipo inversão envolvendo um par original de submetacêntricos poderia explicar a formação do par cromossômico subtelo/acrocêntrico existente. De fato, *C. pterostictum*, caracteriza-se como a única espécie com estes cromossomos e com ITS. Já a inexistência de ITS no par subtelo/acrocêntrico de *C. pterostictum* na amostra analisada poderia ser atribuída, se anteriormente ele estivesse presente, à plasticidade desses sítios teloméricos, resultando na sua redução progressiva e eventual perda das sequências teloméricas na região onde o rearranjo ocorreu.

A origem e expansão das sequências teloméricas intersticiais no cariótipo de *C. pterostictum* aparentemente não foram derivadas por eventos de fusão. Nenhuma indicação direta sobre qualquer função específica para o ITS foi fornecida até agora. Assim, trabalhos futuros envolvendo estas sequências teloméricas, bem como a análise mais ampla do cariótipo e uma maior amostragem dos representantes do gênero *Characidium* poderão trazer valiosas informações sobre a distribuição e os possíveis papéis dessas sequências no genoma de diferentes grupos animais.

### **Referências Bibliográficas**

As referências correspondentes a este capítulo encontram-se no final desta tese.

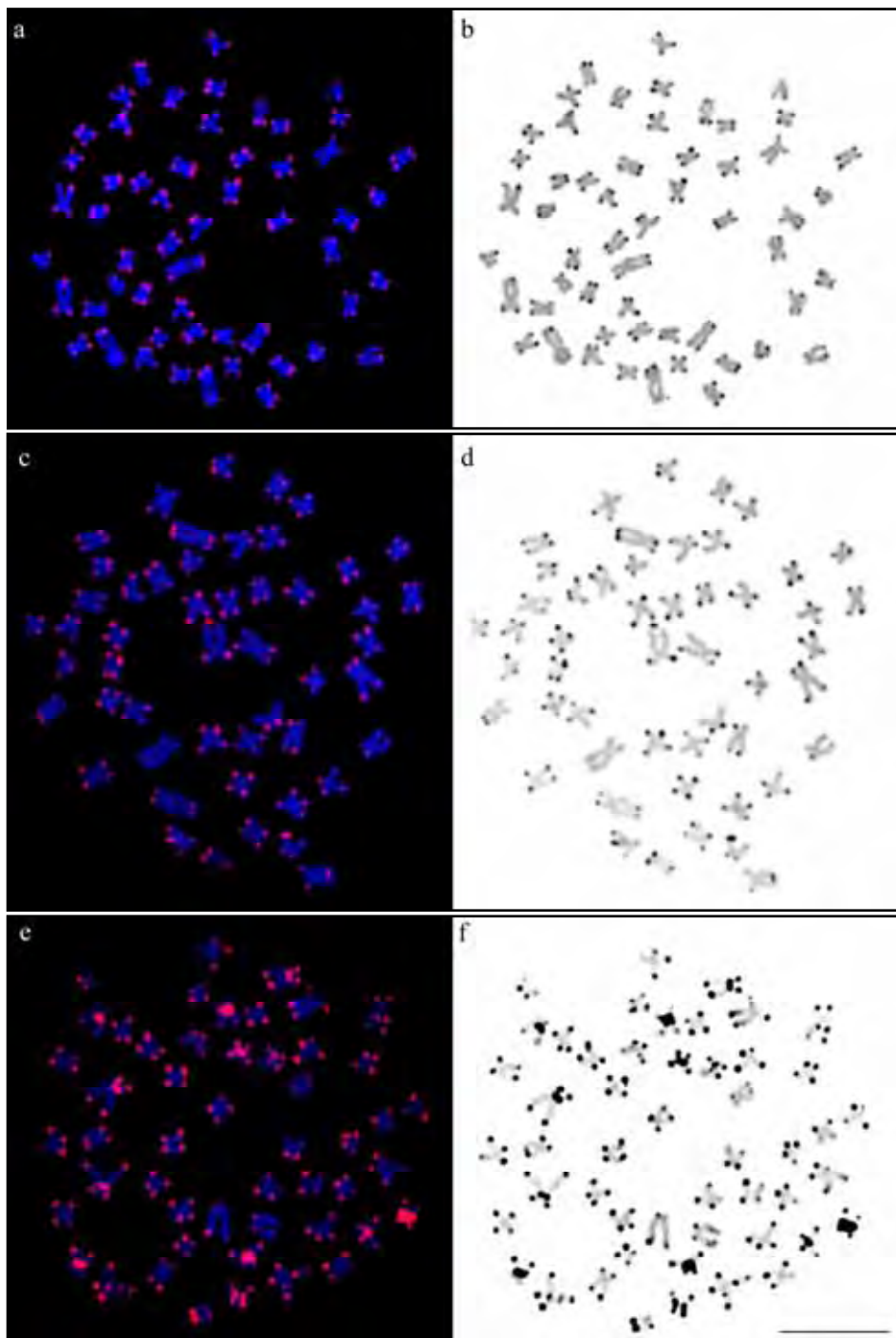


Figura 1. Localização dos sítios teloméricos e não-teloméricos em metáfases de três espécies de *Characidium* após hibridação *in situ* com sonda telomérica (TTAGGG)<sub>n</sub>. Em a e b, *Characidium cf. gomesi*, em c e d, *Characidium cf. zebra* e em e e f, *Characidium pterostictum*. Observe a presença de sítios teloméricos intersticiais (ITS) em regiões pericentroméricas de *C. pterostictum* (e, f), e a ausência destes ITS em *C. cf. gomesi* (a, b) e *C. cf. zebra* (c, d). As figuras à direita (b, d, f) representam as mesmas metáfases visualizadas a esquerda (a, c, e), mas invertidas em branco e preto. A barra equivale a 10  $\mu$ m.



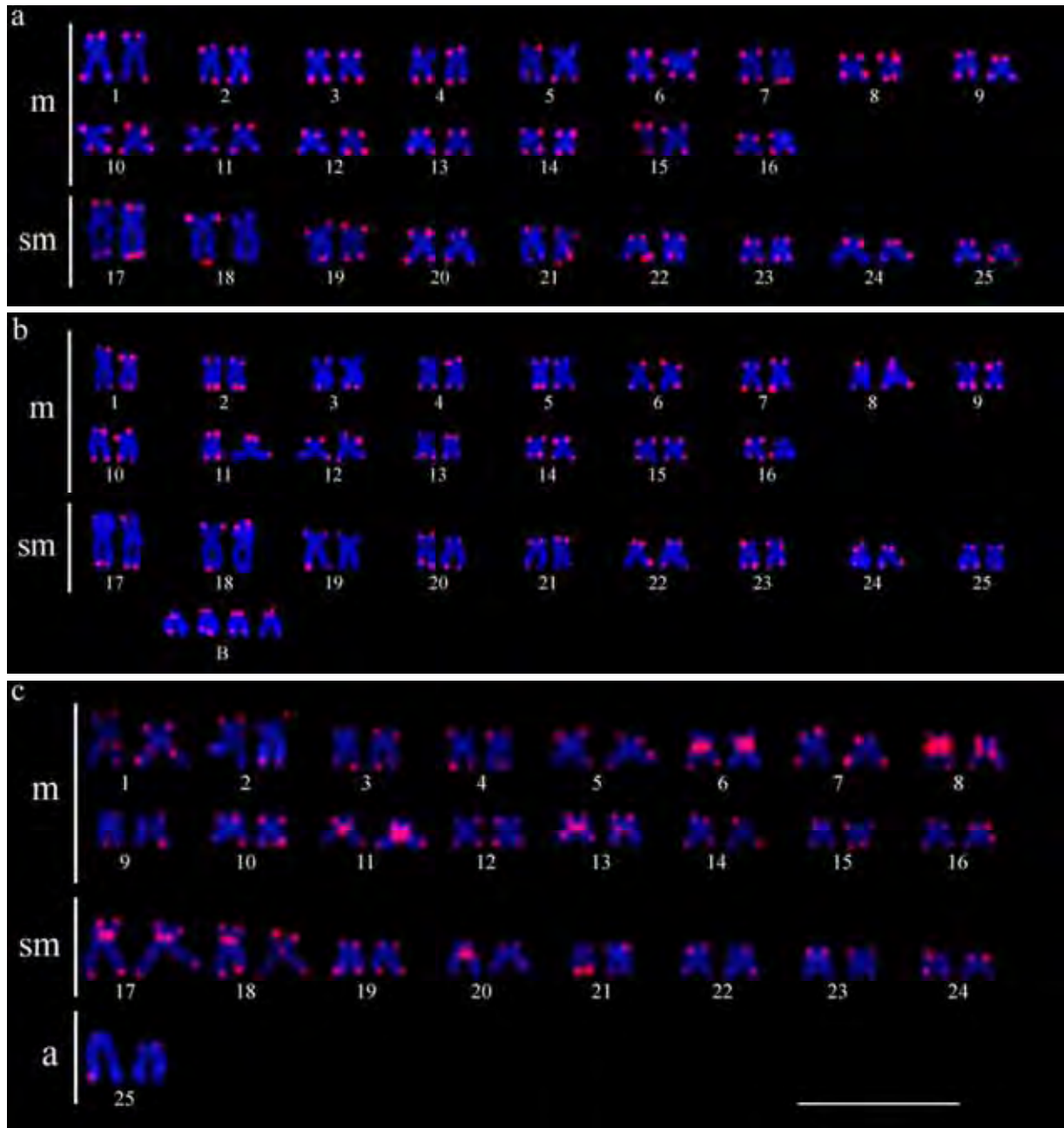


Figura 2. Cariótipos de *Characidium cf. zebra* (a), *Characidium cf. gomesi* (b) e *Characidium pterostictum* (c) ilustrando a localização dos sítios teloméricos e não-teloméricos após hibridação fluorescente *in situ* com a sonda telomérica (TTAGGG)<sub>n</sub>. Observe os vários sítios teloméricos intersticiais (ITS) nos cromossomos de *Characidium pterostictum* (c). A barra representa 10 μm.

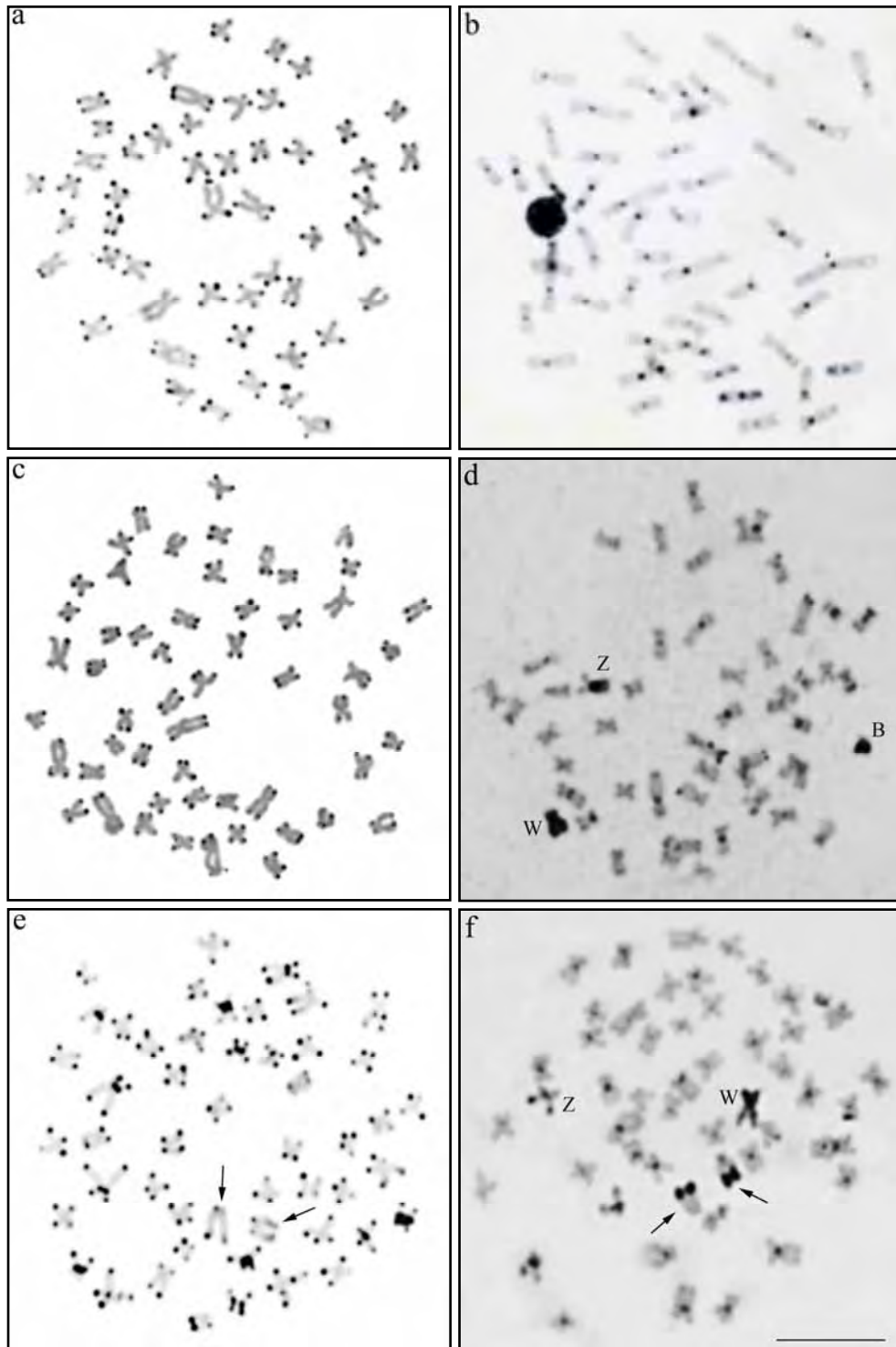


Figura 3: Hibridação fluorescente *in situ*, invertida para branco e preto (a, c, e), e bandamento C (b, d, f) para as três espécies de *Characidium* analisadas. *Characidium cf. zebra* (a e b), *Characidium cf. gomesi* (c e d) e *Characidium pterostictum* (e e f). Observe a presença de ITS e dos blocos de heterocromatina em alguns cromossomos de *C. pterostictum*, bem como a ausência de ITS em regiões heterocromáticas de *C. cf. zebra* e *C. cf. gomesi*. Em e e f, as setas indicam os cromossomos acrocêntricos. A barra equivale 10  $\mu$ m.

## **Capítulo 6**

**Análises evolutivas no gênero *Characidium* (Characiformes: Crenuchidae)  
evidências cromossômicas e de sequências de DNA**

## Resumo

O gênero *Characidium* é composto por cerca de 50 espécies reconhecidas como válidas e o estabelecimento das relações filogenéticas entre elas é de grande importância para a compreensão da biodiversidade existente neste grupo de peixes Neotropicais. No entanto, pouco se conhece sobre as relações evolutivas entre as espécies de *Characidium*, principalmente com base em análises genéticas. Do ponto de vista citogenético, o grupo é caracterizado por apresentar alta variabilidade em sua microestrutura cariotípica, tanto entre as espécies como entre as populações, embora o número diplóide  $2n=50$  cromossomos seja conservado para o gênero. Estas variações cromossômicas têm sido mais evidentes em relação à estrutura dos cromossomos sexuais e à distribuição e localização das sequências de DNAr 18S e 5S, com algumas espécies e populações apresentando alto grau de diferenciação cariotípica. Neste sentido, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de testar sob um enfoque evolutivo, se as evidências de relacionamentos cromossômicos entre as espécies de *Characidium* das bacias hidrográficas das regiões Sul e Sudeste do Brasil são coincidentes com as análises filogenéticas realizadas com base em sequências do DNA mitocondrial. Para a análise molecular, foi sequenciado o gene Citocromo oxidase I do DNAr de 9 espécies: *C. cf. zebra*, *C. cf. gomesi*, *C. pterostictum*, *C. schubarti*, *C. oiticicai*, *C. lauroi*, *C. lanei*, *Characidium* sp. e *Crenuchus* sp.. Para a análise cromossômica, a técnica de hibridação fluorescente *in situ* (FISH), usando simultaneamente sondas de DNAr 18S e 5S, foi aplicada em preparações de cromossomos metafásicos das espécies *C. oiticicai*, *C. schubarti*, *C. lanei*, *Characidium* sp. e *C. lauroi*, que ainda não tinham a localização cromossômica destes genes mapeada. O DNAr 5S foi observado em posição pericentromérica no par 21 dos exemplares das espécies *C. oiticicai*, *C. lauroi*, *C. lanei* e *Characidium* sp. e no par 24 de *C. schubarti*. Já o DNAr 18S foi observado em posição peritelomérica dos braços curtos do cromossomos Z e em posição peritelomérica dos braços longos do cromossomo W em todas as espécies, confirmando os dados comumente obtidos pela impregnação por nitrato de Prata. A ocorrência de DNAr 5S em segmentos intersticiais nos cromossomos de *Characidium* reforça a ideia de que esta localização cromossômica poderia representar alguma vantagem relacionada à organização destes genes no genoma. Já a diversificação do DNAr 18S, situado em compartimentos cromossômicos distintos do DNAr 5S, estaria intimamente relacionada ao processo de heterocromatinização dos cromossomos Z e W, desempenhando importante papel evolutivo, pois poderia influenciar no pareamento desses cromossomos e, conseqüentemente, contribuir para a manutenção das permutas cromossômicas ocorridas durante a prófase

meiótica. As análises filogenéticas evidenciaram a posição basal de *Characidium cf. zebra* e, com base na distância genética entre as espécies e populações estudadas, algumas relações evolutivas puderam ser discutidas, pois corroboram agrupamentos sugeridos por dados citogenéticos, como o padrão de distribuição do DNAr 18S e 5S nos cromossomos.

### **Introdução**

Na família Crenuchidae, a subfamília Characidiinae é formada por nove gêneros e constitui um grupo de peixes bastante interessante do ponto de vista cariotípico. O gênero *Characidium*, o mais especioso desta subfamília, é formado por cerca de 50 espécies reconhecidas como válidas e apresenta ampla distribuição na região Neotropical, ocorrendo do Panamá até a Argentina (Buckup, 2003). Este grupo é reconhecidamente de difícil identificação taxonômica e seus representantes apresentam tamanhos reduzidos, geralmente menores do que 10 cm de comprimento. A ampla distribuição das espécies de *Characidium* pela região Neotropical aparentemente têm influência direta nos processos evolutivos do grupo e em sua significativa diversidade, pois estes peixes podem ser encontrados em pequenos riachos de corredeiras, na calha de rios de médio e grande porte e nos riachos, lagos e lagoas de baixada. No entanto, apresentam acentuada preferência pelos riachos de cabeceira e por regiões com elevada altitude, geralmente formando populações locais e isoladas (revisão em Buckup, 2003).

A localização cromossômica de sequências de DNA e genes específicos tem representado uma importante ferramenta para a resolução de questões relacionadas à diversificação cariotípica em diferentes grupos de organismos. Em eucariotos superiores, um grupo de genes frequentemente utilizado em estudos evolutivos é o dos genes ribossomais, que estão organizados em duas famílias multigênicas distintas, a 45S (18S, 28S e 5,8S) e a 5S, ambas formadas por sequências de múltiplas cópias repetidas em *tandem* (Pendás *et al.*, 1994). Em peixes, o interesse pela análise e localização dos genes de DNAr 18S e 5S tem aumentado significativamente, contribuindo para a compreensão da estrutura, organização e evolução destas sequências repetidas no genoma deste grupo de vertebrados. No entanto, o número de trabalhos sobre a localização do gene 5S é mais restrito, principalmente quando comparado ao do gene 18S. Tal situação se caracteriza pelo fato dos sítios de DNAr 5S só poderem ser observados através da hibridação fluorescente *in situ*, ao passo que a localização dos segmentos de DNAr 18S podem ser comumente detectados por outras técnicas, como a coloração pelo nitrato de prata e CMA<sub>3</sub> (Pendás *et al.*, 1994, Ferro *et al.*, 2001).

Embora poucas espécies e populações de *Characidium* tenham passado por estudos citogenéticos, recentes análises envolvendo sondas dos genes ribossomais 18S e 5S em populações de *Characidium cf. gomesi* (Vicari *et al.*, 2008 e Capítulo 2), *Characidium lanei* (Noletto *et al.*, 2009), *Characidium pterostictum* (Capítulo 4) e *Characidium cf. zebra* (Capítulo 3), evidenciaram a distribuição destes sítios de DNAr em diferentes cromossomos do cariótipo e com acentuada variação interpopulacional, apontando para uma diversificação cariotípica dinâmica destas sequências neste grupo. Nestes estudos, o DNAr 18S foi localizado em compartimentos cromossômicos distintos do DNAr 5S e aparentemente está relacionado ao processo de heterocromatinização dos cromossomos Z e W.

Recentemente, vários grupos de pesquisa têm voltado sua atenção para o uso de sequências de DNA para elucidar problemas relativos à genética de populações e à sistemática. Entre os marcadores mais comumente utilizados em estudos filogenéticos estão os genes mitocondriais, principalmente o gene Citocromo Oxidase I (COI), cuja sequência parcial de aproximadamente 600pb é utilizada para a obtenção de um banco de dados de sequências de interesse taxonômico e de relacionamento filogenético, sendo denominado de DNA *barcoding* (Hebert *et al.*, 2003).

O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de mapear e comparar a localização do DNAr 18S e 5S em espécies de *Characidium* que ocorrem principalmente nos componentes das bacias hidrográficas da região Sul e Sudeste do Brasil, incluindo a análise filogenética destes exemplares a partir do sequenciamento do gene do DNAm Citocromo oxidase I. A integralização de abordagens cromossômicas, moleculares e filogenéticas foi utilizada na tentativa de elucidar questões da biologia evolutiva do gênero *Characidium*.

## **Material e Métodos**

### **Métodos Citogenéticos**

Foram analisadas cinco espécies de peixes do gênero *Characidium*: *C. oiticicai*, *C. lauroi*, *C. schubarti*, *C. lanei* e *Characidium* sp. provenientes de diferentes bacias hidrográficas da região Sul e Sudeste do Brasil, indicadas na Tabela 1. Nas preparações para obtenção de cromossomos mitóticos foram utilizados fragmentos de tecido renal e de brânquias, seguindo a técnica utilizada por Foresti *et al.* (1981). O mapeamento dos sítios de DNAr 18S e 5S nos cromossomos metafásicos foi realizado pela aplicação da técnica de hibridação fluorescente *in situ*, de acordo com o procedimento estabelecido por Pinkel *et al.* (1986) com modificações, usando a sonda de DNAr 18S obtida da espécie *Prochilodus*

*argenteus* (Hatanaka e Galetti Jr., 2004) e a sonda de DNAr 5S obtida da espécie *Leporinus elongatus* (Martins e Galetti Jr., 1999). A sonda 18S foi marcada com biotina 14-dATP por *nick translation*, seguindo as instruções do fabricante (Bionick Labelling System – Invitrogen). A detecção e amplificação do sinal de hibridização foram realizadas usando Avidina-fluoresceína conjugada (FITC) e anticorpo anti-avidina biotilado. A sonda 5S foi marcada com digoxigenina 11-dUTP (Roche Applied Science) por PCR (Polymerase Chain Reaction) e os sinais de hibridização foram detectados usando anti-digoxigenina rodamina. Os cromossomos metafásicos foram contracolorados com DAPI e analisados em fotomicroscópio óptico (Olympus BX61). As imagens metafásicas foram capturadas usando o programa Image Pro Plus, 6.0 software (MediaCybernetics).

A morfologia cromossômica foi determinada de acordo com a relação de braços estabelecida por Levan *et al.* (1964), sendo os cromossomos classificados como metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a) e arranjados no cariótipo em ordem decrescente de tamanho.

### **Métodos moleculares**

Foram analisadas amostras de nove espécies de peixes da subfamília Crenuchidae, sendo oito espécies do gênero *Characidium*: *C. cf. zebra*, *C. cf. gomesi*; *C. pterostictum*, *C. oiticicai*, *C. lauroi*, *C. schubarti*, *C. lanei* e *Characidium* sp., tratados como grupo interno e uma espécie de *Crenuchus*, utilizada como grupo externo, conforme indicado na Tabela 1.

Para extração do DNA foi utilizado o Kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega), conforme instruções do fabricante. Foram utilizados três indivíduos representativos de cada espécie analisada e optou-se pela utilização de sequências parciais do gene mitocondrial Citocromo Oxidase, subunidade 1 (CO I) amplificados por PCR, utilizando os *primers* Fish F1= 5' TCA ACC AAC CAC AAA GAC ATT GGC AC 3' e Fish R1= 5' TAG ACT TCT GGG TGG CCA AAG GAA TCA 3'.

A amplificação gênica foi realizada seguindo as concentrações e o programa relacionados na Tabela 2. Após a amplificação o produto de PCR foi purificado usando ExoSap-IT® (USB Corporation), seguindo as instruções do fabricante. O produto da PCR purificado foi usado para montar uma reação de sequenciamento com o kit Big Dye™ Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems), submetido ao programa presente no manual do kit. O produto desta reação foi purificado com a adição, por reação, de 0,7µl de acetato de sódio (3M), 0,7µl EDTA (125mM) e 17,5ml de etanol 100%. Essa mistura foi encubada por 15 minutos e seguidamente levada para uma centrifugação de

15 minutos a 13000 rpm à temperatura ambiente. O sobrenadante foi retirado e em seguida foram adicionados 24µl de etanol 70%. Essa nova mistura foi submetida a uma centrifugação de 10 minutos à temperatura ambiente e após essa centrifugação o sobrenadante foi novamente descartado. O restante do álcool presente no tubo foi evaporado sob temperatura de 90°C por 2 minutos. Após essas etapas as sequências foram obtidas em um sequenciador automático por capilaridade ABI3130. Com o término do sequenciamento, as sequências foram analisadas no programa ATGC (Genetix Inc.) para a obtenção da sequência *contig* do CO I. As sequências *contigs* de todas as amostras foram alinhadas pelo algoritmo MUSCLE disponível online no link “<http://www.ebi.ac.uk/Tools/muscle/index.html>”.

A análise de distância por UPGMA e as análises filogenéticas pelo método da Máxima Parcimônia foram realizadas no programa MEGA versão 4.0 (Tamura *et al.*, 2007), gerando uma única topologia mais parcimoniosa representada na Figura 3. Uma tabela de distância foi gerada a partir dos dados obtidos na análise de UPGMA para estimar a divergência média entre os táxons (Tabela 3).

## Resultados

Os dados relacionados ao número diplóide, à distribuição da heterocromatina constitutiva e à localização das RONS para as espécies *C. oiticicai*, *C. lauroi*, *C. schubarti*, *C. lanei* e *Characidium* sp. basearam-se nos resultados apresentados no Capítulo 1. Os dados relacionados à distribuição do DNAr 18S e 5S em *Characidium cf. gomesi*, *C. cf. zebra* e em *C. pterostictum* basearam-se no dados apresentados nos Capítulos 2, 3 e 4, respectivamente.

Com exceção de *C. cf. zebra*, todas as espécies analisadas apresentaram heteromorfismo cromossômico relacionado ao sexo, identificado pelo sistema ZZ/ZW de cromossomos sexuais (Capítulo 1). As espécies *C. oiticicai*, *C. lanei*, *C. lauroi* e *Characidium* sp. apresentaram a sequência para o DNAr 5S localizado intersticialmente nos cromossomos do par 21 (Figura 1), enquanto a espécie *Characidium schubarti* possui esse gene ribossômico localizado em posição intersticial no par 24 (Figura 2). Para todas as espécies, o gene de DNAr 18S foi observado em posição peritelomérica dos braços curtos dos cromossomos Z e em posição peritelomérica nos braços longos dos cromossomos W (Figuras 1 e 2). Os resultados obtidos estão sumarizados na Tabela 1.

A partir do alinhamento das sequências do gene COI foi gerada uma matriz com 606 caracteres, sendo 197 variáveis e destes, 118 foram informativos para a análise de parcimônia. A topologia resultante da análise de UPGMA e parcimônia por maioria mostraram-se



idênticas (Figura 3). A topologia final evidenciou a presença de dois clados monofiléticos para *Characidium*, tendo *Characidium cf. zebra* como basal para os dois clados. O teste de saturação da matriz foi elaborado a partir da razão de transversões e transições e demonstrou que os dados não se encontram saturados, apresentando um valor de r quadrado superior a 8,5.

## Discussão

### Análise cariotípica

Até recentemente eram escassos os trabalhos sobre a localização e organização dos sítios de DNAr 18S e 5S por hibridação fluorescente *in situ* entre as espécies de peixes do gênero *Characidium*. Neste gênero, as espécies analisadas até o momento apresentam número diplóide de  $2n=50$  cromossomos, geralmente dos tipos metacêntricos e submetacêntricos e, embora portador de tal conservadorismo com relação à macroestrutura cariotípica, desde os primeiros trabalhos que envolviam apenas técnicas básicas de citogenética já era possível observar uma significativa variação quanto à localização dos sítios de RONs, como em *Characidium cf. zebra* e *C. gomesi*, da bacia do rio Grande (Centofante *et al.*, 2001), *Characidium cf. alipioi* e *C. lauroi* da bacia do Paraíba do Sul (Centofante *et al.*, 2003) e *Characidium sp. aff. C. gomesi* da bacia do rio Paranapanema (Maistro *et al.*, 1998). Atualmente, com o aumento no número de espécies e populações analisadas, bem como devido à possibilidade de utilização de técnicas citogenéticas moleculares, ampliou-se o conhecimento e também a diversidade quanto à localização dos sítios de DNAr em representantes do gênero *Characidium* (Vicari *et al.*, 2008; Noletto *et al.*, 2009, Capítulos 2, 3 e 4).

No presente trabalho, as espécies analisadas apresentaram heteromorfismo cromossômico caracterizando a ocorrência do sistema ZZ-ZW de cromossomos sexuais e estes cromossomos apresentaram DNAr 18S associado, confirmando a existência de apenas um *locus* para essa família gênica nestas espécies. Tal situação permite sugerir a hipótese de que estes segmentos de DNAr poderiam fazer parte dos cromossomos ancestrais que originaram os cromossomos Z e W em algumas espécies deste gênero, conforme discutido nos Capítulos 1 e 2. No entanto, estes genes apresentaram-se em posição invertida nestes cromossomos, indicando que processos de modificação estrutural ocorridos durante a evolução e diversificação dos cromossomos sexuais possivelmente determinaram a reorganização destas sequências. Numa hipótese para explicar a dinâmica do processo de diferenciação a que estes cromossomos heteromórficos estão envolvidos, poderia se supor que

inicialmente este segmento de DNAr teria se reorganizado e se mantido, mesmo que de forma invertida, no par cromossômico original, agora chamado ZW. Um passo evolutivo seguinte poderia determinar a saída destes genes para outros cromossomos do lote autossômico, que se apresentariam meioticamente mais estáveis. Por outro lado, estes cístrons ribossomais poderiam se manter nos cromossomos sexuais e sua atividade gênica poderia atuar no sentido de facilitar a permuta genética entre os homólogos heteromórficos.

Em análises realizadas nos indivíduos de uma população de *Characidium cf. gomesi* da bacia do rio Tibagi, Vicari *et al.* (2008) verificaram a presença de múltiplos sítios de DNAr 18S. Por outro lado, em estudos realizados em populações de *C. cf. gomesi* da bacia do rio Tietê e Paranapanema (Capítulo 2) foi evidenciada a existência de associação entre os cromossomos sexuais ZZ-ZW e os sítios de DNAr 18S nos representantes da bacia do rio Tietê. Neste estudo, a análise sequencial banda-C/Ag-ROn foi determinante para identificar a estreita relação entre estes elementos genômicos. Desta forma, enquanto os indivíduos da população da bacia do Tietê apresentaram DNAr 18S associado aos braços longos dos cromossomos sexuais, os indivíduos das populações da bacia do rio Paranapanema e do Tibagi apresentaram este segmento genômico em um estado diferente, no qual, possivelmente por eventos de transposição, o DNAr 18S deixou os cromossomos sexuais e se transportou para outros pares cromossômicos autossômicos. Em *C. lanei* também foi evidenciada a existência de associação entre os cromossomos sexuais ZZ-ZW e os sítios de DNAr 18S, conforme descrito por Noletto *et al.* (2009). Em *Characidium cf. zebra*, espécie que não possui sistema ZZ-ZW de cromossomos sexuais (Capítulo 3), as regiões organizadoras de nucléolo estão localizadas intersticialmente nos braços longos do par 23.

No gênero *Characidium*, a aplicação da técnica de hibridação *in situ* com o gene ribossômico 5S em cromossomos metafásicos evidenciou uma interessante distribuição cariotípica para estas sequências. Vicari *et al.* (2008), em análises realizadas nos indivíduos de uma população de *Characidium cf. gomesi* da bacia do Tibagi, observaram o gene 5S em posição intersticial em um único par de cromossomos metacêntricos. Já na análise realizada em outras duas populações de *Characidium cf. gomesi* (Capítulo 2), foi observada a presença dessa família multigênica em posição intersticial no par submetacêntrico 25 em representantes da população da bacia do Paranapanema e em posição intersticial nos pares 20 e 25 em representantes da população da bacia do Tietê. No presente trabalho, as espécies *C. oiticicai*, *C. lauroi*, *C. lanei* e *Characidium sp.* apresentaram DNAr 5S apenas no par submetacêntrico 21 e a espécie *C. schubarti* no par submetacêntrico 24. Contudo, em *Characidium cf. zebra*, (Capítulo 3), o número de sítios portadores destes segmentos no cariótipo apresenta-se

bastante diversificado, sendo encontradas populações onde os indivíduos aparecem com apenas dois cromossomos portadores de sítios de DNAr 5S, enquanto em outras o número de cromossomos portadores de DNAr 5S pode chegar a dez.

O processo de diferenciação cariotípica destas espécies poderia ter sido decorrente de eventos vicariantes independentes, ocorridos em diferentes períodos, a partir de quando houve o isolamento e a formação das bacias hidrográficas brasileiras, culminando com a formação de grupos de espécies de *Characidium* com características citogenéticas próprias. Neste contexto pode ser analisada a existência de espécies com e sem sistema heteromórfico de cromossomos sexuais, a ocorrência de espécies com RONS invertidas ou não junto aos cromossomos Z e W, bem como a existência de espécies com diferentes cromossomos portadores de DNAr 5S.

Neste sentido, a localização e a distribuição do DNAr 18S e 5S nas espécies *C. oiticicai*, *C. lanei*, *Characidium* sp., *C. lauroi*, *C. schubarti* e *C. pterostictum* evidenciam que elas estão mais relacionadas entre si do que com *Characidium cf. zebra* e *Characidium cf. gomesi* (Vicari *et al.*, 2008; Capítulos 2 e 3). Centofante *et al.* (2003), propuseram que espécies de *Characidium* que apresentam sistema ZZ-ZW de cromossomos sexuais são mais relacionadas entre si do que espécies que não apresentam tal sistema. Esta hipótese é corroborada pelos dados cariotípicos apresentados no presente trabalho, pois *C. oiticicai*, *C. lauroi*, *C. lanei*, *C. pterostictum*, *Characidium* sp. e *C. schubarti* apresentam um mesmo sistema ZZ-ZW e também um padrão muito similar de distribuição dos genes ribossômicos 18S e 5S. No entanto, uma diferente interpretação pode ser dada para a espécie *Characidium cf. gomesi* (Maistro *et al.*, 2004; Vicari *et al.*, 2008; Capítulo 2) que, apesar de apresentar heteromorfismo cromossômico sexual, com sistema do tipo ZZ-ZW, as populações estudadas apresentam-se em um estágio diferenciado de diversificação. Tal situação é evidenciada pelas diferenças estruturais apresentadas pelos cromossomos Z e W e pela ausência de sítios organizadores nucleolares nestes componentes, uma vez que os genes ribossômicos encontram-se distribuídos em diferentes cromossomos do cariótipo nesta espécie (Vicari *et al.*, 2008, Capítulo 2).

### **Análise filogenética**

De acordo com as análises filogenéticas realizadas (Figura 3), as espécies *C. pterostictum*, *C. oiticicai*, *C. lauroi*, *C. lanei*, *Characidium* sp. e *C. schubarti* estão mais relacionadas entre si do que com *C. cf. gomesi* e *C. cf. zebra*. Com exceção de *C. schubarti*, todas estas espécies ocorrem em riachos litorâneos do Sul e Sudeste do Brasil, enquanto que

*C. cf. zebra* e *C. cf. gomesi* pertencem à bacia do alto rio Paraná. No entanto, os registros de eventos de captura de cabeceiras entre as drenagens do Ribeira e do Paranapanema podem explicar a atual distribuição de *Characidium schubarti* (Ribeiro, 2006). As espécies litorâneas apresentam taxa de divergência média relativamente pequena entre as sequências do gene COI dentro do gênero *Characidium*, cerca de 6%, mas apresentam uma taxa de divergência de 15% para *C. cf. gomesi* e 18% para *C. cf. zebra*. Os resultados obtidos também apontam que *C. cf. zebra* da bacia do Tietê caracteriza-se como a primeira espécie a se divergir dentro do gênero *Characidium*, corroborando dados anteriormente obtidos por filogenias morfológicas (Buckup, 1993). Já para *Characidium cf. gomesi*, embora exista uma acentuada variação entre os cariótipos das populações do rio Tietê e do rio Paranapanema (Capítulo 2), estas possuem uma divergência média muito baixa (Figura 3).

Os resultados preliminares de alguns projetos de pesquisa em desenvolvimento no Laboratório de Biologia e Genética de Peixes da UNESP de Botucatu apontam que a taxa de evolução do gene mitocondrial COI é de aproximadamente 1,4% por milhão de anos em Teleostei e que essa taxa evolutiva é muito similar à taxa de divergência apresentada pelo gene mitocondrial Citocromo B (Perdices *et al.*, 2002). Utilizando esta taxa de divergência (1,4% por Ma), foi estimada uma datação para os diferentes eventos citogenéticos ocorridos neste grupo de espécies, como a formação do sistema sexual ZZ-ZW e a diversificação dos genes ribossomais ocorrida na história evolutiva do gênero *Characidium* (Tabela 4). Além disso, a plotagem dos dados citogenéticos em uma topologia possibilitou a estimativa da faixa de tempo em que alguns caracteres citogenéticos possivelmente se diversificaram.

Os dados citogenéticos e moleculares apontam que *C. cf. zebra* é a espécie mais divergente entre todas as analisadas, sendo a única a não apresentar sistema sexual e a única que possui o primeiro par de metacêntricos como o maior par do cariótipo. De acordo com as análises realizadas, a origem do sistema sexual ZZ-ZW (chamado caráter A<sub>1</sub>) deve ter ocorrido no gênero *Characidium* possivelmente entre 5,2 e 6,4 milhões de anos (Figura 3 e Tabela 4). Em outra hipótese, este sistema poderia ter sido perdido em *Characidium cf. zebra*, num tempo inferior a 6,4 milhões de anos. Já a ausência do primeiro par cromossômico metacêntrico como sendo o maior do conjunto cromossômico (caráter G<sub>1</sub>), poderia constituir uma sinapomorfia de algumas espécies de *Characidium*, exceto para *C. cf. zebra* (ocorrida entre 5,2 e 6,4 milhões de anos) ou uma autapomorfia de *Characidium cf. zebra* (ocorrida há um tempo inferior a 6,4 milhões de anos). A adoção de uma destas hipóteses exige, contudo, uma análise citogenética mais ampla da subfamília Characidiinae.

As variações observadas nos cromossomos sexuais, como a presença de DNAr 18S (caráter D<sub>1</sub>) em posição invertida em espécies litorâneas, bem como a presença de DNAr 5S no par 21 (caráter E<sub>2</sub>), possivelmente ocorreram entre 5,2 e 2,5 milhões de anos. Já o DNAr 5S no par 24 de *Characidium schubarti* (caráter E<sub>3</sub>), possivelmente se estabeleceu a menos de 1,7 milhão de anos (Figura 3 e Tabela 4).

O número diplóide de  $2n=50$  cromossomos e o cariótipo contendo apenas cromossomos metacêntricos e submetacêntricos apresentam-se como características bastante conservadoras em *Characidium* (Capítulo 1). Entretanto, em populações de *C. pterostictum* é observado um par exclusivo de cromossomos acrocêntricos (caráter F<sub>1</sub>) (Capítulos 1 e 4). Esta espécie apresenta-se como uma das mais derivadas dentre as analisadas e esta característica possivelmente surgiu num período de tempo inferior a 1,7 milhões de anos, após a diferenciação desta espécie, caracterizando-se como um caráter autapomórfico derivado (Figura 3 e Tabela 4).

Outro caráter derivado seria a perda da marcação da região do 18S associada aos cromossomos do sistema sexual ZZ-ZW (caráter B<sub>1</sub>), que ocorreu em apenas uma população de *Characidium cf. gomesi* do rio Paranapanema. A translocação dessa região cromossômica possivelmente ocorreu após o surgimento dessa população isolada, que ocorreu há aproximadamente 250.000 anos. Nessa população de *Characidium cf. gomesi* também foram observados cromossomos B. Esse tipo de elemento genômico também foi encontrado em uma população de *C. pterostictum* e em *C. oiticicai*. A reconstrução filogenética formulada sugere que a origem dos cromossomos B (caráter C<sub>1</sub>) tenha ocorrido, de modo independente, ao menos três vezes na história evolutiva do grupo, sendo uma na população de *Characidium cf. gomesi* do rio Tietê a menos de 250000 anos, outra em uma população de *C. pterostictum* também a menos 250000 anos e, em um terceiro evento, a menos de um milhão de anos, estes elementos genômicos extras surgiram em *C. oiticicai* (Figura 3 e Tabela 4).

O *status* de espécie de *Characidium* sp. analisada neste estudo poderia ser questionado. Entretanto, a distância genética estabelecida para *Characidium lanei*, espécie mais próxima filogeneticamente, ultrapassa 5% de divergência. Por outro lado, *Characidium lauroi* e *C. oiticicai*, apesar de serem consideradas espécies válidas (Buckup, 2003), apresentaram aproximadamente 2,6% de divergência média. Em trabalhos com o gene Citocromo Oxidase I realizados por Hebert *et al.* (2003), a taxa média de divergência encontrada entre espécies diferentes é superior a 2,5%. Estes fatos somados sugerem que *Characidium* sp. poderia se caracterizar como uma espécie diferente das demais espécies analisadas de *Characidium* e que se encontraria intimamente relacionada a *C. lanei*.

Com exceção de *Characidium cf. zebra*, as características cromossômicas mais discordantes para os representantes deste gênero foram observadas em nível populacional. As duas populações de *C. cf. gomesi* analisadas, apesar de filogeneticamente e geograficamente muito próximas, apresentam significativas variações cariotípicas. Neste sentido, considera-se que as diferenças estruturais apresentadas pelos cromossomos Z e W, pela variação na localização cromossômica dos genes para DNAr e pela presença de cromossomos B em uma destas populações estejam diretamente relacionados a eventos cromossômicos que modificaram estruturalmente a constituição cariotípica nos representantes destas populações, mas sem aparentemente alterar a constituição gênica, como ocorrido em *Chromaphyosemion bivittatum* (Volker *et al.*, 2007). Por outro lado, a distribuição destes indivíduos em riachos de cabeceira da bacia do alto rio Paraná, formando agrupamentos locais com baixa vagilidade, teria possivelmente facilitado o processo de fixação destes rearranjos cromossômicos (Capítulo 2).

Embora compartilhando uma condição macroestrutural cromossômica conservadora, a constituição cariotípica particular encontrada em cada uma dessas espécies e populações de *Characidium* poderia ainda estar relacionada à condição peculiar de origem e formação do sistema hidrográfico costeiro do Sul e Sudeste do Brasil. Os principais rios da região sudeste estão atualmente separados por barreiras que impedem a dispersão de espécies e populações, favorecendo assim a ocorrência de eventos vicariantes nas populações isoladas (Weitzman *et al.*, 1988). A condição de alopatria de várias populações de peixes de rios dessas bacias pode ser constatada através de vários estudos, como os diferentes padrões de distribuição biogeográfica de espécies de *Mimagoniates* (Menezes e Weitzman, 1990), *Deuterodon* (Lucena e Lucena, 1992) e *Epactionotus* (Reis e Schaefer, 1998) ou através de estudos citogenéticos, como em espécies de *Corydoras* (Oliveira *et al.*, 1993). No entanto, essa região é caracterizada por apresentar uma formação geológica rica em falhas, que possibilita a ocorrência de eventos de neotectônica de placas. Estes eventos, por sua vez, poderiam determinar que algumas cabeceiras de riachos mudassem o sentido de suas drenagens para uma bacia ou sub-bacia adjacente (Ribeiro, 2006). Como muitas espécies de *Characidium* são encontradas nestas regiões de cabeceira (Capítulo 1), é possível que nestes eventos de captura, algumas populações sejam lançadas para drenagens diferentes, como observado em espécies do gênero *Oligosarcus* (Ribeiro, 2007), estabelecendo assim um evento vicariante que possibilitaria a segregação e o acúmulo de divergências genéticas e cariotípicas entre as espécies e populações.

Os resultados combinados destas análises em *Characidium* demonstram que alguns caracteres citogenéticos possuem certa constância. Porém, em determinadas populações, essa uniformidade não é observada, apontando que características cromossômicas dentro do gênero possam evoluir em *saltos* e que a relação tempo de divergência e variedade cariotípica poderiam não se equivaler. Embora os dados citogenéticos e moleculares apresentados pareçam consistentes para explicar a ocorrência de alguns padrões citogenéticos existentes, como a origem dos cromossomos sexuais, somente a análise de um maior número de espécies e populações, com ampla distribuição pelas principais bacias brasileiras, bem como a utilização e análise de outras sequências gênicas, já em andamento, poderão determinar a real condição de origem e evolução para os principais marcadores genéticos em espécies de *Characidium*.

Os dados e análises apresentados no presente trabalho reforçam a importância da utilização conjunta de análises filogenéticas e citogenéticas para se determinar uma possível história evolutiva para um grupo de peixes, abrindo assim caminho para novas análises em outros grupos, principalmente os de grande distribuição geográfica como *Characidium*.

### **Referências Bibliográficas**

As referências correspondentes a este capítulo encontram-se no final desta tese.

Tabela 1: Número diplóide, fórmula cariotípica e número de sítios de DNAr 18S e 5S em espécies de *Characidium*. Em destaque, as espécies e populações utilizadas neste estudo. T= Posição terminal; I= Posição intersticial.

Espécies	2n	Localidade	Pares			Ref.
			Ag-RONs	Sítios 18S	Sítios 5S	
<i>C. lanei</i>	50	Morretes	2 (T)	2 (T)	2 (I)	1
<i>C. lauroi</i>	50	Ubatuba	2 (T)	2 (T)	2 (I)	1
<i>C. oiticicaí</i>	50	Salesópolis	2 (T)	2 (T)	2 (I)	1
<i>C. schubarti</i>	50	Jaguariaíva	2 (T)	2 (T)	2 (I)	1
<i>Characidium</i> sp.	50	Itanhaém	2 (T)	2(T)	2(I)	1
<i>Characidium</i> cf. <i>gomesi</i>	50	Botucatu	2 (T)	3 (T)	4 (I)	3
<i>Characidium</i> cf. <i>gomesi</i>	50	Botucatu	3 (T)	3 (T)	2 (I)	3
<i>Characidium pterostictum</i>	50	Apiáí	2 (T)	2 (T)	2 (I)	4
<i>Characidium pterostictum</i>	50	Paranaguá	2 (T)	2 (T)	2 (I)	4
<i>Characidium</i> cf. <i>zebra</i>	50	Salesópolis	23(T)	2 (T)	5 (I)	2
<i>Characidium</i> cf. <i>zebra</i>	50	Botucatu	23 (I)	2 (I)	2 (I)	2
<i>Characidium</i> cf. <i>zebra</i>	50	Botucatu	23 (I)	2 (I)	2 (I)	2
<i>Characidium</i> cf. <i>zebra</i>	50	Avaré	23 (I)	2 (I)	2 (I)	2
<i>Characidium</i> cf. <i>zebra</i>	50	Tangará da Serra	23 (I)	2 (I)	10 (I)	2
<i>Characidium</i> cf. <i>gomesi</i>	50	Ponta Grossa	7 (T)	10 (T)	2 (I)	6
<i>C. lanei</i>	50	Morretes	2 (T)	2 (T)	2 (I)	7

Referências da tabela: 1. Presente estudo; 2. Capítulo 3; 3. Capítulo 2; 4. Capítulo 4; 5. Capítulo 7; 6. Vicari *et al.* (2008); 7. Noleto *et al.* (2009).

Tabela 2. Reagentes e programa utilizados para amplificação gênica do DNAmT Citocromo oxidase 1 (COI).

Reagentes por amostra			Programa		
Reagente	Quantidades(µl)	Passo	Processo	Temperatura	Tempo
		1	Desnaturação	94° C	3'
Go taq	6,25	2	Desnaturação	94°C	30''
H <sub>2</sub> O <sub>MQ</sub>	4,65	3	Anelamento	48-56°C	1'
Fish F1	0,3	4	Extensão	68°C	2'
Fish R1	0,3	5	Volta para o	-	35X
DNA genômico	1	6	Extensão	72°C	5'



Tabela 3. Distância (par-a-par) genética entre espécies e populações de Characidiinae, computadas pelo método de UPGMA.

Táxons	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1										
2	0.2551									
3	0.2231	0.1827								
4	0.2183	0.1781	0.0052							
5	0.2536	0.1735	0.1385	0.1428						
6	0.2748	0.1761	0.1496	0.1493	0.0508					
7	0.2583	0.1740	0.1516	0.1514	0.0842	0.0683				
8	0.2607	0.1803	0.1560	0.1557	0.0841	0.0682	0.0266			
9	0.2431	0.1782	0.1430	0.1428	0.0761	0.0742	0.0664	0.0624		
10	0.2481	0.1785	0.1383	0.1425	0.0643	0.0664	0.0587	0.0547	0.0510	
11	0.2403	0.8333	0.1405	0.1448	0.0683	0.0664	0.0548	0.0509	0.0452	0.0070

1. *Crenuchus* sp.; 2. *Characidium* cf. *zebra*; 3. *Characidium* cf. *gomesi* (Paranapanema); 4. *Characidium* cf. *gomesi* (Tietê); 5. *Characidium* *lanei*; 6. *Characidium* sp.; 7. *Characidium* *oiticicaí*; 8. *Characidium* *lauroi*; 9. *Characidium* *schubarti*; 10. *Characidium* *pterostictum* (Apiaí); 11. *Characidium* *pterostictum* (Paranaguá).

Tabela 4. Caracteres citogenéticos e sua possível origem em espécies de peixes do gênero *Characidium*.

Estado do caráter	Faixa de tempo para possível surgimento	Tempo máximo de um possível surgimento	Período Geológico
<b>A1. Presença de cromossomos sexuais</b>	5,2-6,4 M anos	6,4 milhões de anos	Mioceno
<b>B1. Cromossomos sexuais sem DNAr 18S</b>		250000 anos	Pleistoceno
<b>C1. Presença de cromossomos B</b>			
Cromossomo B de <i>C. pterostictum</i>		250000 anos	Pleistoceno
Cromossomo B de <i>C. cf. gomesi</i>		1 milhão de anos	Pleistoceno
Cromossomo B de <i>C. oiticicaí</i>		250000 anos	Pleistoceno
<b>D1. Cromossomos sexuais com RONS invertidas</b>	2,5-5,2 M anos		Plioceno
<b>E1. DNAr 5S localizado no par 25</b>		5,2 milhões de anos	Plioceno
<b>E2. DNAr 5S localizado no par 21</b>	2,5-5,2 M anos		Plioceno
<b>E3. DNAr 5S localizado no par 24</b>		1,7 milhões de anos	Plioceno
<b>F1. Presença de cromossomos Acrocêntricos</b>		1,7 milhões de anos	Plioceno
<b>G1. Primeiro par metacêntrico como não sendo o maior do cariótipo</b>	5,2-6,4 M anos	6,4 milhões de anos	Mioceno

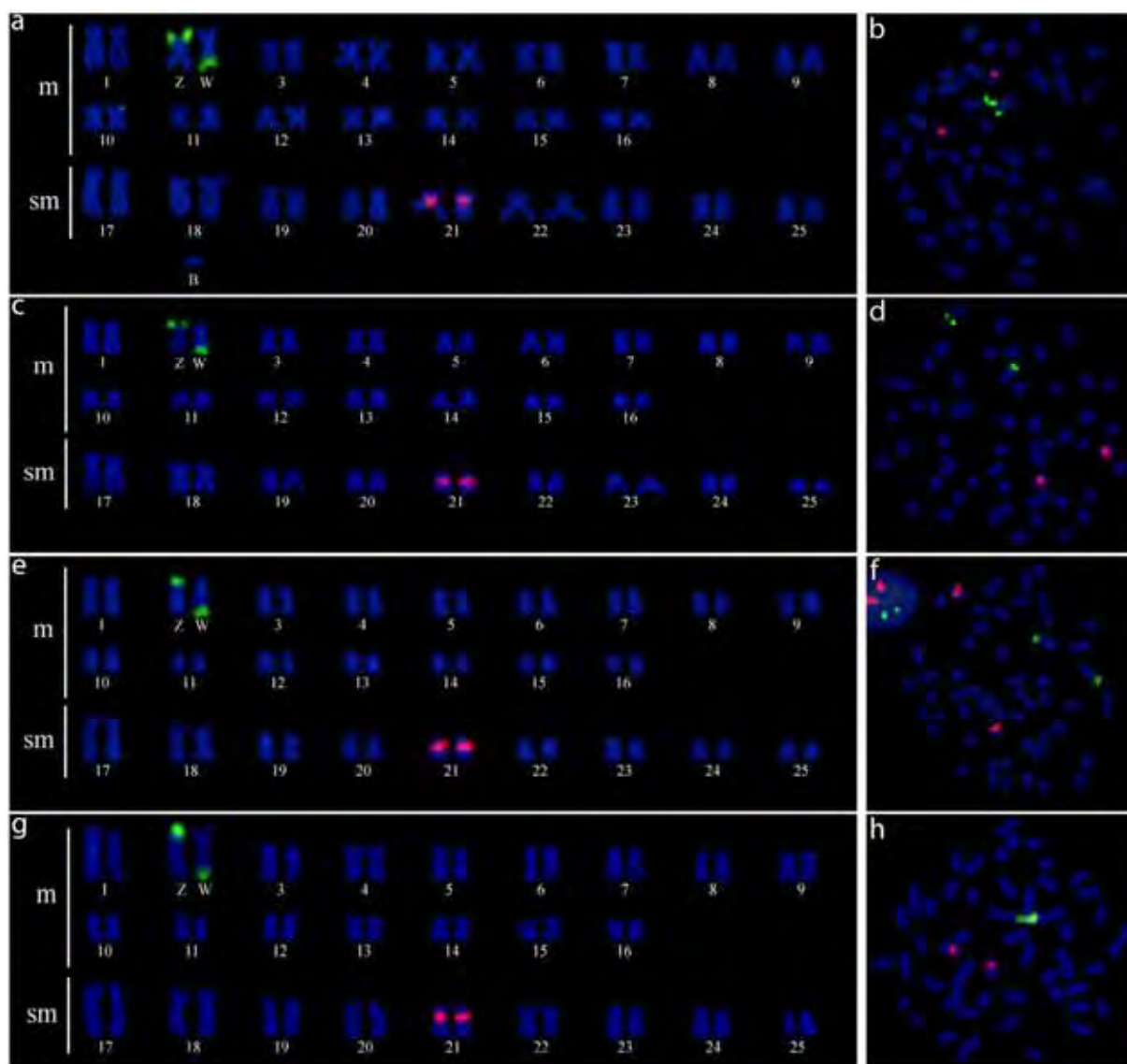


Figura 1. Cariótipos e metáfases de exemplares das espécies de *Characidium* mostrando os sítios de DNAr 18S corados com avidina FITC e presentes nos cromossomos Z e W e os sítios de DNAr 5S, corados com anti digoxigenina rodamina nos cromossomos do par 21. Em a e b, *Characidium oiticicai*, em c e d, *Characidium lanei*, em e e f, *Characidium lauroi* e em g e h, *Characidium* sp..



Figura 2. Em a, cariótipo e em b, metáfase de *Characidium schubarti* mostrando os sítios de DNAr 18S corados com avidina FITC e presentes nos cromossomos Z e W e os sítios de DNAr 5S, corados com anti digoxigenina rodamina nos cromossomos do par 24.

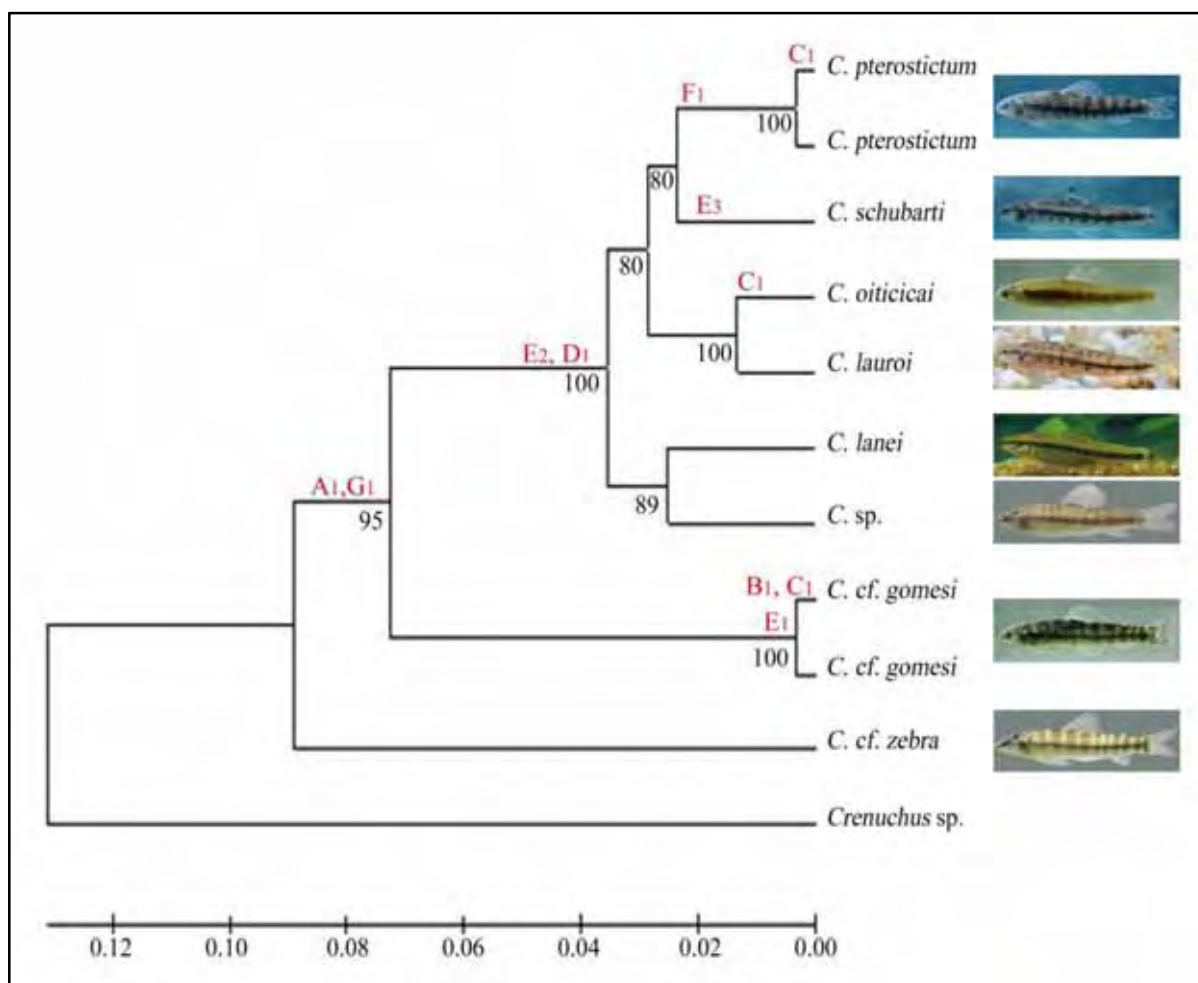


Figura 3: Árvore construída pelo método de UPGMA, com base em uma matriz de sequências do gene COI, testada a partir de 1000 réplicas de bootstrap (valores abaixo dos ramos). Os valores na régua representam a porcentagem de divergência entre os táxons da topologia. As letras em cores acima de alguns ramos representam variações de caracteres citogenéticos, conforme: **Caráter A** – Presença/ausência de cromossomos sexuais: Estado 0. Ausência de sexual - Estado 1. Presença de sexual. **Caráter B** – Cromossomos sexuais com ou sem DNAr 18S: Estado 0. ZW com RON - Estado 1. ZW sem RON. **Caráter C** – Presença/ausência de cromossomos B: Estado 0. Ausência de B - Estado1. Presença de B. **Caráter D** – Cromossomos sexuais com RONS invertidas/sem RONS invertidas: Estado 0. ZW sem RON invertida – Estado 1. ZW com RONS invertida. **Caráter E** – DNAr 5S: Estado 0. 5S localizado no par 17 - Estado1. 5S localizado no par 25 - Estado 2. 5S localizado no par 21 - Estado 3. 5S localizado no par 24. **Caráter F** – Morfologia dos cromossomos: Estado 0. Apenas cromossomos M e SM - Estado1. Presença de Cromossomos com ST e A. **Caráter G** – Tamanho dos cromossomos: Estado 0. Par 1 como maior da cariótipo - Estado1. Par 17 como maior do cariótipo.

**Capítulo 7**

**Mapeamento cromossômico e inferências evolutivas sobre a distribuição dos genes para histona H<sub>1</sub> e DNAr 18S e 5S em quatro populações alopátricas de *Characidium cf. gomesi* (Characiformes, Crenuchidae)**

**Resumo**

Estudos cromossômicos foram realizados em quatro populações de *Characidium cf. gomesi* de diferentes bacias hidrográficas brasileiras (rio Tietê, rio Paranapanema, rio Grande e rio Paraguai) usando diferentes técnicas de coloração (Giemsa, Ag-RON e bandamento C), bem como hibridação fluorescente *in situ* (FISH) para localização dos genes de DNAr 18S e 5S e para a histona H<sub>1</sub> nos cromossomos desta espécie. Experimentos com FISH foram também realizados com uma sonda produzida a partir do cromossomo W de *Characidium cf. gomesi*, obtida por microdissecção cromossômica e DOP-PCR, denominada CgW. Todas as populações apresentaram cariótipo com número diplóide igual a 50 cromossomos, composto de 31 cromossomos metacêntricos e 19 submetacêntricos para as fêmeas e 32 cromossomos metacêntricos e 18 submetacêntricos para os machos, além de um sistema ZZ-ZW de cromossomos sexuais, representado pelo par heteromórfico número 2. Em todas as populações, a heterocromatina constitutiva foi observada principalmente em toda extensão do W e em grandes blocos intersticialmente localizados nos braços longos do Z. Já as RONS, evidenciadas pelo nitrato de Prata, pela CMA<sub>3</sub> e pela sonda de DNAr 18S, apresentaram variações quanto à sua localização e distribuição entre estas populações, assim como o DNAr 5S. Blocos AT positivos foram observados em posição pericentromérica de alguns cromossomos autossômicos, em posição intersticial do Z e em toda extensão do W. Nas populações dos rios Paranapanema e Grande, o gene para a histona H<sub>1</sub> foi localizado em posição intersticial dos cromossomos dos pares 6 e 22, estando, contudo em posição intersticial no par 22 e em posição terminal do braço curto do par 6, nos indivíduos da população do Rio Tietê. Na população do Rio Paraguai, esse gene foi observado apenas em posição terminal do braço curto do par 6. A sonda CgW marcou totalmente o cromossomo W e o bloco heterocromático do cromossomo Z de todas as populações analisadas, bem como toda extensão dos cromossomos B da população do Rio Paranapanema. Os resultados apresentados permitiram caracterizar excelentes marcadores citogenéticos para esse grupo de *Characidium* e podem contribuir com informações interessantes para uma melhor compreensão dos processos de diferenciação cromossômica envolvidos na diversificação cariotípica encontrada no genoma dos peixes.

## Introdução

O DNA repetitivo compreende segmentos de DNA de diferentes tamanhos que se repetem de dezenas a milhões de vezes no genoma e compõem uma grande parcela do genoma dos eucariotos (Taft *et al.*, 2007), incluindo sequências que se repetem em *tandem*, em *clusters* ou que se apresentam dispersas. As famílias de genes cujas sequências se repetem em *tandem* incluem os DNA microssatélite, minisatélite e o DNA satélite (Charlesworth *et al.*, 1994) e algumas famílias multigênicas, como as das histonas e os RNAs ribossomais (Maxson *et al.*, 1983; Hadjiolov, 1985). Os genes dispostos em *clusters* caracterizam-se por um conjunto de dois ou mais genes relacionados que se encontram fisicamente próximos, mas sem uma ordem definida. Em muitas espécies, os genes para os cinco tipos de histona podem ser encontrados juntos, formando *clusters*, mas organizados ao acaso (Graham, 1995). Já as famílias de genes dispersos são representadas pelos transposons e retrotransposons (Charlesworth *et al.*, 1994).

A heterocromatina constitutiva identificada citologicamente é, na maioria das vezes, composta por DNA satélite (Sumner, 1990). Essa porção do genoma tem sido isolada, clonada e marcada com compostos fluorescentes e posteriormente hibridada com cromossomos metafásicos (Reed e Phillips, 1995; Oliveira e Wright, 1998) e este tipo de abordagem pode permitir, em estudos genômicos, determinar a origem, distribuição e evolução das sequências repetitivas no cariótipo estudado (Phillips e Reed, 1996). Sondas de elementos de DNA repetitivo, como DNA satélite, DNAr e, em menor escala, histonas, têm sido usadas extensivamente para acompanhar a diversidade cariotípica em diferentes organismos eucariotos. Além da identificação e isolamento dos DNA satélites, sua localização cromossômica torna-se também interessante na medida em que identifica fisicamente certas regiões dos cromossomos, sugerindo um papel funcional e estrutural para essas regiões (Singer, 1982; Oliveira e Wright, 1998). Nos últimos anos, a metodologia de construção de sondas por microdissecção para pintura cromossômica, desenvolvida a partir da década de 1990 (Kao, 1990; Meltzer *et al.*, 1992), tem sido amplamente utilizada em estudos evolutivos em vários grupos animais, assim como em citogenética humana. Entretanto, essa metodologia só recentemente começou a ser direcionada para estudos cromossômicos em peixes Neotropicais (Diniz *et al.*, 2008; Henning *et al.*, 2008).

Nos peixes do gênero *Characidium*, análises citogenéticas convencionais realizadas em populações de *Characidium cf. gomesi* têm demonstrado a existência de um sistema de cromossomos sexuais em um instigante estágio de diferenciação, possivelmente devido ao

processo de heterocromatinização e a ocorrência de alterações cromossômicas estruturais, tanto no cromossomo Z como no W (Centofante *et al.*, 2001; Maistro *et al.*, 1998; Vicari *et al.*, 2008; Capítulo 2). Por outro lado, a ocorrência de cromossomos B e a variação nos sítios de DNAr 18S e 5S em populações de diferentes bacias hidrográficas indicam ainda que outros eventos cariotípicos de diferenciação estejam determinando processos de diversificação nesta espécie de peixe (Vicari *et al.*, 2008; Capítulo 2). Neste sentido, o presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de testar a homologia do sistema ZZ-ZW de cromossomos sexuais evidenciado em quatro populações de *Characidium cf. gomesi*, através de uma sonda produzida por microdissecção do cromossomo heterocromático W de indivíduo de uma destas populações, bem como construir um mapa físico que identifique a localização e a distribuição das sequências de DNAr 18S e 5S e também da família histônica H<sub>1</sub>, contribuindo com novas informações sobre a organização do genoma desta espécie de *Characidium*.

### Material e métodos

Foram analisados indivíduos pertencentes a quatro populações de *Characidium cf. gomesi*, provenientes de diferentes bacias hidrográficas do Brasil, indicadas na Tabela 1. As preparações de cromossomos mitóticos foram obtidas de tecido renal e brânquias utilizando-se a técnica referida em Foresti *et al.* (1981). A marcação das RONS pelo nitrato de Prata seguiu a técnica proposta por Howell e Black (1980) e o bandamento C foi realizado seguindo o protocolo descrito por Sumner (1972). As regiões cromossômicas ricas em GC foram identificadas pela utilização do fluorocromo Cromomicina A<sub>3</sub> (Schweizer, 1976) e as regiões ricas em AT pelo fluorocromo DAPI (Schweizer *et al.*, 1978).

Para a microdissecção dos cromossomos, suspensões de células obtidas de espécimes de *Characidium cf. gomesi* do ribeirão Alambari, SP, contendo boa quantidade de metáfases, foram gotejadas em lamínulas e coradas com Giemsa 5% por 5 minutos. O cromossomo W, facilmente identificado por sua morfologia e por apresentar uma nítida constrição secundária (Figura 1), foi microdissecado utilizando-se um microscópio invertido (Axiovert 100 - Zeiss) com micromanipulador acoplado portador de microagulha de vidro (5171-Eppendorf). Seis cromossomos W foram microdissecados e transferidos para um tubo de microcentrífuga contendo 9µL de mistura DOP-PCR (*Degenerate Oligonucleotide Primer*) (1µL de Thermostase tampão 1X, 1µL de dNTPs a 2mM, 2µL de *primer* DOP - 5' CCGACTCGAGNNNNNNATGTGG 3' (Telenius *et al.*, 1992) a 10µM e 5µL de água). O tubo de microcentrífuga foi aquecido a 90°C por 10 minutos para desnaturar proteínas

cromossômicas e em seguida foi adicionado 1µL de Thermostase (USB). As reações de PCR (Polymerase Chain Reaction) foram realizadas usando um termociclador PTC-100TM (MJ Research, Inc). A amplificação inicial de produtos microdissecados (RAMP-PCR) foi realizada sob as seguintes condições: 94°C por 3 minutos, 12 ciclos a 94°C por 1 minuto e 30 segundos; 37°C por 2 minutos, aumentando 0,2°C por segundo até 72°C e 72°C por 2 minutos, seguido de outros 30 ciclos de 94°C por 1 minuto e 30 segundos; 56°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e 30 segundos. Após a primeira reação de PCR, uma segunda reação padrão foi realizada para gerar um estoque de sonda. Nesta reação foram utilizados 2,5µL de Taqpolimerase tampão (10X), 2µL de MgCl (25mM), 2,5µL de dNTPs (2mM), 5µL de primer DOP (10µM), 0,25µL de Taqpolimerase (5U/µL), 2µL de DNA (produto da primeira reação de PCR) e 10,75µL de água para um volume final de 25µL. Os parâmetros para a reação foram: 90°C por 3 minutos, 30 ciclos a 90°C por 1 minuto e 30 segundos; 56°C por 1 minuto e 30 segundos e 72°C por 1 minuto e 30 segundos. Por último, uma terceira reação de PCR foi realizada para marcar os produtos microdissecados e amplificados. A reação de PCR foi composta por 5µL Taqpolimerase tampão (10X), 2µL de MgCl (25mM), 1,25µL de dATP (2mM), 1,25µL de dCTP (2mM), 1,25µL de dGTP (2mM), 0,8µL de dTTP (2mM), 0,7µL de digoxigenina-11-dUTP (1mM) (Roche Applied Science), 5µL de primer DOP (10µM), 0,5µL de Taqpolimerase (5U/µL), 3µL de DNA (produto da segunda reação de PCR) e 29,13µL de água para um volume final de 50µL. As etapas de amplificação foram as mesmas descritas para a reação anterior. Depois de cada PCR, os produtos das reações foram verificados em gel de agarose 1%, a fim determinar o tamanho dos fragmentos. A sonda produzida foi denominada CgW.

Para o isolamento e amplificação de sequências parciais do gene da histona H<sub>1</sub>, foram utilizados os *primers* degenerados H<sub>1</sub> F (5' ATG GCA GAA RYC GCM CCA GC 3') e H<sub>1</sub> R (5' TAC TTC TTC TTG GGS GCT GC 3'), cedidos pelo Msc Diogo Teruo Hashimoto e pelo Dr Fábio Porto Foresti do Laboratório de Genética de Peixes da UNESP de Bauru. Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1% e consistiram em 650 pb. A sonda de DNAr 18S utilizada foi obtida do peixe *Prochilodus argenteus* (Hatanaka e Galetti Jr., 2004) e a sonda de DNAr 5S foi obtida a partir da espécie *Leporinus elongatus* (Martins e Galetti Jr., 1999).

As sondas para Histona H<sub>1</sub>, 5S e CgW foram marcadas com digoxigenina 11-dUTP (Roche Applied Science) por PCR e os sinais de hibridação foram detectados usando anti-digoxigenina-rodamina. A sonda 18S foi marcada com biotina 14-dATP por *nick translation*, seguindo as instruções do fabricante (Bionick Labelling System – Invitrogen). A detecção e a



amplificação do sinal de hibridização foram realizadas usando Avidina-fluoresceína conjugada (FITC) e anticorpo anti-avidina biotilado. Os cromossomos metafásicos foram tratados de acordo com o procedimento descrito por Pinkel *et al.* (1986), com modificações, contracorados com DAPI e analisados em fotomicroscópio óptico (Olympus BX61). As imagens metafásicas foram capturadas usando o programa Image Pro Plus, 6.0 software (MediaCybernetics). A morfologia cromossômica foi determinada de acordo com a relação de braços estabelecida por Levan *et al.* (1964), os cromossomos foram classificados como metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a) e arranjados nos cariótipos em ordem decrescente de tamanho.

### Resultados

Os dados relacionados à constituição cariotípica de *Characidium cf. gomesi* da bacia dos rios Tietê e Paranapanema basearam-se nos resultados apresentados no Capítulo 2. A análise citogenética realizada nos indivíduos das quatro populações de *Characidium cf. gomesi* evidenciou um número diplóide constante de  $2n=50$  cromossomos, com número fundamental de braços (NF) igual a 100 para indivíduos de ambos os sexos (Capítulo 2 e Figuras 2 e 3). No entanto, uma variação de zero a quatro cromossomos B foi observada nos indivíduos analisados da população do rio Paranapanema. Estes cromossomos mostraram-se pequenos, acrocêntricos e com frequência variável, tanto intra quanto interindividualmente (Capítulo 2). Os cariótipos dos representantes destas populações apresentaram 31 cromossomos metacêntricos e 19 submetacêntricos para as fêmeas e por 32 metacêntricos e 18 submetacêntricos para os machos.

A detecção da heterocromatina constitutiva pelo bandamento C revelou uma distribuição de bandas similares entre as populações, além de um mesmo sistema ZZ-ZW de cromossomos sexuais. Foram identificados blocos de heterocromatina nas regiões pericentroméricas da maioria dos cromossomos do complemento autossômico, além de um grande bloco intersticial no braço longo do Z e do cromossomo W totalmente heterocromático (Figuras 2 e 3). Os cromossomos B apresentaram-se totalmente heterocromáticos (Capítulo 2).

Na identificação das regiões nucleolares pela impregnação com o nitrato de Prata, pelo fluorocromo CMA<sub>3</sub> e pela sonda de DNAr 18S, as RONS foram evidenciadas em posição terminal no braço longo do par submetacêntrico número 18 nas populações dos rios Paranapanema, Grande e Paraguai (Figuras 2, 3, 4 e 6). No entanto, em algumas metáfases da

população do Rio Paranapanema, o DNAr 18S foi também localizado em posição peritelomérica dos braços longos de outros cromossomos, inclusive do Z (Figura 8b). Na população do Rio Tietê, as RONS foram localizadas no par sexual, mas foi também observado um terceiro cromossomo submetacêntrico portador de DNAr em algumas metáfases (Figura 8c).

Os sítios de DNAr 5S foram localizados em posição pericentromérica do par 25 nos indivíduos das populações dos rios Paranapanema, Grande e Paraguai. Já para a população de *Characidium cf. gomesi* da bacia do Rio Tietê, os sítios de DNAr 5S foram localizados em dois pares cromossômicos, no par 25 e no par 20 (Figura 4, Capítulo 2).

As sequências para histona H<sub>1</sub> foram evidenciadas em posição pericentromérica dos pares 6 e 22 nos indivíduos das populações dos rios Paranapanema e Grande (Figuras 5a,d) e em posição peritelomérica no braço curto dos cromossomos do par 6 na população do Rio Paraguai (Figura 5c). Na população do Rio Tietê, esses clusters foram localizados em posição peritelomérica no par 6 e em posição intersticial no par 22 (Figura 5b).

A amplificação do cromossomo W por DOP-PCR resultou em fragmentos de DNA com tamanhos que variam de 200 e 600 bp (Figura 1). A hibridação da sonda CgW em preparações de cromossomos metafásicos de indivíduos de todas as populações de *Characidium cf. gomesi* resultou em completa marcação no cromossomo W e sinais de hibridação na região intersticial dos braços longos do cromossomo Z, além de marcações nos cromossomos B da população do Rio Paranapanema (Figura 7). A utilização simultânea em experimentos de FISH-duplo com as sondas CgW e 18S evidenciou marcações para DNAr 18S junto aos cromossomos Z e W nos indivíduos da população do Rio Tietê e no cromossomo Z nos da população do Rio Paranapanema (Figura 8).

## **Discussão**

### ***Estrutura Cariotípica***

No presente trabalho, o número cromossômico modal para os indivíduos analisados nas populações de *Characidium cf. gomesi* foi de 50 cromossomos para ambos os sexos e os cariótipos mostraram-se relativamente simétricos, sem diferenças ou variações populacionais relacionadas ao tamanho e morfologia dos cromossomos. Os cariótipos destas populações, inclusive, mantêm a mesma estrutura apresentada pela maioria das espécies de *Characidium* com dados citogenéticos conhecidos (Miyazawa e Galetti Jr., 1994; Maistro *et al.*, 1998;

Centofante *et al.*, 2001 e 2003; Vicari *et al.*, 2008; Noleto *et al.*, 2009; Capítulo 1). Por outro lado, as populações analisadas de *Characidium cf. gomesi*, a despeito de sua macroestrutura aparentemente conservada, apresentam uma intensa variação interpopulacional, com a ocorrência de distintos cromossomos portadores de DNAr 5S, 18S e genes para a proteína histona H<sub>1</sub>, quanto à existência de cromossomos B e ainda com cromossomos sexuais em estágios distintos de diversificação. Esta significativa diversidade cromossômica nunca observada, tanto em outras populações de *Characidium* já estudadas (Capítulos 3 e 4), quanto entre outras espécies (Capítulo 5), reforçando a ideia de que a ocorrência de rearranjos cromossômicos e a falta de fluxo gênico entre as populações de *Characidium cf. gomesi* analisadas, dado seu hábito de vida em ambientes de cabeceira, poderiam representar um importante mecanismo de isolamento reprodutivo, constituindo-se numa possível via de especiação alopátrica para cada população (Capítulo 2).

#### ***Mapeamento cromossômico de famílias multigênicas***

O mapeamento cromossômico dos genes de DNAr 5S em representantes de *Characidium cf. gomesi* (Vicari *et al.*, 2008, Capítulo 2, presente estudo) evidenciou que o padrão de distribuição mais comum é a ocorrência de um único par de cromossomos portador deste gene, embora a população do Rio Tietê tenha apresentado dois pares cromossômicos com marcações para o gene de DNAr 5S (Capítulo 2). Em outras espécies de *Characidium* (Noleto *et al.*, 2009; Capítulos 3, 4 e 5), esse segmento de DNAr também tem sido observado preferencialmente em apenas um par de cromossomos, embora em duas populações de *Characidium cf. zebra* (Capítulo 3), marcações específicas também tenham sido observadas em mais cromossomos. De modo geral, apesar dessa família gênica estar localizada preferencialmente em apenas um par cromossômico e este fato constituir-se em característica comum entre os vertebrados (Martins e Galetti Jr., 2001), os cromossomos portadores deste DNAr apresentam morfologia diferentes, indicando que rearranjos estruturais estejam relacionados com a dinâmica evolutiva deste gene em espécies de *Characidium*. Em todas as espécies e populações analisadas, o DNAr 5S foi localizado em posição intersticial, porém, em compartimentos cromossômicos distintos do DNAr 18S, corroborando a situação mais frequentemente observada em vertebrados, na qual estes dois genes, embora envolvidos na constituição ribossômica, possivelmente seguem padrões evolutivos independentes (Lucchini *et al.*, 1993; Suzuki *et al.*, 1996).

As populações de *Characidium cf. gomesi* dos rios Grande, Paranapanema e Paraguai apresentaram, de maneira constante, uma constrição secundária em um par de cromossomos homólogos submetacêntricos, que sempre é marcada pelo nitrato de Prata e pela CMA<sub>3</sub>. Já na população da bacia do Rio Tietê, uma constrição secundária é comumente observada e coincidentemente marcada pela Prata no par sexual ZW. No entanto, em algumas metáfases das populações dos rios Tietê e Paranapanema, um terceiro cromossomo não identificado geralmente apresenta marcações pelo nitrato de Prata. Espécies com RONs múltiplas são comuns entre os peixes Neotropicais (Galetti Jr., 1998; Artoni e Bertollo, 2002), inclusive em *Characidium* (Vicari *et al.*, 2008) e em muitos casos as variações observadas estão relacionadas a fatores como a atividade gênica diferencial (Miller *et al.*, 1976).

A utilização da técnica FISH com as sondas de DNAr 18S e CgW foi determinante para identificar a localização e a atividade destes cístrons ribossomais e sua relação com os cromossomos autossômicos e sexuais. Assim, para todas as populações, a hibridação com a sonda de DNAr 18S confirmou os dados obtidos pela Prata, marcando o par sexual da população do Rio Tietê e o par dezoito das demais populações, bem como um terceiro cromossomo na população dos rios Tietê e Paranapanema. Já a hibridação simultânea da sonda de DNAr 18S com a sonda CgW em exemplares da população do Rio Paranapanema, evidenciou que o terceiro cromossomo portador de cístrons ribossomais trata-se do cromossomo sexual Z, indicando que nesta população também existem sequências para o DNAr 18S, possivelmente pequenas, localizadas nos cromossomos sexuais. No entanto, nas populações dos rios Grande e Paraguai, nenhum sinal de hibridação com a sonda 18S foi verificado nos cromossomos relacionados ao sexo, indicando que, ou as sequências são pequenas demais para detecção por FISH ou estas sequências de DNAr teriam sido perdidas dos cromossomos Z e W destas populações.

O mapeamento cromossômico do gene para histona H<sub>1</sub> em *Characidium cf. gomesi* por hibridação fluorescente *in situ* evidenciou esta sequência em dois pares de cromossomos nas populações dos rios Paranapanema, Tietê e Grande e em apenas um par na população de Tangará da Serra. Nas populações dos rios Paranapanema e Grande, as marcações foram evidenciadas em posição intersticial nos pares 6 e 22, enquanto que nos indivíduos da população do Rio Tietê, os sinais de marcação foram evidenciados em posição intersticial no par 22 e em posição peritelomérica nos cromossomos do par 6. Nos exemplares de Tangará da Serra, o único *locus* existente foi observado em posição peritelomérica também nos cromossomos do par 6. Os genes para as proteínas histônicas constituem uma família gênica que inclui um número variável de cópias, sendo de apenas duas cópias na levedura

*Saccharomyces cerevisiae* (Maxson *et al.*, 1983; Ushinsky *et al.*, 1997) e podendo chegar até 1000 cópias em espécies de ouriço-do-mar (Kedes, 1979). Algumas destas cópias estão agrupadas em uma ou mais regiões cromossômicas formando *clusters*, que podem incluir os genes para as quatro proteínas histônicas do cerne do nucleossomo (H<sub>2</sub>A, H<sub>2</sub>B, H<sub>3</sub> e H<sub>4</sub>) e, dependendo da espécie, também da histona de ligação H<sub>1</sub> (Cabrero *et al.*, 2009). No entanto, outras cópias podem estar solitariamente espalhadas pelo genoma, como genes funcionais órfãos ou como pseudogenes (Childs, 1981).

A organização dos genes da família de histonas em *clusters* caracteriza estas sequências como um excelente material para mapeamento cromossômico por meio da aplicação da técnica de hibridização *in situ*. No entanto, apesar de existirem diversos estudos relacionados à estrutura, funcionalidade e evolução das proteínas histônicas (Arents *et al.*, 1991; Ramakrishnan *et al.*, 1993), poucos trabalhos para localização cromossômica por hibridação *in situ* de suas sequências têm sido realizados (Cabrero *et al.*, 2009). Em peixes, apenas *Salmo salar*, *Salmo trutta* e uma espécie de *Oncorhynchus* (Pendás *et al.*, 1994) já tiveram genes para proteínas histônicas mapeados cromossomicamente. Neste estudo, foram usados genes para histona H<sub>1</sub> e histona H<sub>4</sub> e estas duas sequências foram localizadas em *clusters* em um mesmo *locus* cromossômico para as três espécies, próximos ao centrômero. No presente estudo, foi verificado que os sinais de hibridação com a sonda para a histona H<sub>1</sub> foram muito fortes, o que poderia indicar que estas sequências estão repetidas em *tandem* no genoma destas populações de *Characidium cf. gomesi*. No entanto, esta definição necessita de novas análises envolvendo a organização dos genes para a histona H<sub>1</sub> junto ao conjunto cromossômico de *Characidium cf. gomesi*. De qualquer forma, estas sequências não apresentaram nenhum tipo de relação cromossômica com as sequências para o DNAr 18S, 5S e nem com os cromossomos sexuais ou B, caracterizando-se como novos e importantes marcadores neste grupo de peixes.

### ***Cromossomos sexuais e cromossomos B***

A utilização dos fluorocromos CMA<sub>3</sub> e DAPI evidenciou que a heterocromatina do cromossomo W destas populações é rica em AT, com exceção apenas do W da população do Rio Tietê, que possui também sinais fluorescentes GC ricos em posição coincidente com as RONS. Considerando que a região organizadora nucleolar esteja intimamente relacionada ao processo de heterocromatinização dos cromossomos Z e W em espécies de *Characidium* (Capítulos 1 e 2), pode se considerar também que a diferenciação dos cromossomos sexuais

esteja relacionada a eventos de amplificação e dispersão da heterocromatina constitutiva rica tanto em pares de bases AT quanto GC. Em representantes do gênero *Eigenmannia*, ao contrário, os cromossomos sexuais de algumas espécies/citótipos apresentam padrões homogêneos e intercalados de sequências ricas em pares de bases GC indicando que, para este grupo, os processos de diferenciação sexual estariam relacionados exclusivamente a regiões cromossômicas GC positivas (Almeida-Toledo *et al.*, 2001, Henning *et al.*, 2008). Por outro lado, em outras espécies de peixes como em *Poecilia sphenops* var. *melanistica* (Haaf e Schmid, 1984), estudos indicaram que são sequências ricas em pares de bases AT que estão diretamente relacionadas à determinação sexual, reforçando que a evolução dos cromossomos sexuais em peixes poderia estar relacionada tanto a regiões ricas em GC como em AT.

O gênero *Characidium* possui espécies com e sem cromossomos sexuais heteromórficos (Miyazawa e Galetti Jr., 1994; Capítulo 1). O sistema ZZ-ZW apresentado por algumas espécies caracteriza-se por um cromossomo Z metacêntrico com blocos heterocromáticos intersticiais e/ou terminais e por um cromossomo W totalmente heterocromático, com variações interespecíficas e interpopulacionais, relativas ao tamanho, morfologia e presença de cístrons ribossomais (Capítulos 1, 2 e 4). As populações de *Characidium cf. gomesi* analisadas neste trabalho caracterizam-se por apresentar um cromossomo Z conservado, com morfologia metacêntrica e com um bloco de heterocromatina localizado em posição intersticial no braço longo, próximo ao centrômero. No entanto, o cromossomo W apresenta características que são exclusivas para cada população. Enquanto os indivíduos das populações dos rios Grande, Paranapanema e Tietê apresentam um cromossomo W submetacêntrico e menor que o Z, na população do Rio Paraguai ele se mostra metacêntrico e com o mesmo tamanho do Z. O cromossomo W da população do Rio Grande apresenta ainda o menor tamanho entre todos e o W da população do Rio Tietê possui RONS alocadas em posição terminal do seu braço longo (Capítulo 2). Estas características populacionais são muito similares àquelas observadas no processo de diferenciação dos cromossomos sexuais em espécies de peixes do gênero *Triportheus*. Neste grupo, além da presença constante de um sistema heteromórfico de cromossomos do tipo ZZ-ZW em todas as espécies e populações analisadas, também são observadas variações morfológicas e estruturais no cromossomo W, além de existirem cístrons ribossomais junto a este cromossomo sexual em algumas espécies (Artoni *et al.*, 2001; Artoni e Bertollo, 2002; Nirchio *et al.*, 2007; Diniz *et al.*, 2008a; 2008b).

Os sinais de hibridação nos cromossomos Z e W após a utilização da sonda CgW em todas as populações de *Characidium cf. gomesi* indicam que os cromossomos sexuais

encontrados são homólogos e corroboram a ideia de origem única para este sistema de diferenciação sexual nas espécies do gênero *Characidium*. No entanto, em alguns grupos de peixes diretamente relacionados, não se observa homologia entre os cromossomos sexuais existentes, apontando para uma origem independente destes sistemas, como observado em representantes dos gêneros *Eigenmannia* (Henning *et al.*, 2008), *Oryzias* (Takehana *et al.*, 2007) e em alguns gêneros de salmão (Phillips *et al.*, 2001). De fato, vários estudos têm apontado que a origem e evolução independente dos cromossomos sexuais em grupos de peixes diretamente relacionados caracterizam-se como eventos relativamente comuns (Devlin e Nagahama, 2002) e possivelmente recentes (Volf, 2005).

A homologia do sistema cromossômico ZZ/ZW identificado em *Characidium cf. gomesi* reforça a ideia de que a formação deste sistema estaria relacionada à ocorrência de mecanismos de alterações cromossômicas estruturais em um único par de cromossomos homomórficos ancestral. Vicari *et al.* (2008) propuseram a ocorrência de um *proto* cromossomo sexual para explicar a diferenciação do sistema heteromórfico ZZ/ZW em algumas espécies de *Characidium*, em comparação àquelas homomórficas, sem cromossomos diferenciados morfologicamente em relação ao sexo. Os experimentos de hibridação simultânea com a sonda CgW e com a sonda para DNAr 18S, além de confirmarem a associação do DNAr 18S com os cromossomos sexuais em representantes da bacia do Rio Tietê, caracterizaram a existência de região organizadora nucleolar no cromossomo Z dos indivíduos do Rio Paranapanema (Figura 8b). Tais resultados reforçam a hipótese de que as RONS já deveriam fazer parte dos cromossomos sexuais ancestrais em espécies de peixes do gênero *Characidium*, indicando ainda que esses cromossomos ancestrais seriam morfologicamente similares aos cromossomos Z observados em exemplares machos da população atual do Rio Alambari (Figura 8c). Para as demais populações, esse par ancestral poderia ter sofrido uma transposição da RON para um par submetacêntrico grande do grupo dos autossomos, como observado em representantes da bacia dos rios Paranapanema, Grande e Paraguai (Maistro *et al.*, 2004; Capítulo 2), ou até mesmo para outros cromossomos, resultando no surgimento de RONS múltiplas, evidenciadas nos representantes das bacias dos rios Paranapanema e Tibagi (Maistro *et al.*, 2004; Vicari *et al.*, 2008; Capítulo 2).

A presença de cromossomos B já foi relatada em cerca de 38 espécies de peixes da região Neotropical (Oliveira *et al.*, 2007), mas muitos destes estudos concentraram-se apenas em descrever a ocorrência e a frequência destes elementos genômicos extras nas amostras analisadas. Dos poucos trabalhos envolvendo estudos sobre a estrutura a composição dos cromossomos B em peixes, destacam-se os realizados em *Astyanax scabripinnis* (Mestriner *et*

*al.*, 2000) e em *Prochilodus lineatus* (Maistro *et al.*, 2000; Jesus *et al.*, 2003 e Artoni *et al.*, 2006), que apontam para uma possível origem dos cromossomos B existentes a partir de elementos genômicos do complemento A. No presente estudo, os cromossomos B caracterizados nos representantes da população de *C. cf. gomesi* do Rio Paranapanema possivelmente também tiveram uma origem a partir dos cromossomos do complemento A, especificamente por processo de diversificação dos cromossomos sexuais, pois estes elementos genômicos extras apresentaram significativa homologia com os cromossomos Z e W. No processo evolutivo destes cromossomos sexuais heteromórficos, com a possível transposição das RONS para outros pares cromossômicos (Capítulo 2), os cromossomos B poderiam ter se originado a partir de fragmentos gerados durante a ocorrência de rearranjos cromossômicos e posteriormente terem passado por processos de ampliação das sequências de DNA repetitivo das quais foram gerados, conforme processo discutido por Houben *et al.* (1997).

Os resultados obtidos com a utilização de diferentes marcadores cromossômicos como as sondas de DNAr 18S e 5S, sonda para histona H<sub>1</sub> e sonda CgW, evidenciaram a existência de características estruturais semelhantes entre os cromossomos dos indivíduos das populações analisadas e reforçam a ideia de ainda existir uma estreita relação filogenética entre elas, apesar de os pontos de ocorrência de algumas destas populações estarem a centenas de quilômetros de distância. No entanto, o mapeamento físico de algumas sequências de DNA repetitivo evidenciou que a população do Rio Tietê é a mais divergente entre as analisadas (Figura 9, possivelmente como consequência de um fluxo gênico restrito, como observado em espécies de *Chromaphyosemion bivittatum* (Volker *et al.*, 2007) e alguns citótipos de *Hoplias malabaricus* (Cioffi *et al.*, 2009).

Considerando que o DNA satélite consiste em repetições em *tandem* que geralmente estão localizadas em regiões cromossômicas com conhecidas restrições a recombinação, como regiões pericentroméricas (Oliveira e Wright, 1998), regiões adjacentes ao DNAr 5S (Martins *et al.*, 2006), regiões periteloméricas (Saito *et al.*, 2007) e em cromossomos sexuais e B (Reed e Phillips, 1995; Mandrioli *et al.*, 2003; Parise-Maltempa *et al.*, 2007), pode-se supor que a significativa variabilidade cariotípica observada em populações de *C. cf. gomesi* da bacia do rio Tietê esteja diretamente relacionada a uma elevada taxa de mutação cromossômica principalmente nestas regiões, bem como a alguns aspectos relacionados ao hábito de vida da espécie e à geografia da região da Cuesta de Botucatu, que facilitariam a fixação de populações apresentando novas variantes cromossômicas.



**Referências Bibliográficas**

As referências correspondentes a este capítulo encontram-se no final desta tese.

Tabela 1: Exemplares de *Characidium* analisados neste estudo. LBP: Coleção de Peixes Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, Instituto de Biociências, UNESP. F: fêmeas e M: machos

Espécies	LBP	Localidade	F	M	Coordenadas
<i>C. cf. gomesi</i>	6723	Rio Alambari – Botucatu – SP	22	8	S 22°56'06 W 48°19'18
<i>C. cf. gomesi</i>	6733	Rio Novo – Avaré – SP	18	8	S 23°01'26 W 48°49'32
<i>C. cf. gomesi</i>	9021	Rio S. Domingos – Muzambinho – MG	6	4	S 21°20'47 W 46°28'08
<i>C. cf. gomesi</i>	9019	Rio Vermelho – Tangará da Serra – MT	8	5	S 14°35'25 W 57°42'35

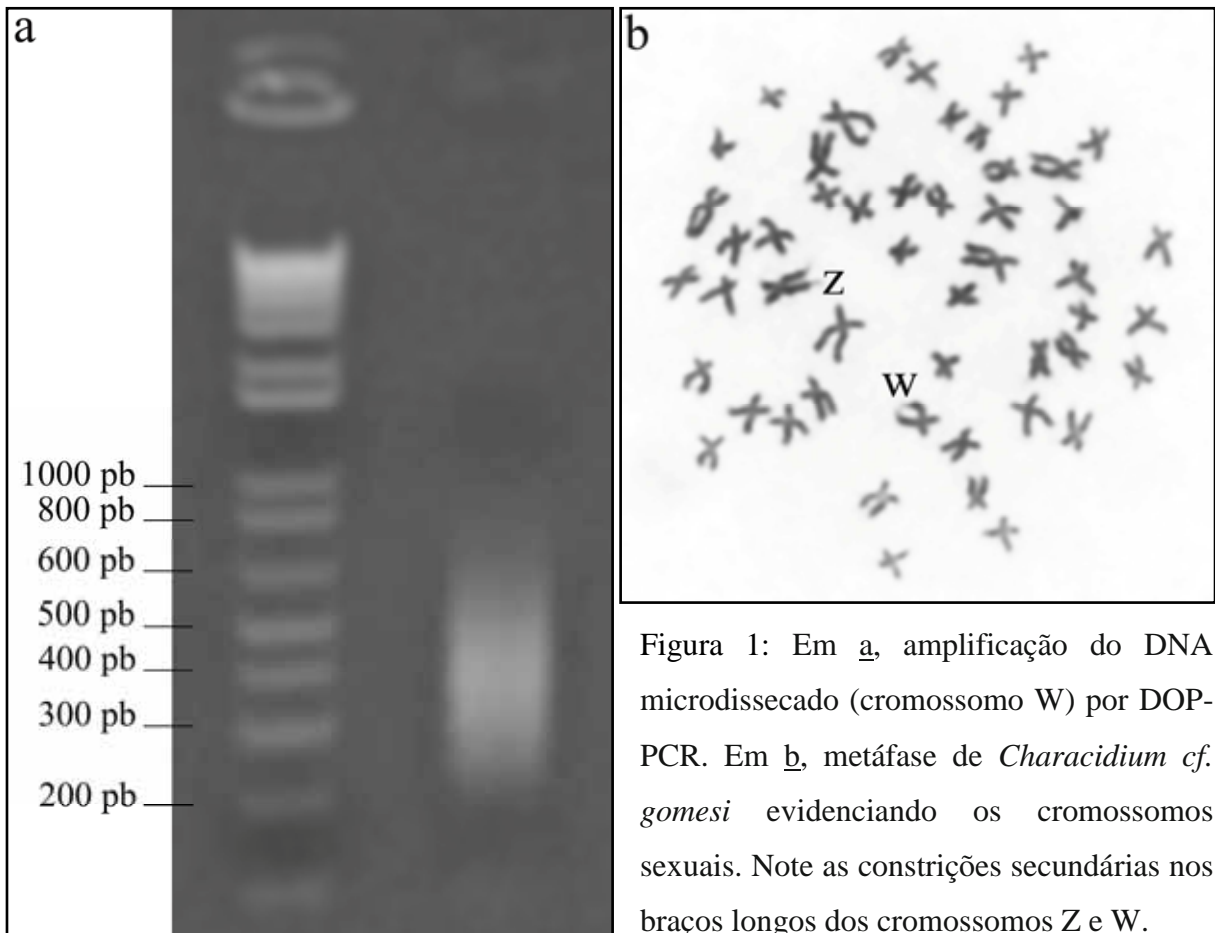


Figura 1: Em a, amplificação do DNA microdissecado (cromossomo W) por DOP-PCR. Em b, metáfase de *Characidium cf. gomesi* evidenciando os cromossomos sexuais. Note as constrições secundárias nos braços longos dos cromossomos Z e W.

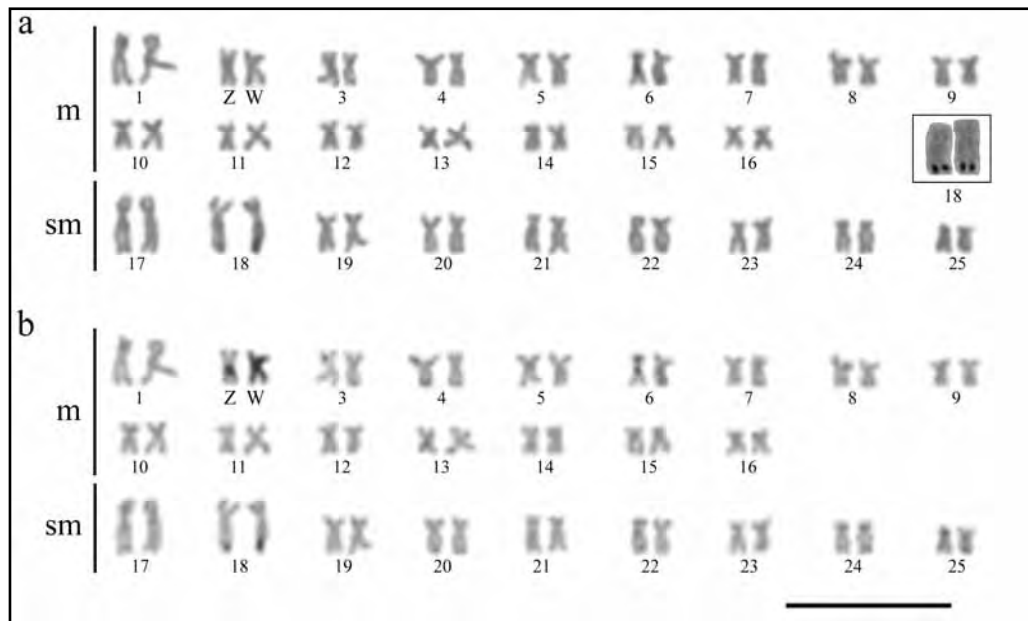


Figura 2: Cariótipos de exemplar fêmea de *Characidium cf. gomesi* de Tangará da Serra após coloração convencional por Giemsa (a) e bandamento C (b). Em destaque os cromossomos portadores das RONS. A barra equivale a 10  $\mu\text{m}$ .

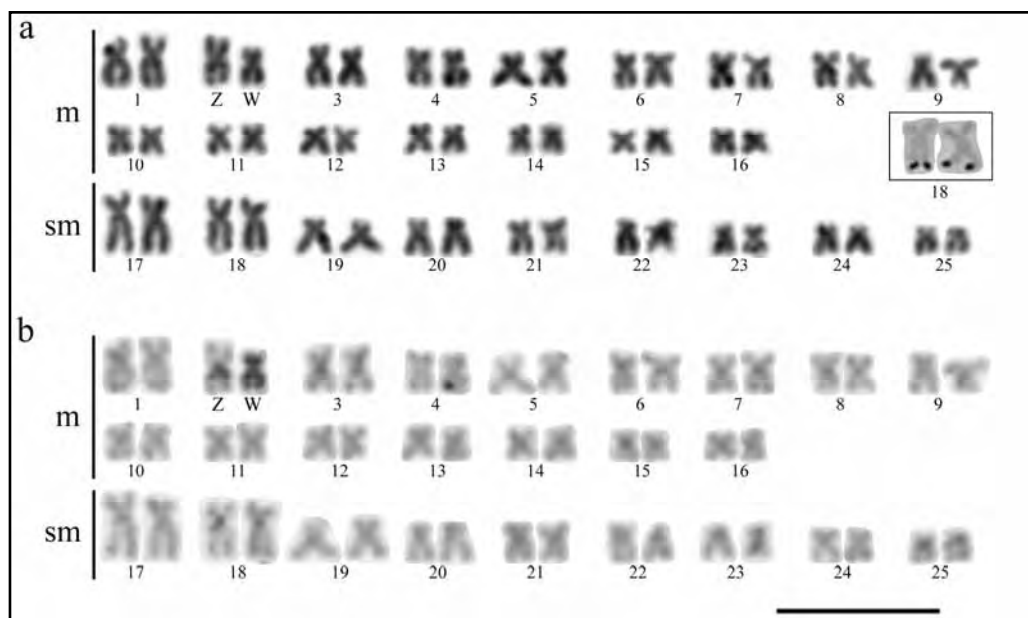


Figura 3: Cariótipos de exemplar fêmea de *Characidium cf. gomesi* de Muzambinho após coloração convencional por Giemsa (a) e bandamento C (b). Em destaque os cromossomos portadores das RONS. A barra equivale a 10  $\mu\text{m}$ .

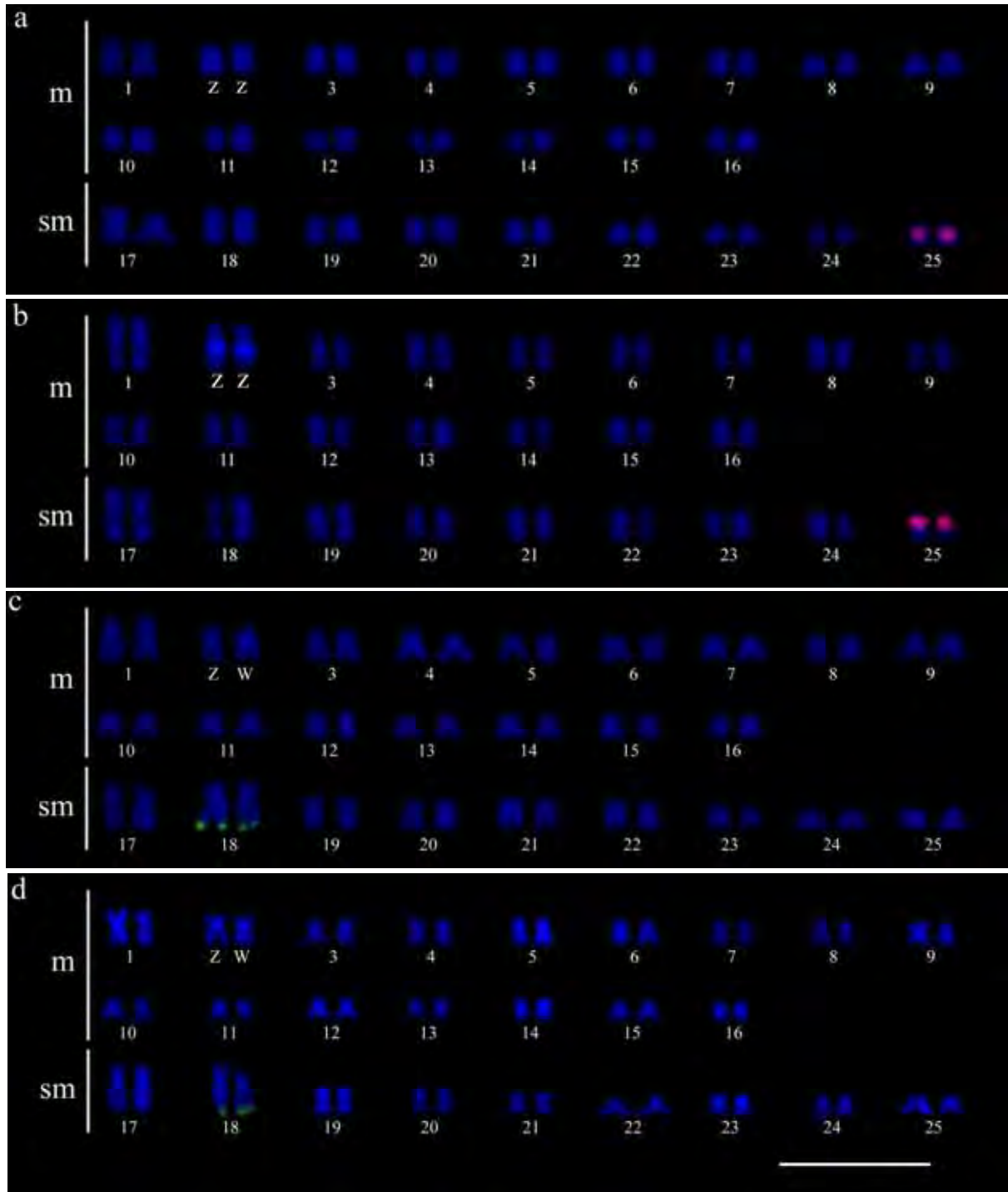


Figura 4: Cariótipos de exemplares de *Characidium cf. gomesi* do rio São Domingos, Muzambinho, MG (a, c) e do rio Vermelho, Tangará da Serra, MT (b,d) mostrando os sítios de DNAr 5S corados com anti digoxigenina rodamina no par 25 (a e b) e os os sítios de DNAr 18S corados com avidina FITC e presentes no par 18 (c e d). A barra equivale a 10  $\mu$ m.

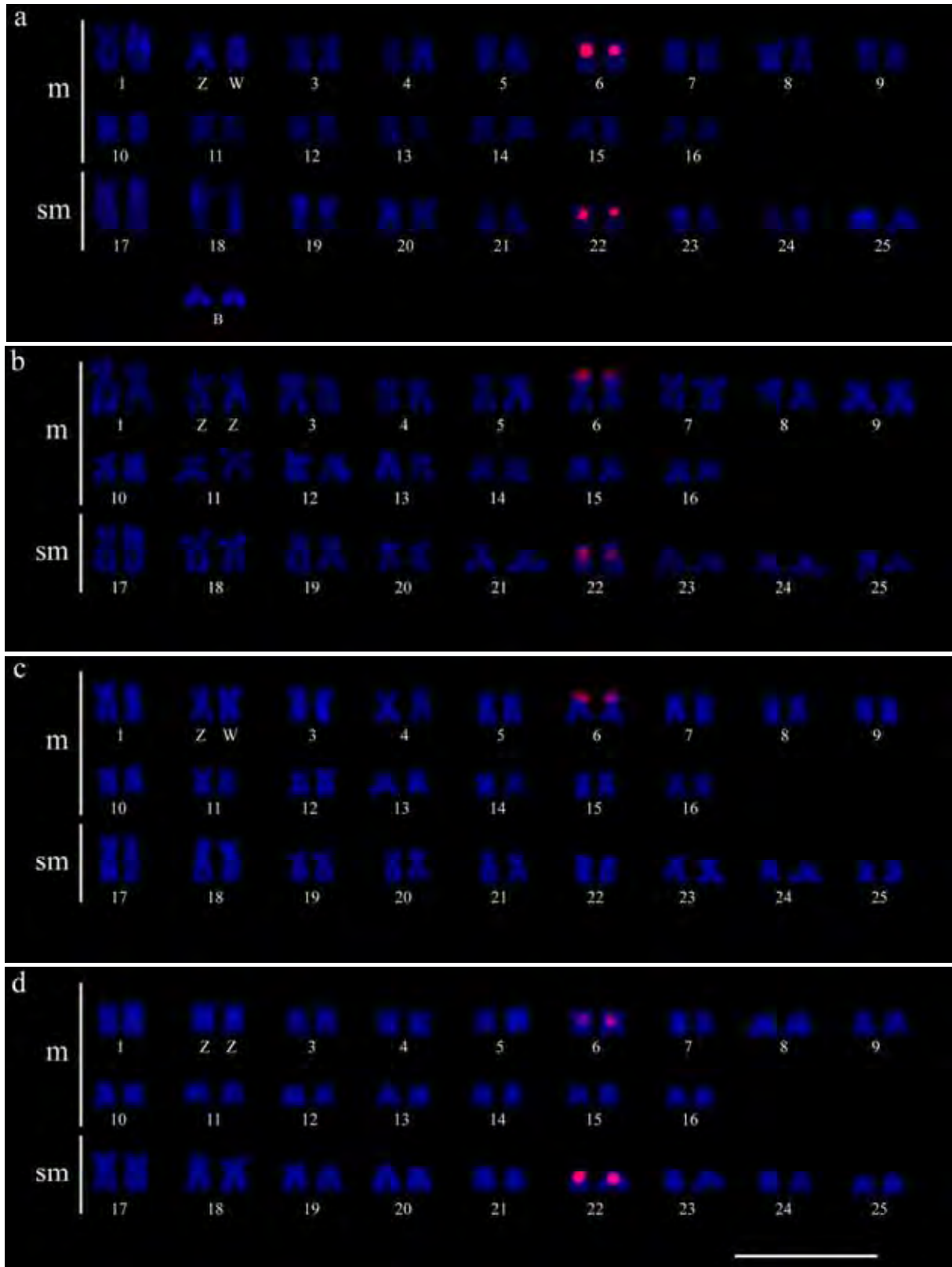


Figura 5: Cariótipos de exemplares de *Characidium cf. gomesi* do rio Novo, Avaré (a); do rio Alambari, Botucatu (b); do rio Vermelho, Tangará (c) e do rio São Domingos, Muzambinho (d), mostrando os sítios para a histona H<sub>1</sub> corados com anti digoxigenina rodamina nos pares 6 e 22. A barra equivale a 10  $\mu$ m.

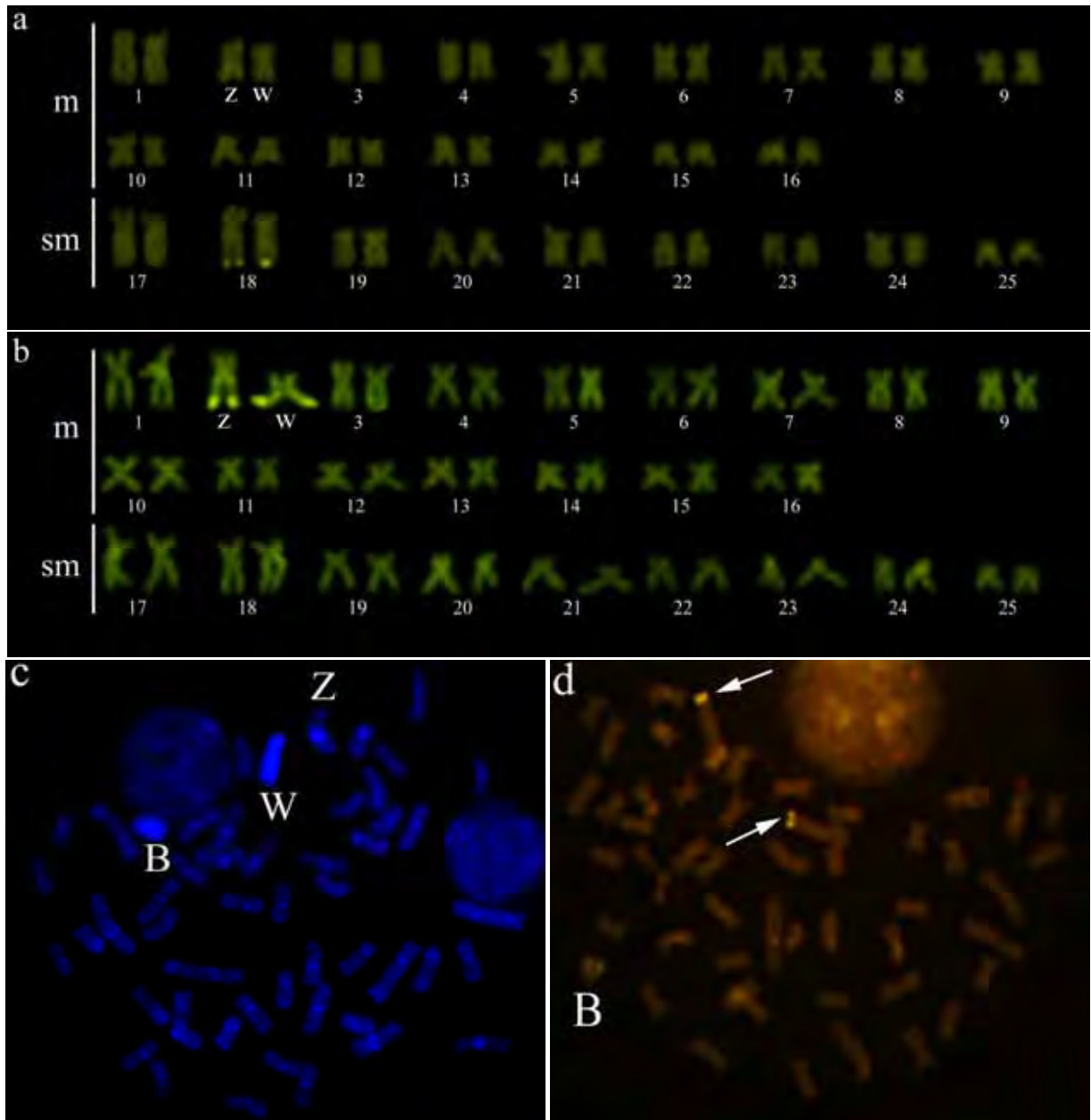


Figura 6: Em a e b, cari6tipos de *Characidium cf. gomesi* ap6s tratamento com o fluorocromo Cromomicina A<sub>3</sub>. Em a, padr6o apresentado pelas popula66es do rio Paranapanema, Paraguai e do rio Grande e em b, padr6o apresentado pela popula666o do rio Tiet6. Note que os s6tios GC s6o observados apenas em posi66o terminal do bra6o longo do par 18 (a) e em posi66o final dos cromossomos Z e W (b). Em c e d, metafases de *Characidium cf. gomesi* do rio Paranapanema ap6s tratamento com fluorocromo DAPI e CMA<sub>3</sub>, respectivamente. Note como os cromossomos sexuais e o B s6o ricos em segmentos AT (c). Em d, note que o cromossomo B tamb6m possui segmentos ricos em AT. A barra representa 10 $\mu$ m.

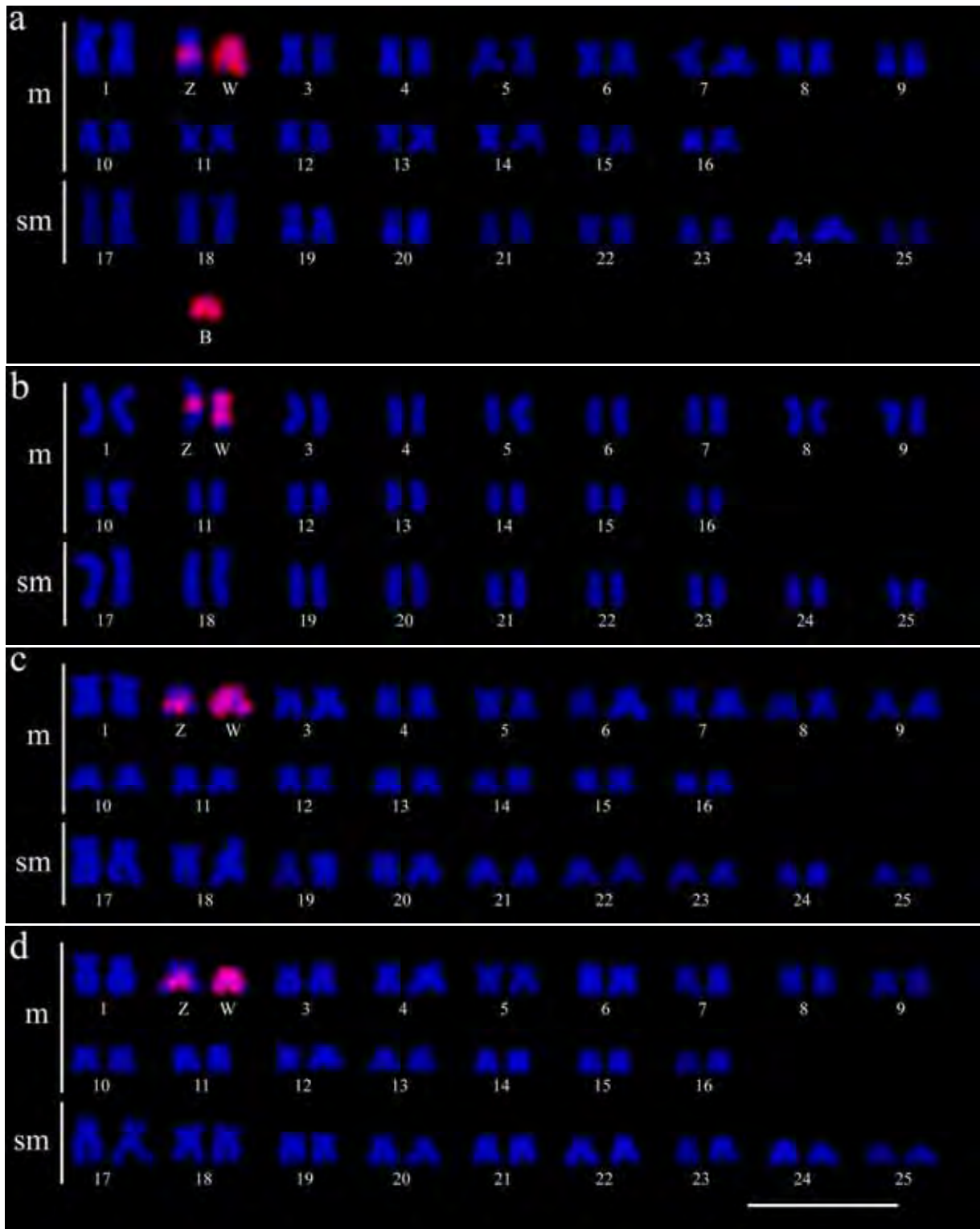


Figura 7: Cariótipos de exemplares fêmeas de *Characidium cf. gomesi* do rio Novo, Avaré (a); do rio Alambari, Botucatu (b); do rio Vermelho, Tangará (c) e do rio São Domingos, Muzambinho (d), após hibridação com a sonda CgW. Observe os cromossomos W totalmente hibridizados e os cromossomos Z com sinais de hibridação apenas pericentroméricos. A barra representa 10  $\mu$ m.



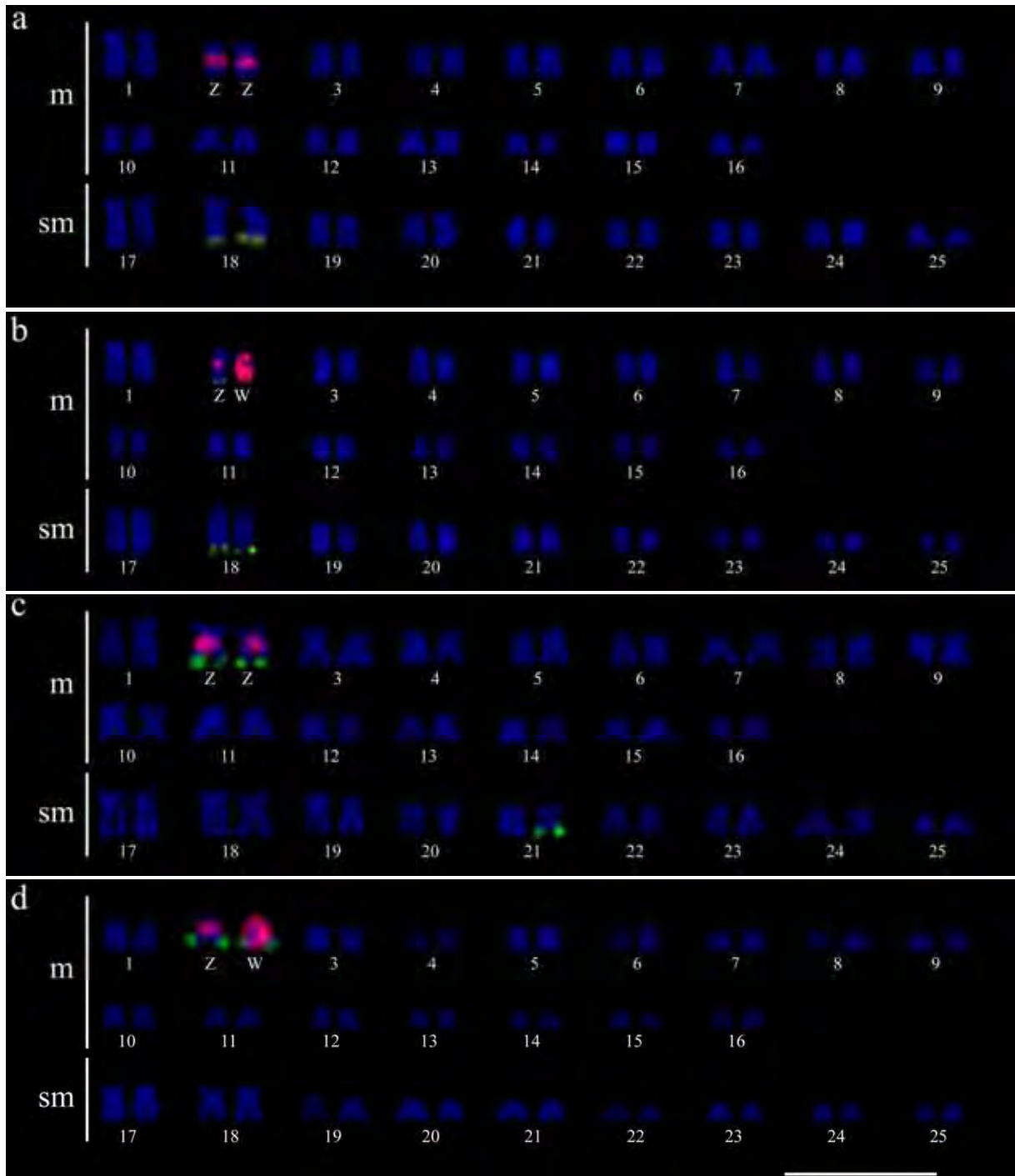


Figura 8: Cariótipos de exemplares fêmeas e machos de *Characidium cf. gomesi* do rio Novo, Avaré (a e b) e do rio Alambari, Botucatu, (c e d) após hibridação simultânea com as sondas CgW e 18S. Em a e b, o DNAr 18S (corado com avidina FITC) está presente junto ao par cromossômico 18. No entanto, no cariótipo b, note a presença de um pequeno sinal fluorescente para o DNAr 18S junto ao cromossomo Z. Em c e d, o DNAr 18S (corado com avidina FITC) está presente junto aos cromossomos sexuais Z e W. No entanto, no cariótipo c, note a presença de um terceiro cromossomo (no par 21) com sítio para DNAr 18S. A barra equivale a 10  $\mu$ m.

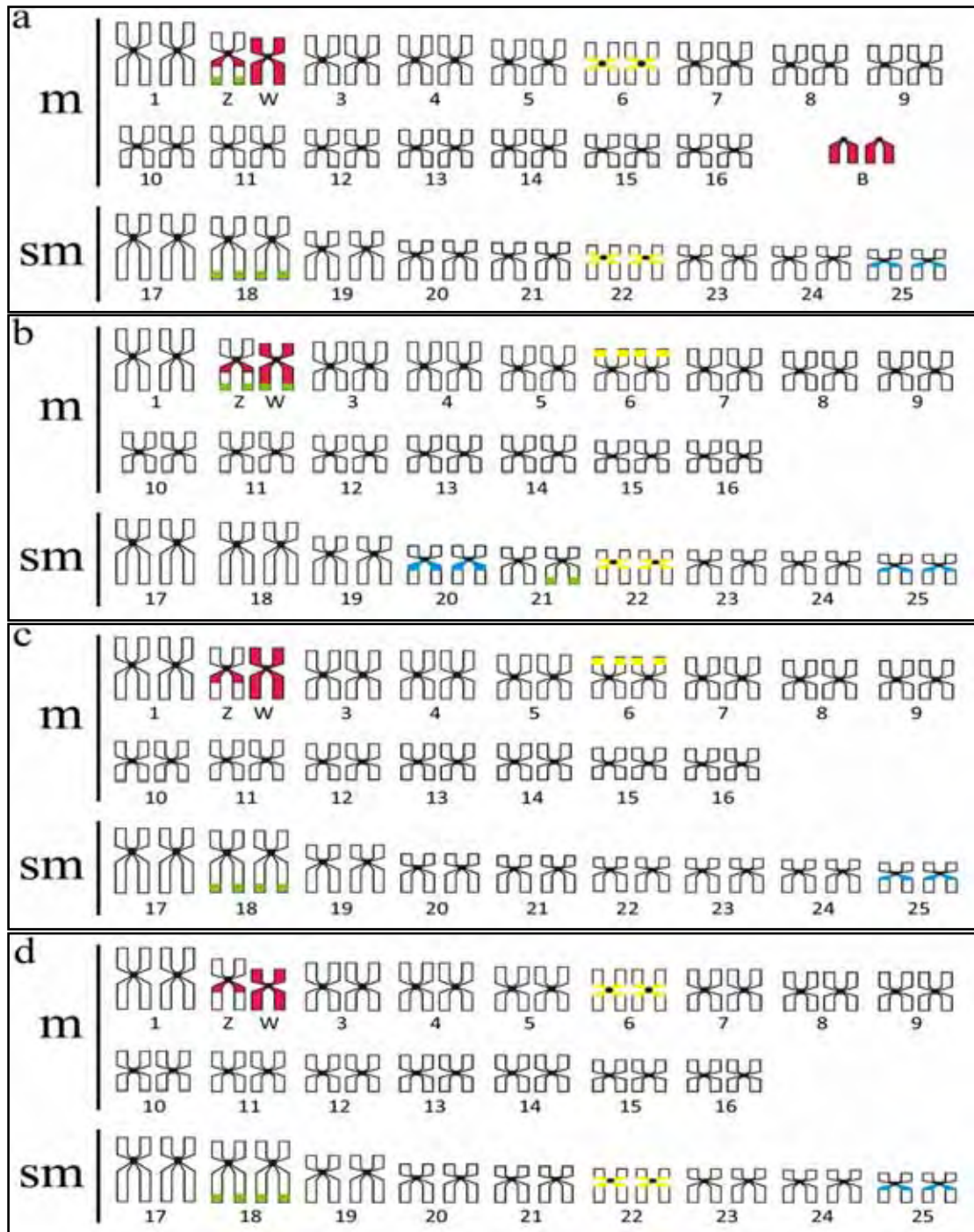


Figura 9: Ideogramas das populações de *Characidium cf. gomesi* da bacia do rio Paranapanema, Tietê, Paraguai e do rio Grande, respectivamente. As hibridações com as sondas CgW, 18S, 5S e histona H<sub>1</sub> são indicadas em vermelho, verde, azul e amarelo, respectivamente.

**Capítulo 8**

**Microdissecção e pintura cromossômica de cromossomos B em peixes Neotropicais da família Crenuchidae, gênero *Characidium***

**Resumo**

Cromossomos B são cromossomos extras ao complemento cromossômico padrão e ocorrem em muitos organismos. Eles podem ter origens distintas, incluindo derivação de cromossomos autossômicos e cromossomos sexuais e até por cruzamentos entre espécies. Os mecanismos moleculares que norteiam a evolução desses elementos genômicos se assemelham aos de cromossomos sexuais univalentes e podem envolver silenciamento gênico, processos de heterocromatinização, acúmulo de DNA repetitivo e transposons. O advento da técnica de microdissecção cromossômica, método que possibilita o isolamento direto do DNA de qualquer região citogeneticamente reconhecida, tem proporcionado resultados interessantes em um número significativo de organismos que apresentam cromossomos B. No presente trabalho, são relatados os primeiros dados sobre a composição molecular dos cromossomos B apresentados por três espécies de peixes do gênero *Characidium*, *Characidium cf. gomesi*, *Characidium pterostictum* e *Characidium oiticicai*. Os cromossomos B foram microdissecados, suas sequências de bases amplificadas e as sondas produzidas foram utilizadas na hibridação com cromossomos metafásicos destas três espécies. Os resultados mostraram que os cromossomos B de *C. cf. gomesi* e *C. pterostictum* possuem homologia entre si e com alguns cromossomos do complemento A, sugerindo uma origem intra-específica, possivelmente relacionada ao processo de diferenciação dos cromossomos sexuais nestas espécies. Por outro lado, os cromossomos B de *C. oiticicai* não apresentam homologia com os cromossomos do complemento A e nem com os cromossomos B de *C. cf. gomesi* e *C. pterostictum*, sugerindo uma origem independente para estes cromossomos nesta espécie. Estudos desta natureza, além de trazerem valiosas informações sobre a constituição e distribuição do material genético presente nos cromossomos B, fornecem também subsídios para o entendimento do processo de diferenciação cromossômica nas espécies de *Characidium* estudadas.

## Introdução

Cromossomos B são elementos genômicos supranumerários ao conjunto cromossômico padrão A e estão presentes em cerca de 15% das espécies eucarióticas. Atualmente têm sido realizados intensivos estudos em relação à possível função destes elementos genômicos, incluindo desde a análise da distribuição cromossômica nas espécies, passando por sua estrutura e origem, transmissão, dinâmica populacional e evolução e até a integração dos cromossomos B com os cromossomos do conjunto genômico A. No entanto, o conhecimento sobre o DNA que compõe a estrutura cromossômica destes elementos genômicos ainda é restrito (revisão em Camacho *et al.*, 2000; Bugrov *et al.*, 2007).

A introdução da técnica de microdissecção cromossômica no início da década de 1990 permitiu uma abordagem mais direta para a investigação da composição molecular dos cromossomos B. Essa técnica é realizada por extração seletiva destes cromossomos a partir de uma célula em divisão e sua posterior amplificação por DOP-PCR (ou outro método). Até o momento, esta técnica tem sido aplicada a cromossomos B em *Secale cereale* (Long *et al.*, 2008), *Petauroides volans* (McQuade *et al.*, 1994), *Crepis capillaris* (Jamilena *et al.*, 1995), *Leiopelma hochstetteri* (Sharbel *et al.*, 1998), *Dicamptodon tenebrosus* (Brinkman *et al.*, 2000), *Nyctereutes procyonoides* (Trifonov *et al.*, 2002), *Apodemus peninsulae* (Trifonov *et al.*, 2002; Rubtsov *et al.*, 2004), *Zea mays* (Cheng e Lin, 2003), *Podisma sapporensis* (Bugrov *et al.*, 2003), *Podisma kanoi* (Bugrov *et al.*, 2007) e *Locusta migratoria* (Teruel *et al.*, 2009). Alguns destes estudos têm demonstrado que os cromossomos B contêm principalmente DNA repetitivo, entre os quais o DNA ribossomal, DNA centromérico e telomérico, além de elementos móveis, que frequentemente são encontrados nos cromossomos B de uma variedade elevada de organismos (Camacho, 2005).

Os cromossomos B observados nas espécies de *Characidium* apresentam-se em distintos processos de heterocromatinização (Capítulos 1 e 2). Em *Characidium pterostictum* e em *Characidium oiticicai*, estes elementos genômicos são representados por microcromossomos e apresentam um padrão irregular de heterocromatinização, enquanto que em *C. cf. gomesi* estes cromossomos são maiores, nitidamente acrocêntricos e totalmente heterocromáticos. O objetivo do presente trabalho foi compreender os processos de diferenciação dos cromossomos B em três espécies de *Characidium* e tentar determinar a sua origem, com o uso das técnicas de microdissecção e pintura dos cromossomos.

## Material e Métodos

### *Origem dos exemplares, preparação citogenética e bandamentos cromossômicos*

As preparações de cromossomos mitóticos foram obtidas a partir de tecido renal e brânquias utilizando-se a técnica referida em Foresti *et al.* (1981). Foram utilizadas preparações de espécimes de *Characidium cf. gomesi* (8 machos e 18 fêmeas) provenientes do rio Novo, bacia do rio Paranapanema, município de Avaré, SP; de *Characidium pterostictum* (15 fêmeas e 5 machos) do ribeirão Betari, bacia do rio Ribeira, município de Apiaí, SP e de *Characidium oiticicai* (5 machos e 15 fêmeas) do rio Paraitinga, bacia do rio Tietê, município de Salesópolis, SP, que apresentaram cromossomos supranumerários. O bandamento C, para verificação da natureza heterocromática dos cromossomos foi realizado seguindo o protocolo descrito por Sumner (1972). As regiões cromossômicas ricas em GC foram identificadas com o uso do fluorocromo Cromomicina A<sub>3</sub> (Schweizer, 1976) e a identificação de regiões cromossômicas ricas em AT, com o fluorocromo DAPI (Schweizer *et al.*, 1978).

### *Obtenção de sondas cromossômicas por microdissecção*

Para a microdissecção dos cromossomos, suspensões de células de *Characidium cf. gomesi*, *C. pterostictum* e *C. oiticicai* contendo boa quantidade de metáfases foram gotejadas em lamínulas e coradas com Giemsa 5% por 5 minutos. Os cromossomos B, facilmente identificados por apresentarem tamanho reduzido e morfologia distinta dos demais cromossomos do complemento A, foram microdissecados utilizando-se um micromanipulador com agulha de vidro (5171-Eppendorf), acoplado a um microscópio invertido (Axiovert 100 - Zeiss).

### *DOP-PCR (DOP-Degenerate Oligonucleotide Primer)*

Seis cromossomos B de cada espécie foram microdissecados e transferidos para tubos de microcentrífuga contendo solução de suspensão composta de 9µL de mix DOP-PCR (1µL de Thermo-Sequenase tampão 1X, 1µL de dNTPs a 2mM, 2µL de *primer* DOP - 5' CCGACTCGAGNNNNNATGTGG 3' (Telenius *et al.*, 1992) a 10µM e 5µL de água). Os tubos de microcentrífuga foram aquecidos a 90°C por 10 minutos para desnaturar proteínas cromossômicas e em seguida foi adicionado 1µL de Thermo-Sequenase a 4U/µl (Thermo-Sequenase Cycle Sequencing Kit, USB) a cada tubo. As reações de PCR foram realizadas usando um termociclador PTC-200™ Peltier Thermal Cycler (MJResearch, Inc).

A amplificação inicial de produtos microdissecados (RAMP-PCR) foi realizada sob as seguintes condições: 94°C por 3 minutos, 12 ciclos a 94°C por 1 minuto e 30 segundos; 37°C por 2 minutos, aumentando 0,2°C por segundo até 72°C e 72°C por 2 minutos, seguido de outros 30 ciclos de 94°C por 1 minuto e 30 segundos; 56°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e 30 segundos. Após a primeira reação de PCR, uma segunda reação padrão foi realizada para gerar um estoque das sondas. Esta segunda reação foi composta por 2,5µL Taqpolimerase tampão (10X), 2µL de MgCl (25mM), 2,5µL de dNTPs (2mM), 5µL de *primer* DOP (10µM), 0,25µL de Taqpolimerase (5U/µL), 2µL de DNA (produto da primeira reação de PCR) e 10,75µL de água para um volume final de 25µL. Os parâmetros para a reação foram: 90°C por 3 minutos, 30 ciclos a 90°C por 1 minuto e 30 segundos; 56°C por 1 minuto e 30 segundos e 72°C por 1 minuto e 30 segundos. Por último, uma terceira reação de PCR foi realizada para marcar os produtos microdissecados e amplificados. A reação de PCR foi realizada usando-se 5µL Taqpolimerase tampão (10X), 2µL de MgCl (25mM), 1,25µL de dATP (2mM), 1,25µL de dCTP (2mM), 1,25µL de dGTP (2mM), 0,8µL de dTTP (2mM), 0,7µL de digoxigenina-11-dUTP (1mM) (Roche Applied Science), 5µL de *primer* DOP (10µM), 0,5µL de Taqpolimerase (5U/µL), 3µL de DNA (produto da segunda reação de PCR) e 29,13µL de água para um volume final de 50µL. As etapas de amplificação foram as mesmas descritas para a reação anterior. Depois de cada PCR, os produtos das reações foram verificados em gel de agarose 1%, a fim de analisar o tamanho dos fragmentos, que variou de 300 a 800 pb. As sondas produzidas foram chamadas de CgB (sonda B de *Characidium cf. gomesi*), CpB (sonda B de *Characidium pterostictum*) e CoB (sonda B de *Characidium oiticicai*).

A hibridação fluorescente *in situ* (FISH) com as sondas produzidas foi realizada de acordo com o procedimento descrito por Pinkel *et al.* (1986), com modificações, os cromossomos metafásicos foram contracorados com DAPI e analisados em fotomicroscópio óptico (Olympus BX61). As imagens foram capturadas usando-se o programa Image Pro Plus, 6.0 software (MediaCybernetics).

## Resultados

O bandamento-C mostrou que os cromossomos B possuem uma natureza heterocromática distinta. No entanto, os cromossomos B de *C. oiticicai* e de *C. pterostictum* apresentam-se parcialmente heterocromáticos, enquanto que em *Characidium cf. gomesi* são totalmente heterocromáticos (Capítulos 1 e 2) (Figura 5).

A marcação com os fluorocromos base-específicos mostrou que a heterocromatina dos cromossomos B de *C. pterostictum* e *Characidium cf. gomesi* é DAPI positiva (Figuras 6a-e), mas que também possui frações de DNA CMA<sub>3</sub> positivas (Figuras 6b-f). Já em *C. oiticicai*, os cromossomos B não apresentaram afinidade pelos fluorocromos DAPI ou CMA<sub>3</sub> (Figuras 6c-d).

A hibridação com a sonda CgB em preparações de cromossomos metafásicos da mesma espécie (*Characidium cf. gomesi*) resultou em marcações nos cromossomos B e nos cromossomos sexuais, em posição pericentromérica do Z e em toda extensão do cromossomo W (Figuras 2 a,b,c). Já a hibridação da sonda CpB em preparações de cromossomos metafásicos da mesma espécie (*Characidium pterostictum*) resultou em marcações nos cromossomos B, em posição peritelomérica do cromossomo Z, em toda extensão do cromossomo W e em posição peritelomérica de um par de cromossomos acrocêntricos (Figuras 2 g,h,i). A hibridação da sonda CoB em preparações de cromossomos metafásicos da mesma espécie (*Characidium oiticicai*) resultou em marcações apenas nos cromossomos B (Figuras 2 d,e,f).

Hibridações cruzadas usando na técnica de FISH a sonda CgB em *C. pterostictum* e em *C. oiticicai*, resultaram em sinais de hibridação nos cromossomos B, nos sexuais e no par de acrocêntricos de *C. pterostictum* e apenas nos cromossomos sexuais de *C. oiticicai* (Figura 3). Já em *C. cf. gomesi* e em *C. oiticicai*, hibridações cruzadas usando para FISH a sonda CpB, resultaram em sinais de hibridação nos cromossomos B e nos sexuais de *C. cf. gomesi* e apenas nos cromossomos sexuais de *C. oiticicai*. Por sua vez, a hibridação cruzada com a sonda CoB, não resultou em sinais de hibridação em nenhum cromossomo das espécies *C. cf. gomesi* e *C. pterostictum* (Figura 4).

## **Discussão**

O DNA repetitivo, sob o ponto de vista genômico, foi por muito tempo considerado como DNA geneticamente inerte ou como lixo genômico, pois não tinha uma função claramente definida (Doolittle e Sapienza, 1980). No entanto, está claro que o seu acúmulo em determinadas áreas específicas dos cromossomos pode tornar tais sítios propícios a rearranjos como quebras, deleções, inversões e ampliações de regiões cromossômicas (Lim e Simmons, 1994; Dimitri *et al.*, 1997). Estes rearranjos, além de estarem envolvidos com distintos processos de diferenciação cariotípica, podem também estar diretamente envolvidos com a origem de cromossomos B. Neste sentido, o estudo das famílias de DNA repetitivo que



estão presentes no genoma de peixes representantes do gênero *Characidium* poderiam contribuir significativamente para a compreensão dos mecanismos evolutivos envolvidos na diversificação cariotípica deste grupo de peixes.

Os sinais de hibridação apresentados pelas sondas obtidas a partir de cromossomos B microdissectados de espécies de *Characidium* foram muito intensos, sugerindo que estes cromossomos estariam saturados com sequências de DNA repetitivo. O método de amplificação utilizado, DOP-PCR, resultou na formação de sondas de DNA possivelmente enriquecidas com sequências repetitivas, tendo em vista que estas sondas foram produzidas e hibridizadas a partir de regiões heterocromáticas (Figura 5). No entanto, fica evidente que o DNA repetitivo evidenciado pelas sondas está presente apenas em regiões de alguns cromossomos específicos, apontando para a existência de, ao menos, três tipos de DNA repetitivo no genoma das espécies de *Characidium* estudadas. Um primeiro tipo de DNA repetitivo estaria relacionado aos cromossomos B e aos sexuais de *Characidium cf. gomesi*, bem como aos cromossomos B, aos sexuais e a um par autossômico de *C. pterostictum* e também aos sexuais de *C. oiticicai*. Um segundo tipo estaria restritamente relacionado à heterocromatina presente nos cromossomos B de *C. oiticicai* e uma terceira categoria estaria relacionada à heterocromatina presente nos demais cromossomos autossômicos das três espécies. Tais resultados não excluem a possibilidade de existirem ainda outras sequências de DNA repetitivo distribuídas no genoma destas espécies.

O compartilhamento de sequências de DNA repetitivo entre os cromossomos B e os do complemento A caracteriza-se como uma situação comum em diferentes organismos, como foi demonstrado em *Vulpes vulpes* (Yang *et al.*, 1999), *Apodemus peninsulae* (Rubtsov *et al.*, 2004), *Podisma sapporensis* (Bugrov *et al.*, 2004), *P. kanoi* (Bugrov *et al.*, 2007) e *Locusta migratoria* (Teruel *et al.*, 2009).

Por outro lado, a origem dos cromossomos B a partir dos cromossomos sexuais também tem sido frequentemente postulada, principalmente em alguns gêneros de gafanhotos (Hewitt, 1979; Camacho, 2005). A microdissecção e a pintura cromossômica em gafanhotos da espécie *Podisma sapporensis* levou Bugrov *et al.* (2004) a concluir que os cromossomos B nesta espécie provavelmente seriam derivados do cromossomo X. Já em outra espécie de gafanhoto, *Locusta migratoria*, (Teruel *et al.*, 2009), a utilização de sondas obtidas a partir do cromossomo B e do sexual X, resultou em um padrão de hibridização semelhante para as duas sondas, tanto do cromossomo B quanto a partir do X, apontando para uma relação na qual o cromossomo B poderia derivar do X. No entanto, a presença de sinais de hibridação em regiões pericentroméricas de cerca de metade dos cromossomos

autossômicos não permitiu concluir que os cromossomos B teriam origem a partir dos cromossomos sexuais, uma vez que o sinal de hibridação mais evidente estava em regiões heterocromáticas do B, que poderia ser composto de DNA repetitivo presente também em muitos cromossomos do complemento A (Teruel *et al.*, 2009). Em uma terceira espécie de gafanhoto, *Eyprepocnemis plorans* (López-León *et al.*, 1994), duas sequências de DNA presentes no cromossomo B<sub>2</sub> mostraram ser coincidentes especificamente com sequências do cromossomo sexual X, sugerindo que este cromossomo B seria derivado da região paracentromérica do cromossomo X. Em vertebrados, o cromossomo B do anfíbio *Leiopelma hochstetteri* aparentemente é derivado do cromossomo W heteromórfico apresentado pelos representantes desta espécie. Esta hipótese é sustentada pela comparação de sequências de DNA (Sharbel *et al.*, 1998) e pelas semelhanças morfológicas existentes entre estes cromossomos (Green *et al.*, 1993).

Outro tipo de DNA repetitivo que tem sido frequentemente descrito em cromossomos B é o DNAr (Green, 1990). Tem sido sugerido que as regiões organizadoras de nucléolo são propensas a quebras cromossômicas e isso poderia se constituir num mecanismo através do qual os cromossomos B seriam gerados, como no híbrido entre *Solanum brevidens* e *Solanum tuberosum* (Mitchell-McGrath e Helgeson, 1998) e em representantes do gênero *Brachycome* (Houben *et al.*, 1997).

A presença de cromossomos B já foi relatada em cerca de 38 espécies de peixes da região Neotropical (Oliveira *et al.*, 2007), mas muitos destes estudos concentraram-se apenas na descrição da ocorrência e da frequência destes elementos genômicos extras nos indivíduos. Entre os poucos trabalhos envolvendo a análise da composição dos cromossomos B em peixes, destacam-se aqueles realizados em *Astyanax scabripinnis* (Mestriner *et al.*, 2000) e em *Prochilodus lineatus* (Maistro *et al.*, 2000; Jesus *et al.*, 2003; Artoni *et al.*, 2006). Em *P. lineatus*, o uso de enzimas de restrição evidenciou que os cromossomos B possivelmente possuem uma constituição genômica diferente dos cromossomos do complemento A, sendo isto decorrente de alterações determinadas pelo processo de diferenciação destes cromossomos extras, sugerindo uma origem antiga para os cromossomos B em *P. lineatus* (Maistro *et al.*, 2000). Em outros estudos, Jesus *et al.* (2003) e Artoni *et al.* (2006) demonstraram que o DNA satélite SATH<sub>1</sub> é compartilhado pelos cromossomos do lote A e pelos B em populações de *P. lineatus* do rio Mogi-Guaçu e da Lagoa Dourada, bacia do rio Tibagi, sugerindo uma origem intra-específica para os cromossomos B nesta espécie. No entanto, nem todos os segmentos de heterocromatina dos cromossomos B eram compostos por DNA satélite SATH<sub>1</sub>, indicando que outras famílias de DNA repetitivos poderiam ocorrer

nestes cromossomos B de *P. lineatus*. Em *Astyanax scabripinnis* (Mestriner *et al.*, 2000) foi demonstrado que o cromossomo supranumerário metacêntrico seria correspondente a um isocromossomo. Esta hipótese foi sustentada com base na simetria apresentada por uma sequência de DNA satélite em ambos os braços do cromossomo B, além da homologia funcional entre estes dois braços, caracterizada por seu auto-pareamento durante a meiose (Mestriner *et al.*, 2000). Já no peixe europeu *Alburnus alburnus*, o cromossomo B existente possui tamanho desproporcional, muito maior em relação aos cromossomos do complemento A e possivelmente é derivado de elementos transponíveis (Ziegler *et al.*, 2003).

Os resultados apresentados pelas análises citogenéticas em *C. cf. gomesi* e *C. pterostictum* demonstram que os cromossomos B existentes, assim como em *P. lineatus* (Jesus *et al.*, 2003; Artoni *et al.*, 2006) e *Astyanax scabripinnis*, compartilham sequências de DNA com cromossomos do complemento A, sugerindo uma possível origem intra-específica para os cromossomos B nestas espécies. No entanto, diferentemente de *Prochilodus* e *Astyanax*, os cromossomos B destas espécies de *Characidium* compartilham os mesmos segmentos heterocromáticos presentes nos cromossomos sexuais. Por outro lado, em *Characidium oiticicai*, assim como ocorre em *Alburnus alburnus* (Ziegler *et al.*, 2003), os cromossomos B aparentemente não compartilham sequências com os cromossomos do complemento A, apontando para a existência de uma origem independente destes elementos genômicos, em relação aos cromossomos B de *C. cf. gomesi* e *C. pterostictum*. Tal situação é reforçada pelo fato das sondas CgB e CpB hibridarem apenas nos cromossomos sexuais de *C. oiticicai*, reforçando também a ideia de origem dos cromossomos B a partir da diferenciação dos sexuais em *C. cf. gomesi* e em *C. pterostictum*.

A origem e a diferenciação dos cromossomos B em *C. cf. gomesi* e em *C. pterostictum* poderia ter ocorrido a partir de rearranjos cromossômicos envolvendo os cromossomos sexuais e as regiões organizadoras de nucléolo, com posterior amplificação do DNA em algumas regiões dos cromossomos B ancestrais. *Characidium cf. gomesi* e *C. pterostictum* possuem populações com e sem cromossomos B, bem como populações com polimorfismos no posicionamento e localização do DNAr 18S (Capítulos 2, 4 e 7). Tendo em vista que a evolução dos cromossomos sexuais a partir de um par homomórfico portador de DNAr caracteriza-se como um evento cada vez mais comum no gênero *Characidium* (Capítulos 1, 2, 7 e 10), o processo de diferenciação a que estes cromossomos sexuais estão submetidos possivelmente deve ter levado à total heterocromatinização do cromossomo W e de partes do Z, possibilitando a perda de conteúdo gênico no cromossomo sexo-específico e a ocorrência de polimorfismos estruturais (Capítulos 7 e 10). Rearranjos ocorridos envolvendo os genes

ribossomais alocados no cromossomo Z e no W, teriam determinado sua transposição para outros cromossomos. Nesta reorganização estrutural, o processo de ruptura também pode ter liberado outros elementos genômicos, possibilitando a formação de pequenos fragmentos adicionais que ficaram a deriva junto ao conteúdo nuclear. Seguidos processos de amplificação do DNA, formação de novos centrômeros e telomerização da parte final destes elementos genômicos, culminariam com a formação dos cromossomos B atualmente existentes (Figura 7), conforme hipótese discutida por Foresti (1998). A análise da heterocromatina dos cromossomos B por fluorocromos base-específicos parece corroborar esta hipótese, tendo em vista que a heterocromatina de *C. cf. gomesi* e *C. pterostictum* apresenta-se heterogênea em sua composição, sendo visíveis segmentos ricos em pares de base AT, mas também blocos intercalados GC positivos (Figura 6). Esta característica também é comum aos cromossomos sexuais destas espécies (Capítulos 7 e 9), que se mostram com regiões DAPI positivas co-existindo com frações de DNA ricas em pares de bases GC.

As características apresentadas pelos cromossomos B de *Characidium cf. gomesi* e *C. pterostictum* parecem indicar que estes elementos genômicos aparentemente possuem uma origem semelhante, diretamente relacionada aos processos de diferenciação dos cromossomos sexuais, mas não necessariamente uma origem única. Das cinco populações analisadas de *Characidium pterostictum* (Capítulo 4) e das quatro populações de *Characidium cf. gomesi* (Capítulo 7), apenas uma população de cada espécie apresentou representantes com cromossomos B. As diferenças morfológicas e de distribuição da heterocromatina constitutiva apresentadas por estes cromossomos B parecem indicar que, apesar de um mesmo evento poder explicar a sua formação nas diferentes espécies, estes eventos possivelmente ocorreram em períodos distintos e os cromossomos formados seguiram caminhos evolutivos independentes. Em *C. pterostictum*, a existência de homologias entre os B, os sexuais e a região heterocromática do par acrocêntrico indicaria ainda que outros eventos poderiam ter atuado na origem e diferenciação destes elementos genômicos.

O mesmo processo ocorrido em *Characidium cf. gomesi* e *C. pterostictum* pode ter ocasionado a formação dos cromossomos B em *Characidium oiticicai*. Se considerarmos que os dados da filogenia molecular apontam que estes elementos supranumerários possuem uma origem recente em espécies de peixes do gênero *Characidium*, de menos de 250.000 anos para os cromossomos B de *C. cf. gomesi* e *C. pterostictum* e de menos de um milhão de anos para os cromossomos B de *Characidium oiticicai* (Capítulo 6), poderia se especular que os cromossomos supranumerários de *C. oiticicai* teriam se formado a muito mais tempo do que os B das outras duas espécies. Neste sentido, os cromossomos B de *C. oiticicai* poderiam ter

se originado seguindo o mesmo modelo dos eventos ocorridos em *C. cf. gomesi* e em *C. pterostictum* e acumulado muitas mutações que teriam determinado a ausência de homologia com os cromossomos do complemento A. No entanto, esta mesma falta de homologia entre estes elementos genômicos extras e os cromossomos do complemento A e, notadamente os cromossomos sexuais, também estariam indicando que outros eventos poderiam estar relacionados à formação ou a diferenciação destes cromossomos B no conjunto genômico de *C. oiticicai*.

### **Referências Bibliográficas**

As referências correspondentes a este capítulo encontram-se no final desta tese.

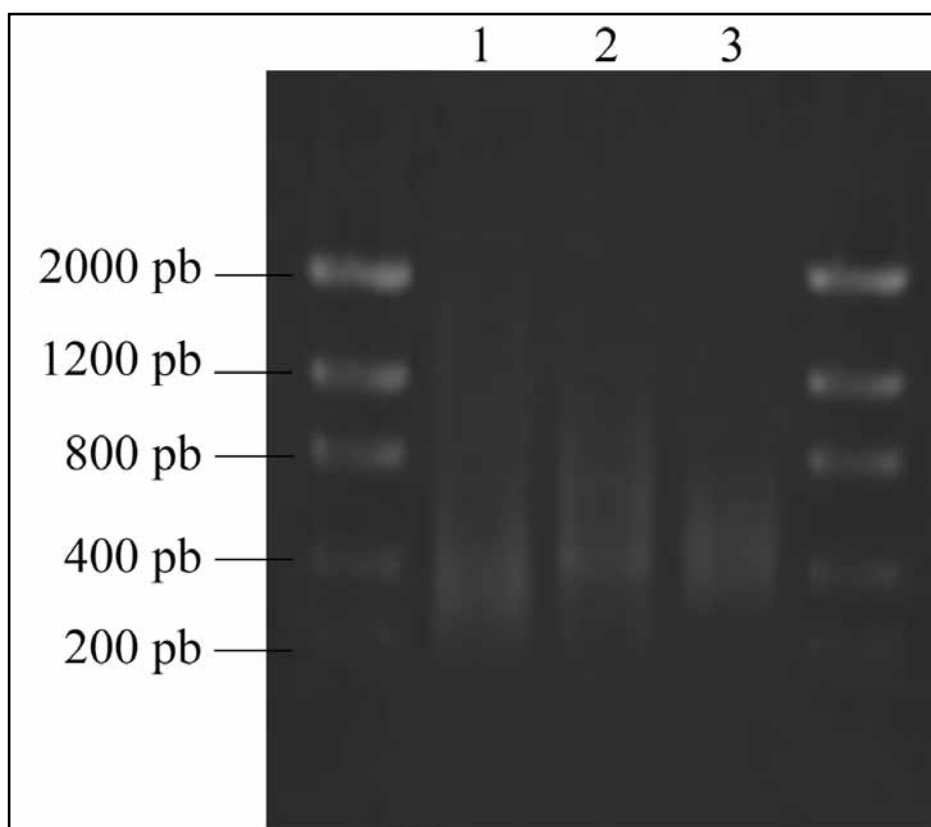


Figura 1: Amplificação do DNA microdissecado por DOP-PCR. Linha 1 corresponde ao DNA microdissecado dos cromossomos B de *Characidium cf. gomesi*, linha 2 ao DNA dos cromossomos B de *Characidium pterostictum* e a linha 3 correspondem ao DNA dos cromossomos B microdissecados de *Characidium oiticicai*.

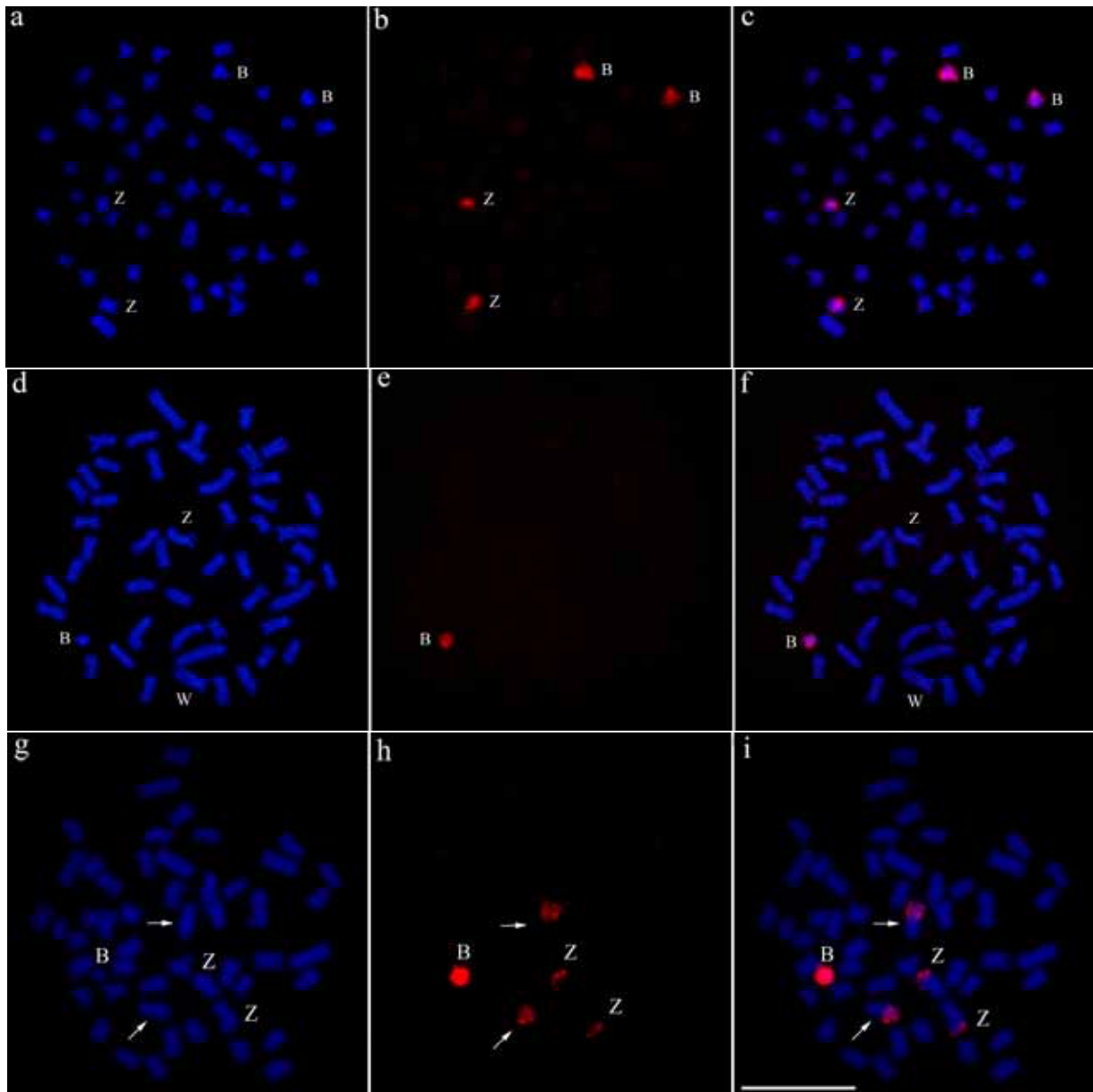


Figura 2. Pintura cromossômica em células mitóticas de *Characidium* usando as sondas produzidas por DOP-PCR. Cada metáfase pintada (c, f, i) é acompanhada por sua metáfase correspondente corada com DAPI (a, d, g) e após a hibridação das sondas (b, e, h). Em a, b e c, metáfases de exemplar macho de *Characidium cf. gomesi* após hibridação com a sonda CgB. Em d, e e f, metáfases de exemplar fêmea de *Characidium oiticicai* após hibridação com a sonda CoB. Em g, h e i, metáfases de exemplar fêmea de *Characidium pterostictum* após hibridação com a sonda CpB. Em g, h e i, setas indicam os cromossomos acrocêntricos. A barra representa 10  $\mu\text{m}$ .

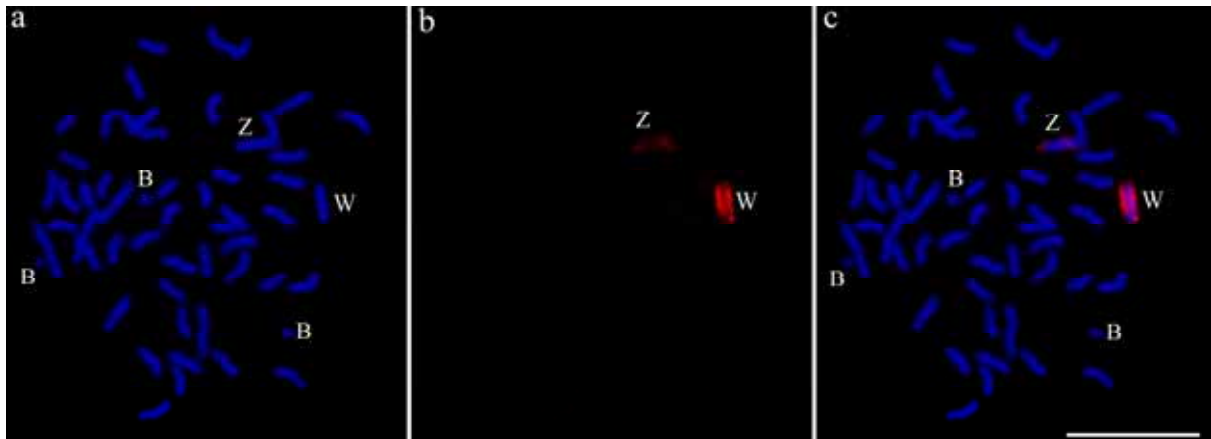


Figura 3: Metáfases evidenciando o padrão de hibridação em *Characidium oiticicai* com as sondas CgB e CpB. Note que apenas os cromossomos sexuais são marcados (b e c). A barra representa 10  $\mu\text{m}$ .

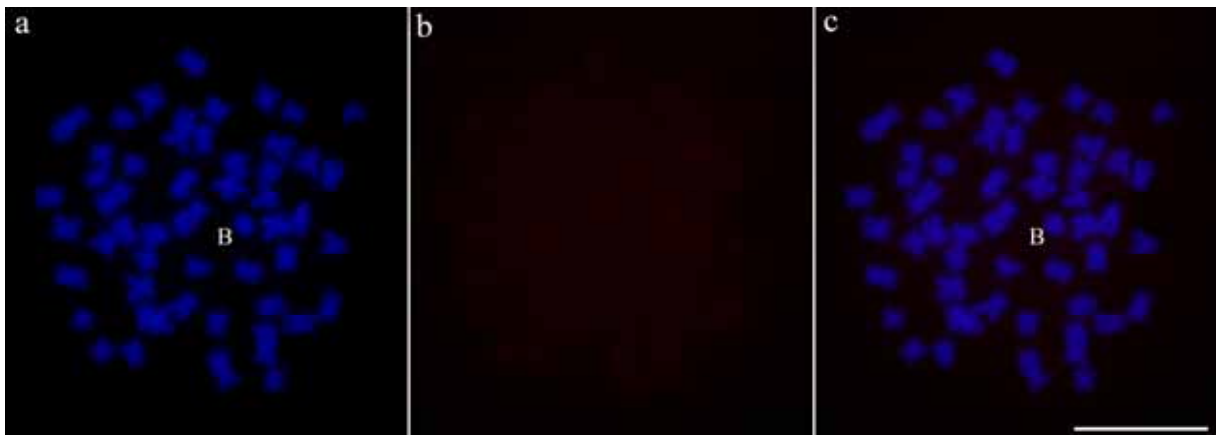


Figura 4: Metáfases evidenciando o padrão de hibridação em *Characidium pterostictum* e em *Characidium cf. gomesi* com a sonda CoB. Note que a sonda produzida a partir do cromossomo B de *Characidium oiticicai* não possui homologia com nenhuma região cromossômica (b e c). A barra representa 10  $\mu\text{m}$ .



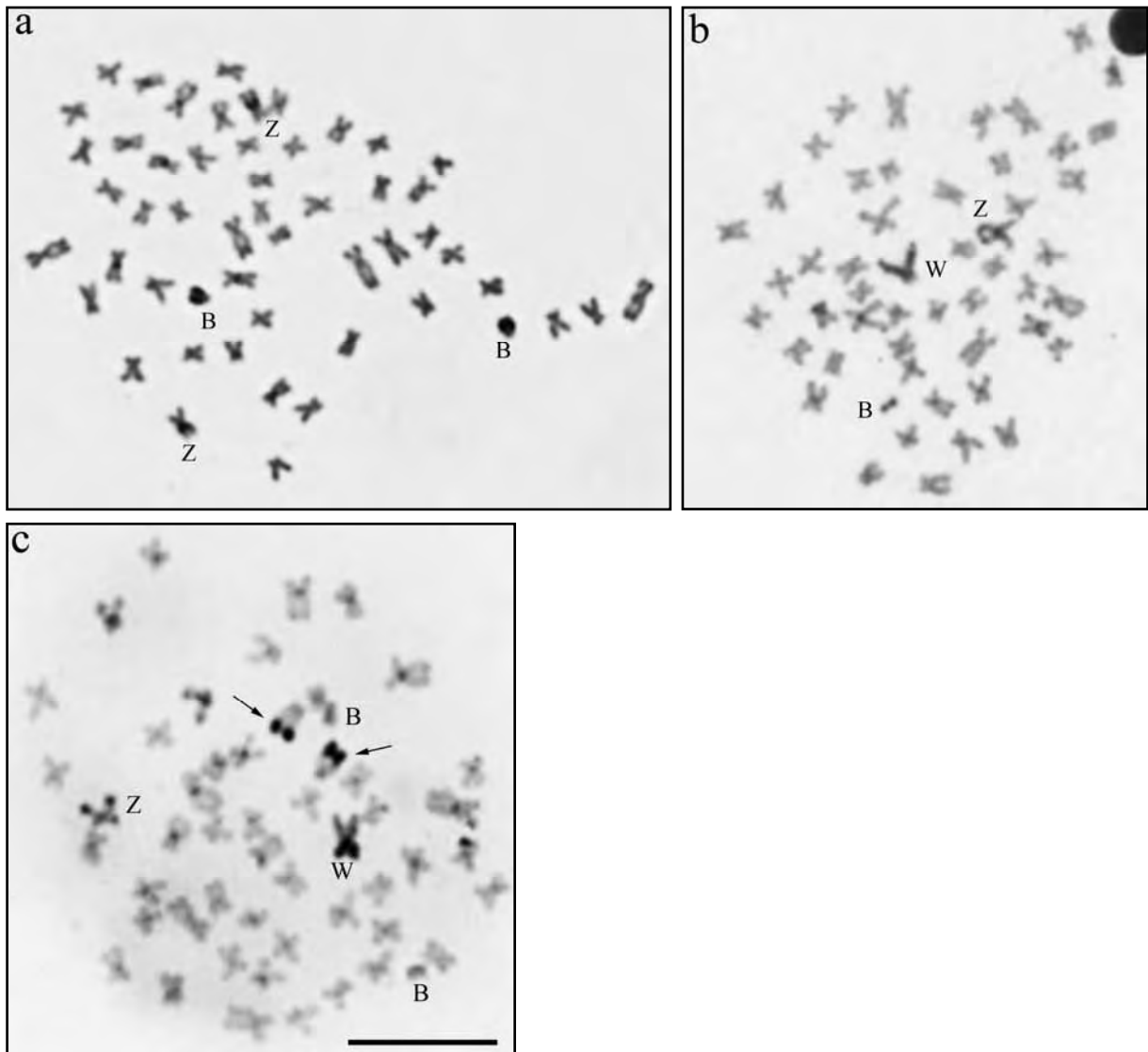


Figura 5: Metáfases após bandamento C evidenciando a natureza heterocromática dos cromossomos B e dos sexuais nas espécies de *Characidium* analisadas. Em a, *Characidium cf. gomesi*, em b, *Characidium oiticai* e em c, *Characidium pterostictum*. As setas em c indicam os cromossomos acrocêntricos. A barra representa 10 µm.

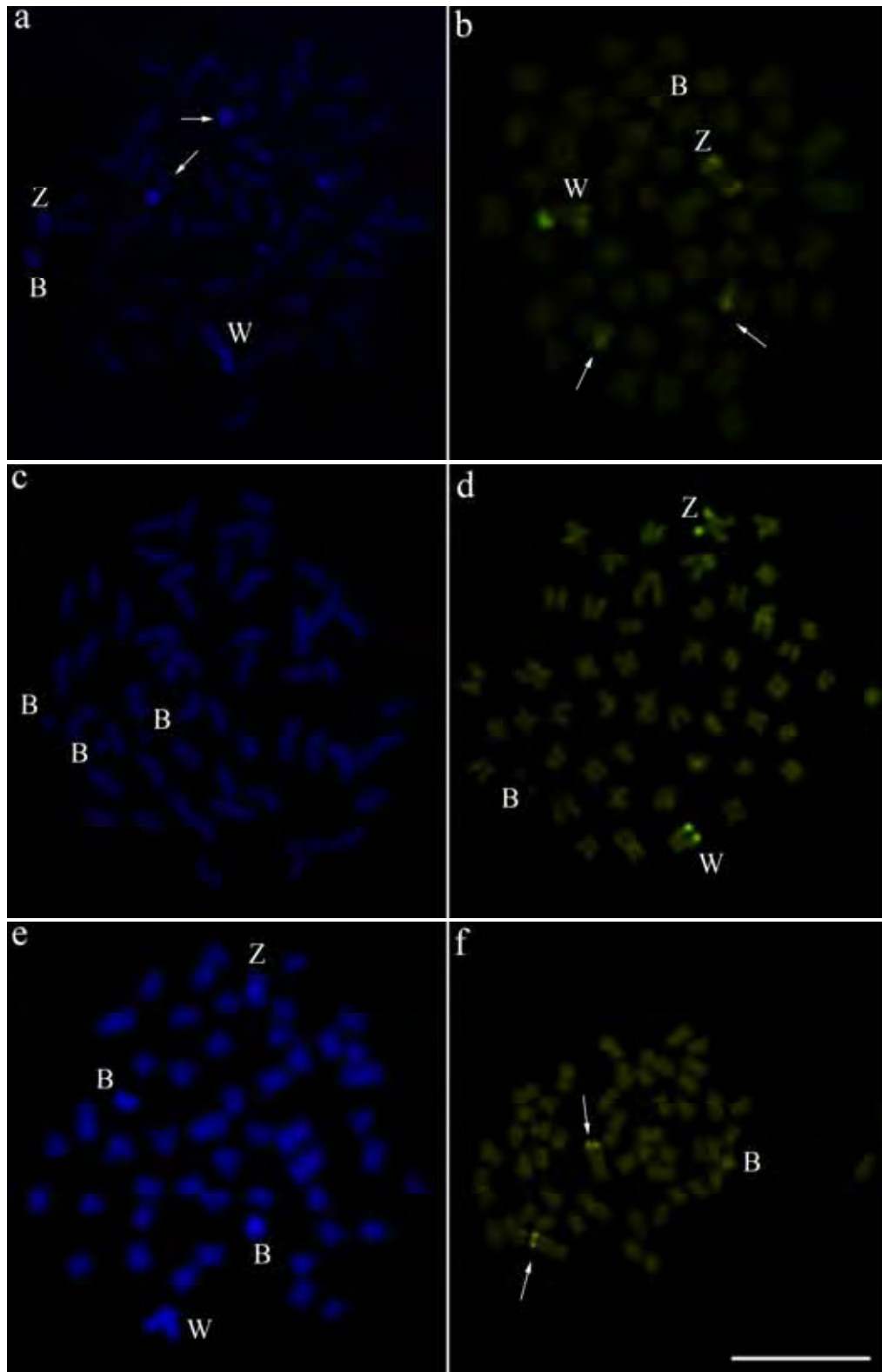


Figura 6: Metáfases de *Characidium* marcadas pelo fluorocromo DAPI e pelo fluorocromo CMA<sub>3</sub>. Em a e b, *Characidium pterostictum*. Em c e d, *Characidium oiticicai* e em e e f, *Characidium cf. gomesi*. Destaque para os cromossomos sexuais e para os cromossomos acrocêntricos (setas). A barra equivale a 10  $\mu$ m.

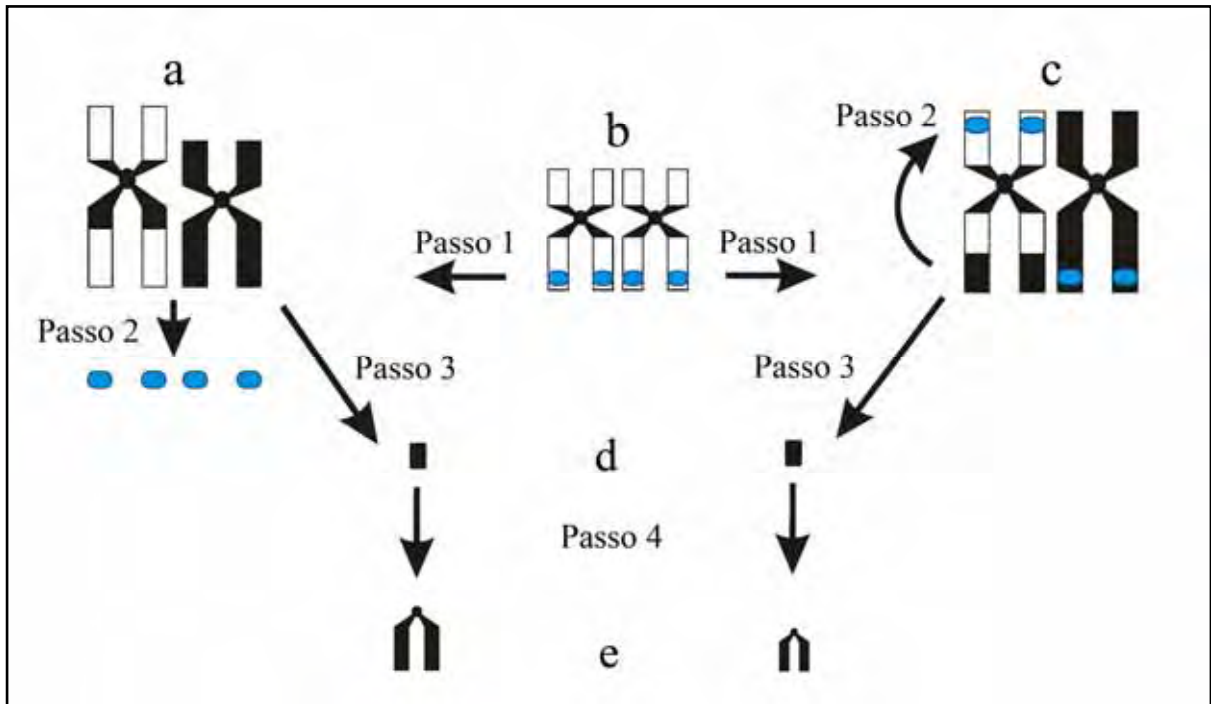


Figura 7: Hipótese para formação dos cromossomos B em *Characidium* a partir da diferenciação dos cromossomos sexuais. Em a, cromossomos sexuais ZW em *Characidium cf. gomesi*. Em b, provável par ancestral para os cromossomos sexuais em espécies de *Characidium*. Em c, cromossomos sexuais ZW em *Characidium pterostictum*. Em d, fragmentos cromossômicos resultantes dos rearranjos e em e, cromossomos B em *Characidium cf. gomesi* e em *C. pterostictum*, respectivamente. O passo 1, caracteriza a diferenciação e formação dos cromossomos sexuais nestas espécies a partir de um par ancestral homomórfico. O passo 2 representa os rearranjos cromossômicos que modificaram o posicionamento das RONS nestas espécies. O passo 3 caracteriza os fragmentos genômicos liberados junto ao conteúdo nuclear devido aos rearranjos estruturais ocorridos. O passo 4 representa a formação dos cromossomos B atuais por processos de amplificação do DNA, formação de novos centrômeros e telomerização da parte final destes elementos genômicos.

## **Capítulo 9**

**Diferenciação e evolução dos cromossomos sexuais no sistema ZZ-ZW em espécies de peixes do gênero *Characidium* (Osthariphisi, Crenuchidae): microdissecção do cromossomo W.**

**Resumo**

Tendo como característica básica um marcante conservadorismo da macro-estrutura cariotípica, com as espécies até agora estudadas apresentando um cariótipo com  $2n=50$  cromossomos, os peixes do gênero *Characidium* mostram, contudo, ampla variação em sua micro-estrutura cariotípica, com algumas espécies caracterizadas pela presença de cromossomos B e sistema heteromórfico de cromossomos sexuais do tipo ZZ-ZW, ao lado de espécies homogaméticas, sem sistemas de diferenciação cariotípica entre sexos. Os cromossomos heteromórficos Z e W observados em algumas espécies deste gênero apresentam características que os tornam muito interessantes para estudos relacionados à origem e diferenciação dos cromossomos sexuais em peixes. Neste sentido, o presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de testar a homologia do sistema ZZ-ZW dos cromossomos sexuais apresentados por nove espécies de *Characidium*, a relação destes cromossomos sexuais com o DNAr 18S e também com os cromossomos de uma espécie de *Characidium* que não possui sistema heteromórfico de diferenciação sexual. Para isso, experimentos com hibridação fluorescente *in situ* (FISH) foram realizados usando uma sonda produzida a partir do cromossomo W de *Characidium cf. gomesi*, obtida por microdissecção cromossômica e DOP-PCR. A sonda produzida, identificada como CgW, evidenciou sinais de hibridação nos cromossomos W de todas as espécies analisadas, caracterizando a existência de homologias entre os cromossomos sexuais existentes e uma possível origem comum deste sistema de diferenciação sexual. Por outro lado, em *Characidium cf. zebra*, espécie que não possui sistema ZZ-ZW de cromossomos sexuais, a hibridação *in situ* com a sonda CgW revelou apenas marcações teloméricas nos componentes do complemento cromossômico, apontando para a inexistência de homologia entre o cromossomo W e os cromossomos autossômicos desta espécie.

## Introdução

Muitos vertebrados têm a determinação genética do sexo baseada em cromossomos sexuais, diferenciados ou não. Estes sistemas representam os sistemas genéticos mais diversificados e com maior rapidez de evolução em toda a biologia (Namekawa e Lee, 2009). Os sistemas sexuais mais conhecidos são o sistema XX-XY (heterogametia masculina) dos mamíferos e o sistema ZZ-ZW (heterogametia feminina) das aves. Quando diferenciados, estes cromossomos sexuais são cromossomos altamente heteromórficos, sendo o X e Z caracterizados por possuírem geralmente maior tamanho e maior quantidade de genes e o Y e o W por serem de tamanho menor, altamente heterocromáticos e possuírem apenas um pequeno número de genes (Takehana *et al.*, 2008). No entanto, Nanda *et al.* (1999), relataram a inexistência de qualquer homologia entre os cromossomos humanos XY e os cromossomos ZW de galinhas, sugerindo diferentes origens evolutivas para os cromossomos sexuais em mamíferos e aves.

Dentre os vertebrados, os peixes representam o maior e mais diversificado grupo de organismos, com cerca de 28.000 espécies reconhecidas (Nelson, 2006). Esta diversidade também se aplica a seu processo de reprodução, com a ocorrência de diferentes mecanismos, incluindo gonocorismo, hermafroditismo e unissexualidade (Breder e Rosen, 1966; Price, 1984). No entanto, a determinação sexual poligênica, com cromossomos indiferenciados, parece ser um mecanismo comum para a maioria das espécies (Ohno, 1974). Apesar disso, existem várias espécies de peixes com sistemas cromossômicos de diferenciação sexual (Schartl, 2004), desde sistemas simples dos tipos XX-XY e ZZ-ZW, até raros casos de sistemas sexuais altamente diferenciados, com cromossomos sexuais múltiplos (Bertollo e Cavallaro, 1992).

A aplicação da técnica de hibridação fluorescente *in situ* com sondas para cromossomos específicos (pintura cromossômica), obtidas por microdissecção, tem se mostrado uma ferramenta importante para estudos de citogenética de peixes, oferecendo informações sobre a homologia dos cromossomos sexuais em espécies estreitamente relacionadas, como nos gêneros *Eigenmannia* (Henning *et al.*, 2008) e *Triphorteus* (Diniz *et al.*, 2008). Nos peixes do gênero *Characidium*, análises citogenéticas convencionais têm demonstrado a existência de um sistema sexual do tipo ZZ-ZW na maioria das espécies estudadas (Capítulos 1 e 2). Este sistema caracteriza-se por apresentar geralmente um cromossomo W totalmente heterocromático e um cromossomo Z com grandes blocos de heterocromatina pericentromérica e/ou intersticial em todas as espécies. No entanto,

diferenças no tamanho, morfologia e na distribuição da heterocromatina também são evidentes entre estes cromossomos Z e W, bem como também é evidente a presença de DNAr 18S associado aos cromossomos sexuais em algumas espécies. Neste sentido, o presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de testar a homologia dos componentes deste sistema ZZ-ZW de cromossomos sexuais, a relação destes cromossomos com o DNAr 18S e também com os cromossomos de uma espécie de *Characidium* que não possui sistema heteromórfico de diferenciação sexual.

### Material e Métodos

Foram analisadas dez espécies de peixes do gênero *Characidium*: *Characidium cf. zebra*, *Characidium oiticicai*, *Characidium lauroi*, *Characidium lanei*, *Characidium schubarti*, *Characidium pterostictum*, *Characidium alipioi*, *Characidium* sp1, *Characidium* sp2 e *Characidium* sp3, provenientes de diferentes bacias hidrográficas do Brasil, indicadas na Tabela 1. Nas preparações para obtenção de cromossomos mitóticos foram utilizados fragmentos de tecido renal e brânquias utilizando-se a técnica referida em Foresti *et al.* (1981). A marcação das RONS pelo nitrato de Prata seguiu a técnica proposta por Howell e Black (1980) e o bandamento C foi realizado seguindo o protocolo descrito por Sumner (1972). As regiões cromossômicas ricas em CG foram identificadas com a utilização do fluorocromo Cromomicina A<sub>3</sub> (Schweizer, 1976) e as regiões ricas em AT pelo fluorocromo DAPI (Schweizer *et al.*, 1978).

Para realização da técnica de microdissecção cromossômica, metáfases de *Characidium cf. gomesi* do ribeirão Alambari, SP, foram pingadas em lamínulas e coradas com Giemsa 5% por 5 minutos. O cromossomo W, facilmente identificado por apresentar uma nítida constrição secundária (Capítulo 7), foi microdissecado utilizando-se um microscópio invertido (Axiovert 100 - Zeiss) com micromanipulador acoplado portador de microagulha de vidro (5171-Eppendorf). Seis cromossomos W foram microdissecados e transferidos para um tubo de microcentrífuga contendo 9µL de mistura DOP-PCR (1µL de Thermo-sequenase tampão 1X, 1µL de dNTPs a 2mM, 2µL de primer DOP - 5' CCGACTCGAGNNNNNNATGTGG 3' (Telenius *et al.*, 1992) a 10µM e 5µL de água). O tubo de microcentrífuga foi aquecido a 90°C por 10 minutos para desnaturar proteínas cromossômicas e em seguida foi adicionado 1µL de Thermo-sequenase (USB). As reações de PCR foram realizadas usando um termociclador PTC-100TM (MJ Research, Inc). A amplificação inicial de produtos microdissecados (RAMP-PCR) foi realizada sob as seguintes

condições: 94°C por 3 minutos, 12 ciclos a 94°C por 1 minuto e 30 segundos; 37°C por 2 minutos, aumentando 0,2°C por segundo até 72°C e 72°C por 2 minutos, seguido de outros 30 ciclos de 94°C por 1 minuto e 30 segundos; 56°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e 30 segundos. Após a primeira reação de PCR, uma segunda reação padrão foi realizada para gerar um estoque de sonda. Esta segunda reação foi composta por 2,5µL Taqpolimerase tampão (10X), 2µL de MgCl (25mM), 2,5µL de dNTPs (2mM), 5µL de primer DOP (10µM), 0,25µL de Taqpolimerase (5U/µL), 2µL de DNA (produto da primeira reação de PCR) e 10,75µL de água para um volume final de 25µL. Os parâmetros para a reação foram: 90°C por 3 minutos, 30 ciclos a 90°C por 1 minuto e 30 segundos; 56°C por 1 minuto e 30 segundos e 72°C por 1 minuto e 30 segundos. Por último, uma terceira reação de PCR foi realizada para marcar os produtos microdissecados e amplificados. A reação de PCR foi composta por 5µL Taqpolimerase tampão (10X), 2µL de MgCl (25mM), 1,25µL de dATP (2mM), 1,25µL de dCTP (2mM), 1,25µL de dGTP (2mM), 0,8µL de dTTP (2mM), 0,7µL de digoxigenina-11-dUTP (1mM) (Roche Applied Science), 5µL de primer DOP (10µM), 0,5µL de Taqpolimerase (5U/µL), 3µL de DNA (produto da segunda reação de PCR) e 29,13µL de água para um volume final de 50µL. As etapas de amplificação foram às mesmas descritas para a reação anterior. Depois de cada PCR, os produtos das reações foram verificados em gel de agarose 1%, a fim de analisar o tamanho do fragmento. A sonda produzida foi denominada CgW.

Para a hibridação fluorescente *in situ* (FISH) os cromossomos metafásicos foram tratados de acordo com o procedimento descrito por Pinkel *et al.* (1986), com algumas modificações. Os sinais de hibridação da sonda CgW foram detectados usando anti-digoxigenina-rodamina. Foi utilizada também a sonda de DNAr 18S obtida do peixe *Prochilodus argenteus* (Hatanaka & Galetti Jr., 2004) que foi marcada com biotina 14-dATP por *nick translation*, seguindo as instruções do fabricante (Bionick Labelling System - Invitrogen). A detecção e amplificação do sinal de hibridação foram realizadas usando Avidina-fluoresceína conjugada (FITC) e anticorpo anti-avidina biotilado. Os cromossomos foram contracolorados com DAPI.

Os cromossomos metafásicos foram analisados em fotomicroscópio óptico (Olympus BX61) e as imagens foram capturadas com software Image Pro Plus, 6.0 (MediaCybernetics). A morfologia cromossômica foi determinada de acordo com a relação de braços estabelecida por Levan *et al.* (1964), os cromossomos foram classificados como metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a) e arranjados nos cariótipos em ordem decrescente de tamanho.



## Resultados

Os dados relacionados ao número diplóide, à distribuição da heterocromatina constitutiva e à localização das RONS em *C. alipioi*, *Characidium* sp2 e *Characidium* sp3 são apresentados pela primeira vez, enquanto que para as demais espécies, esses dados basearam-se nos resultados relatados no Capítulo 1.

A análise citogenética em *C. alipioi*, *Characidium* sp2 e *Characidium* sp3 evidenciou um número diplóide constante de  $2n=50$  cromossomos, com número fundamental de braços (NF) igual a 100 para indivíduos de ambos os sexos, além de sistema ZZ-ZW de cromossomos sexuais (Figuras 1 e 2). No entanto, foi detectada a presença de um cromossomo metacêntrico extra em todas as células de todos os indivíduos de *Characidium* sp3 (Figura 2). Para estas três espécies, blocos de heterocromatina constitutiva foram observados na região pericentromérica de todos os cromossomos, além de blocos periteloméricos e pericentroméricos nos cromossomos Z, sendo o cromossomo W totalmente heterocromático. O cromossomo extra de *Characidium* sp3 apresentou-se com blocos de heterocromatina periteloméricas e centroméricas (Figuras 1 e 2). As RONS foram localizadas em posição intersticial dos braços longos do par sete em *Characidium* sp3 e do par dezoito em *C. alipioi*. Já em *Characidium* sp2, as RONS foram observadas em posição final do braço curto do cromossomo W e em posição intersticial do braço longo de um dos homólogos do par sete (Figuras 1 e 2, em destaque). A marcação com o fluorocromo Cromomicina A<sub>3</sub> mostrou que as RONS, para todas as espécies, correspondem a frações de DNA ricas em pares de bases GC, assim como as regiões pericentroméricas de alguns cromossomos autossômicos (Figuras 3 e 4). Foram observadas também frações adicionais de DNA ricas em GC coincidentes com os blocos heterocromáticos dos pares acrocêntricos e também nos cromossomos Z e W da espécie *C. pterostictum*. No entanto, essas regiões CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> nesta espécie não correspondem à cístrons ribossomais (Figura 4b).

A amplificação do cromossomo W por DOP-PCR resultou em fragmentos de DNA com tamanhos que variam de 200 e 600pb (Capítulo 7). A hibridação da sonda CgW em preparações de cromossomos metafásicos em *C. lauroi*, *C. lanei*, *C. schubarti* e *Characidium* sp1 resultou em completa marcação no cromossomo W e sinais de hibridação na região pericentromérica e peritelomérica do cromossomo Z (Figura 5). Em *C. oiticicai*, a sonda marcou totalmente o cromossomo W e apenas a região pericentromérica do cromossomo Z (Figura 6). Em *C. pterostictum*, a sonda marcou totalmente o cromossomo W e apenas a

região peritelomérica do cromossomo Z, além de marcações nos cromossomos B e em posição intersticial do par acrocêntrico (Figura 7). Já em *Characidium* sp2, a sonda CgW marcou apenas a região pericentromérica dos cromossomos W e Z (Figura 8c). Em *Characidium* sp3 foram observados sinais de hibridação em parte do cromossomo W e na região pericentromérica do cromossomo Z (Figura 8f). Por fim, em *C. alipioi* apenas o cromossomo W apresentou sinais de hibridação (Figura 8i). Em *Characidium* cf. *zebra* os resultados com a sonda CgW foram negativos, não sendo evidenciados sinais de hibridação em nenhum cromossomo específico (Figura 9).

Já a sonda para o DNAr 18S evidenciou sinais de hibridação nos cromossomos sexuais de *C. oiticicai*, *C. lauroi*, *C. lanei*, *C. schubarti*, *C. pterostictum* e *Characidium* sp1 (Figura 10c). Em *C. alipioi* e *Characidium* sp2 o DNAr 18S foi observado apenas em pares autossômicos, sem relação com os cromossomos Z e W (Figura 10b). Em *Characidium* sp3, o DNAr 18S foi observado em posição final do braço curto do cromossomo W e em posição intersticial do braço longo de um dos homólogos do par sete (Figura 10a). Já *Characidium* cf. *zebra*, por sua vez, apresentou marcação para o DNAr 18S em posição intersticial dos braços longos do par 23 (Figura 10d).

### **Discussão**

Embora os estudos citogenéticos em espécies de peixes do gênero *Characidium* tenham evidenciado significativo aumento nos últimos anos, o presente trabalho fornece os primeiros dados comparativos através de microdissecção e pintura cromossômica sobre a diferenciação do sistema ZZ-ZW em dez espécies de peixes deste grupo. O cromossomo W de alguns representantes do gênero *Characidium* pode ser facilmente distinguido, tendo em vista que algumas espécies possuem uma incomum relação entre os cromossomos sexuais e as regiões organizadoras de nucléolo (Capítulos 1 e 2). Neste sentido, a presença de uma constrição secundária em cromossomos sexuais heteromórficos permite a distinção dos cromossomos Z e W, bem como a distinção destes com os cromossomos autossômicos, garantindo a correta identificação do cromossomo W (Capítulo 7).

Na maioria das espécies de *Characidium* analisadas, o cromossomo W e o cromossomo Z apresentaram sinais de hibridação com o uso da sonda CgW, apontando para a ocorrência de homologias entre eles. Tal situação corrobora uma hipótese anteriormente postulada (Capítulos 1 e 2), com base na similaridade morfológica e nos padrões de distribuição da heterocromatina constitutiva entre os cromossomos Z e W destas espécies. De

fato, os resultados apresentados sugerem que os cromossomos sexuais de *Characidium* apresentam uma possível origem comum. Este parece ser também o caso dos representantes do gênero *Triportheus*, no qual a presença de um sistema de cromossomos sexuais ZZ-ZW tem sido observada em todas as espécies analisadas, com a existência de um cromossomo W em distintas etapas de diferenciação e com o cromossomo Z apresentando significativa homologia em diferentes espécies (Artoni *et al.*, 2001; Diniz *et al.*, 2008). No entanto, os mecanismos de origem e evolução independentes dos cromossomos sexuais em grupos de peixes diretamente relacionados caracterizam-se como um evento comum (Devlin & Nagahama, 2002), como observado em representantes do gênero *Eigenmannia* (Henning *et al.*, 2008), *Oryzias* (Takehana *et al.*, 2007) e alguns gêneros de salmão (Phillips *et al.*, 2001; Woram *et al.*, 2003), grupos nos quais não é observada homologia entre os cromossomos sexuais existentes, apontando para uma origem independente destes sistemas.

Apesar de a sonda CgW evidenciar sinais de hibridação na maioria dos cromossomos Z e W das espécies estudadas, estes cromossomos podem diferir tanto em relação à distribuição e composição da heterocromatina, quanto em relação ao tamanho e morfologia dos cromossomos, apontando para uma participação dinâmica do processo evolutivo na reformulação da estrutura destes cromossomos (Vicari *et al.*, 2008). A heterocromatina presente nos cromossomos sexuais de algumas espécies e populações mostra-se heterogênea em sua composição, sendo visíveis segmentos ricos em pares de base AT por quase toda extensão do W e em grandes blocos no Z e também blocos GC positivos em posição coincidente com as RONS (Figuras 3 e 4). Realmente, as RONS têm sido caracterizadas como regiões ricas em segmentos GC em vertebrados inferiores, como anfíbios (Schmid, 1980) e em diversas espécies de peixes (Amemiya e Gold, 1986; Phillips *et al.*, 1988; Galetti Jr. e Rasch, 1993; Vicari *et al.*, 2005). No entanto, blocos heterocromáticos ricos em GC podem não estar relacionados à ocorrência de cístrons ribossomais (Artoni *et al.*, 1999; Margarido e Galetti Jr., 2000). Em espécies como *C. pterostictum*, além dos blocos das RONS, alguns blocos de heterocromatina dos cromossomos sexuais (Figura 4b) também possuem afinidade pelo fluorocromo CMA<sub>3</sub>, sugerindo a co-existência de frações ricas em pares de bases GC e AT nos cromossomos Z e W desta espécie, independente do posicionamento das RONS (Capítulo 4).

Os resultados obtidos pela hibridação com a sonda CgW indicam que os cromossomos Z e W de *C. alipioi* e *Characidium* sp2 são os que se apresentam em estágios mais avançados de diferenciação. *C. alipioi* apresenta o maior cromossomo W entre todas as espécies analisadas, bem como o menor cromossomo Z, que não apresenta homologia com a sonda

CgW (Figura 8i). Já *Characidium* sp2 foi a espécie que apresentou seus cromossomos Z e W com menor homologia com a sonda CgW, sendo visíveis apenas sinais de hibridação em regiões pericentroméricas (Figura 8c). É provável que regiões próximas à região hibridada nos cromossomos sexuais em *Characidium* sp2, bem como boa parte do cromossomo Z de *C. alipioi*, apesar de se manterem heterocromáticas, tenham sofrido modificações na composição do material genético em relação ao cromossomo sexual ancestral. Esta situação indicaria que, para o gênero *Characidium*, estaria ocorrendo um processo de diversificação conjunta dos cromossomos sexuais Z e W, diferentemente do que parece ocorrer em espécies de *Triportheus* (Artoni *et al.*, 2001; Diniz *et al.*, 2008).

Já o cromossomo extra evidenciado em todas as células de todos os indivíduos analisados na amostra de *Characidium* sp3 poderia caracterizar a existência de um sistema múltiplo de cromossomos sexuais nesta espécie, pois sua morfologia metacêntrica e seu padrão de heterocromatinização são similares ao cromossomo W (Figura 2). No entanto, a inexistência de homologia deste cromossomo extra com a sonda CgW indicaria que, com os dados existentes, seria mais plausível caracterizá-lo como B do que como sexual (Figura 8f). Somente a análise de mais representantes, incluindo dados meióticos dos indivíduos desta população de *Characidium* poderão revelar a real condição deste cromossomo extra observado.

A diferenciação morfológica dos cromossomos Z e W das espécies de *Characidium* estudadas estaria diretamente relacionada à diminuição da taxa de recombinação, condição para a fixação de alelos cromossomo-específicos. A recombinação cromossômica seria inibida pela ocorrência de inversões (Dobzhansky e Epling, 1948), translocações e também pelo acúmulo de heterocromatina (Griffin *et al.*, 2002) e, como consequências da inibição do processo de recombinação, ocorreria a ampliação da região não-recombinante e perda de conteúdo gênico no cromossomo sexo-específico (Charlesworth e Charlesworth, 2000). Contudo, não estaria claro ainda se o processo de heterocromatinização destes cromossomos caracterizar-se-ia como causa ou consequência da inibição de recombinação (Charlesworth *et al.*, 1994).

Por outro lado, uma característica relevante para a diferenciação morfológica dos cromossomos Z e W dentro do gênero *Characidium* refere-se à localização do DNAr 18S associado aos cromossomos sexuais em algumas espécies. O surgimento das RONS nos cromossomos Z e W teria possivelmente ocorrido antes do processo de diferenciação dos cromossomos sexuais nestas espécies, sendo anterior até mesmo aos eventos de heterocromatinização deste par de cromossomos (Capítulos 1 e 2), como observado em alguns

representantes do gênero *Triportheus* (Artoni *et al.*, 2002). A utilização da sonda CgW e da sonda para DNAr 18S simultaneamente em experimentos de FISH-duplo (Figura 10), evidenciou a relação específica das RONS com os cromossomos sexuais na maioria das espécies estudadas, corroborando os dados anteriormente obtidos pelo bandamento-C sequencial à impregnação pelo nitrato de Prata. Neste sentido, apesar da diferenciação morfológica dos cromossomos Z e W estarem diretamente relacionada com a diminuição da taxa de recombinação (Charlesworth e Charlesworth, 2000), os cromossomos sexuais portadores de RONS de algumas espécies e populações de *Characidium* apresentariam ainda regiões recombinantes, representadas pelos segmentos nucleolares ativos, permitindo, ao menos de maneira parcial, a ocorrência de trocas cromossômicas. De fato, as espécies de *Characidium* que apresentam seus cromossomos sexuais mais diversificados morfológicamente, não apresentam RONS associadas. Por outro lado, nas espécies cujo DNAr está associado aos cromossomos sexuais, estes se apresentam morfológicamente mais semelhantes, possivelmente por não haver inibição total de recombinação durante a prófase meiótica (Charlesworth, 2004).

A análise citogenética de espécies relacionadas à *Characidium zebra* caracteriza-se como um ponto de partida significativo para o posicionamento de quaisquer eventos relacionados à evolução cariotípica dentro do gênero *Characidium*, pois, com relação às características morfológicas esta espécie é considerada basal na filogenia de *Characidium*, apresentando diversos caracteres plesiomórficos (Buckup, 1993). Dessa forma, a inexistência de sinais de hibridação com a sonda CgW em cromossomos de *Characidium cf. zebra*, bem como a similaridade na estrutura cariotípica entre todas as espécies analisadas e a homologia existente entre os cromossomos Z e W, poderiam ser indicativos de que a origem e diferenciação do sistema heteromórfico de cromossomos sexuais em espécies de *Characidium* caracterizar-se-ia como um evento recente, numa condição que já é característica dos peixes (Charlesworth, 2004), que geralmente apresentam grande nível de homologia entre os cromossomos X e Y ou Z e W.

Apesar da hibridação com a sonda CgW não revelar homologias com os cromossomos de *Characidium cf. zebra*, poderia ser assumido que a formação dos cromossomos sexuais no gênero *Characidium* possivelmente ocorreu a partir do processo de heterocromatinização de um par cromossômico ancestral desta espécie. A ocorrência de DNAr junto aos cromossomos sexuais da maioria das espécies analisadas, apontam o par 23 (portador de DNAr em *C. cf. zebra*), como o candidato mais parcimonioso para representar o par cromossômico sexual ancestral em *Characidium*. Desta forma, na Figura 11, nós resumimos os caminhos

hipotéticos para a diferenciação dos cromossomos sexuais a partir de um par homórfico ancestral em espécies deste gênero. O processo de inserção de elementos genéticos de transposição e/ou amplificação de sequências repetitivas em regiões eucromáticas do par 23 de *C. cf. zebra*, ou até mesmo a evolução *in situ* de função de determinação sexual, representaria um mecanismo inicial de diferenciação molecular de um dos homólogos do *proto* par sexual ancestral, desencadeando um processo de diferenciação cromossômica. A progressão da diferenciação partiria de uma pequena região modificada para um estágio considerado mais avançado, em que os cromossomos portadores de determinantes sexuais mostrar-se-iam parcial ou inteiramente heterocromáticos. Em um segundo momento, destacasse o processo de heterocromatinização destes cromossomos e outros possíveis rearranjos estruturais, associados a eventos geográficos que culminaram com a formação atual das principais bacias hidrográficas brasileiras. A contínua diferenciação destes cromossomos, agora sexuais, em algumas populações geograficamente isoladas, representaria a causa das modificações e da fixação de diferentes fenótipos relacionadas às RONS e aos cromossomos Z e W nas espécies de *Characidium* atualmente conhecidas. Neste sentido, o processo de heterocromatinização modificou estruturalmente o posicionamento das RONS e, em alguns casos, possivelmente determinou o deslocamento dos cístrons ribossômicos de suas posições originais, possivelmente numa tentativa de evitar sua inativação (Capítulo 2).

As particularidades apresentadas pelos cromossomos Z e W entre as espécies de *Characidium* evidenciam que estes cromossomos passaram por distintos processos de diferenciação ao longo de sua história evolutiva. Tendo em vista que estas espécies estão localizadas em diferentes regiões geográficas, o isolamento entre as bacias hidrográficas ou mesmo entre tributários de uma mesma bacia pode ter favorecido a evolução diferencial e a fixação de diferentes características entre os cromossomos sexuais das espécies analisadas. Neste sentido, os dados apresentados, além de apontarem para uma origem comum dos cromossomos sexuais em *Characidium*, também identificam a existência de processos dinâmicos de diferenciação agindo sobre estes cromossomos, nos representantes deste gênero de peixes.

### **Referências Bibliográficas**

As referências correspondentes a este capítulo encontram-se no final desta tese.

Tabela 1: Exemplares de *Characidium* analisados neste estudo. F: fêmeas e M: machos

Espécies	Localidade	F	M	Coordenadas
<i>C. lanei</i>	córrego Cari - Morretes - PR	11	7	S 25°26'29" W 48°32'28"
<i>C. lauroi</i>	rio Grande - Ubatuba - SP	4	1	S 23°23'42" W 45°07'17"
<i>C. oiticicai</i>	rio Paraitinga - Salesópolis - SP	15	5	S 23°30'40" W 45°51'32"
<i>C. pterostictum</i>	rio Betari - Apiaí - SP	15	5	S 24°33'03" W 48°40'49"
<i>C. schubarti</i>	rio Cinco Réis - Jaguariaiva - PR	10	7	S 25°17'46" W 49°44'56"
<i>C.cf. zebra</i>	rio Paraitinga - Salesópolis - SP	12	7	S 23°30'40" W 45°51'32"
<i>Characidium</i> sp1	rio Preto - Itanhaém - SP	18	8	S 24°10'39" W 46°50'56"
<i>Characidium</i> sp2	rio Vermelho - Tangará da Serra - MT	6	2	S 14°35'25" W 57°42'35"
<i>Characidium</i> sp3	rio Arinos - Nova Mutum - MT	6	-	S 13°48'03" W 56°01'38"
<i>C. alipioi</i>	rio Pomba - Santa Bárbara do Tugúrio - MG	7	3	S 21°14'79" W 43°34'12"

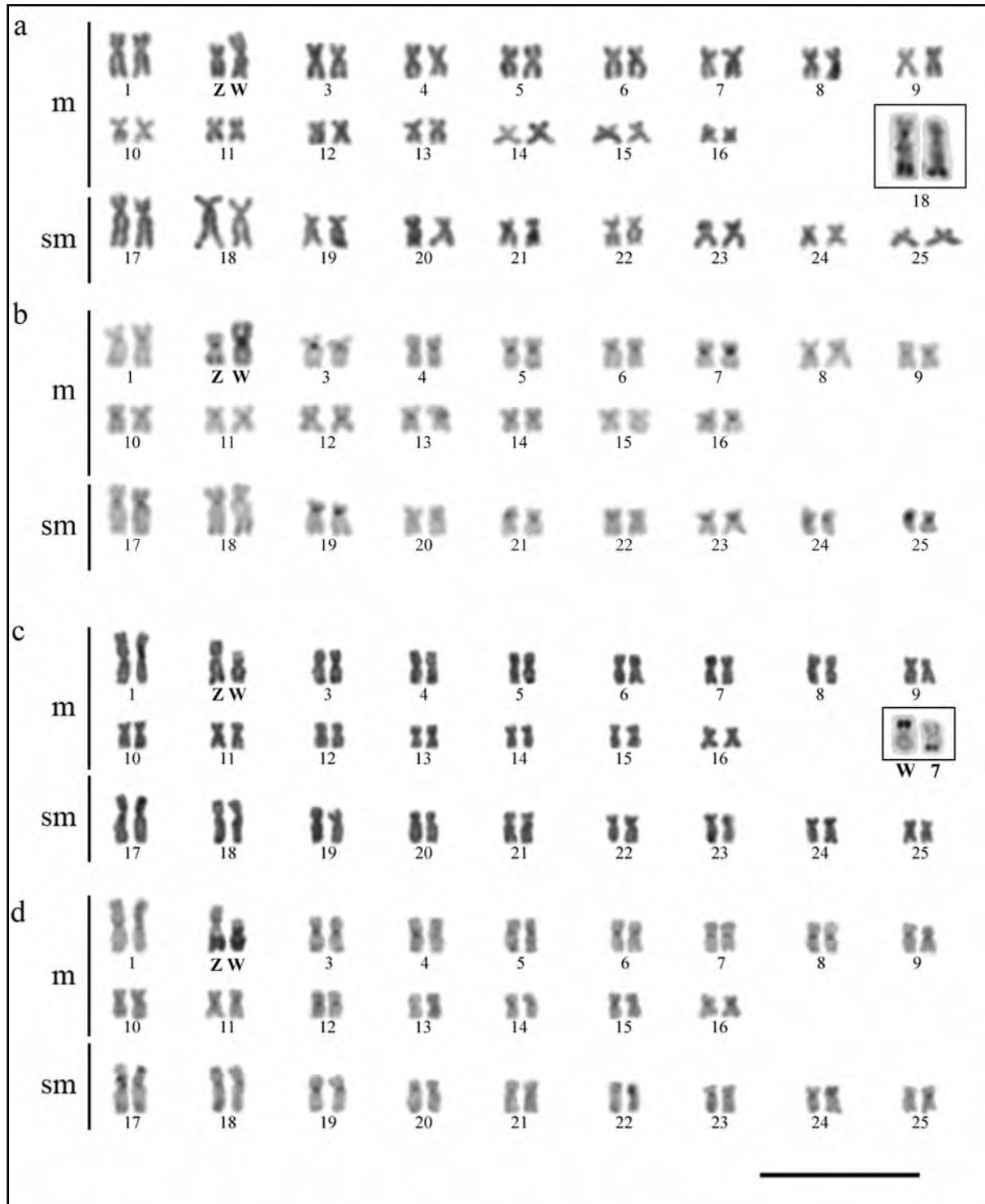


Figura 1: Cariótipos de exemplar fêmea de *Characidium alipioi* de Santa Bárbara do Tugúrio de e *Characidium sp2* de Tangará da Serra após coloração convencional por Giemsa (a, c) e bandamento C (b, d). Em destaque os cromossomos portadores das RONS. A barra equivale a 10  $\mu\text{m}$ .



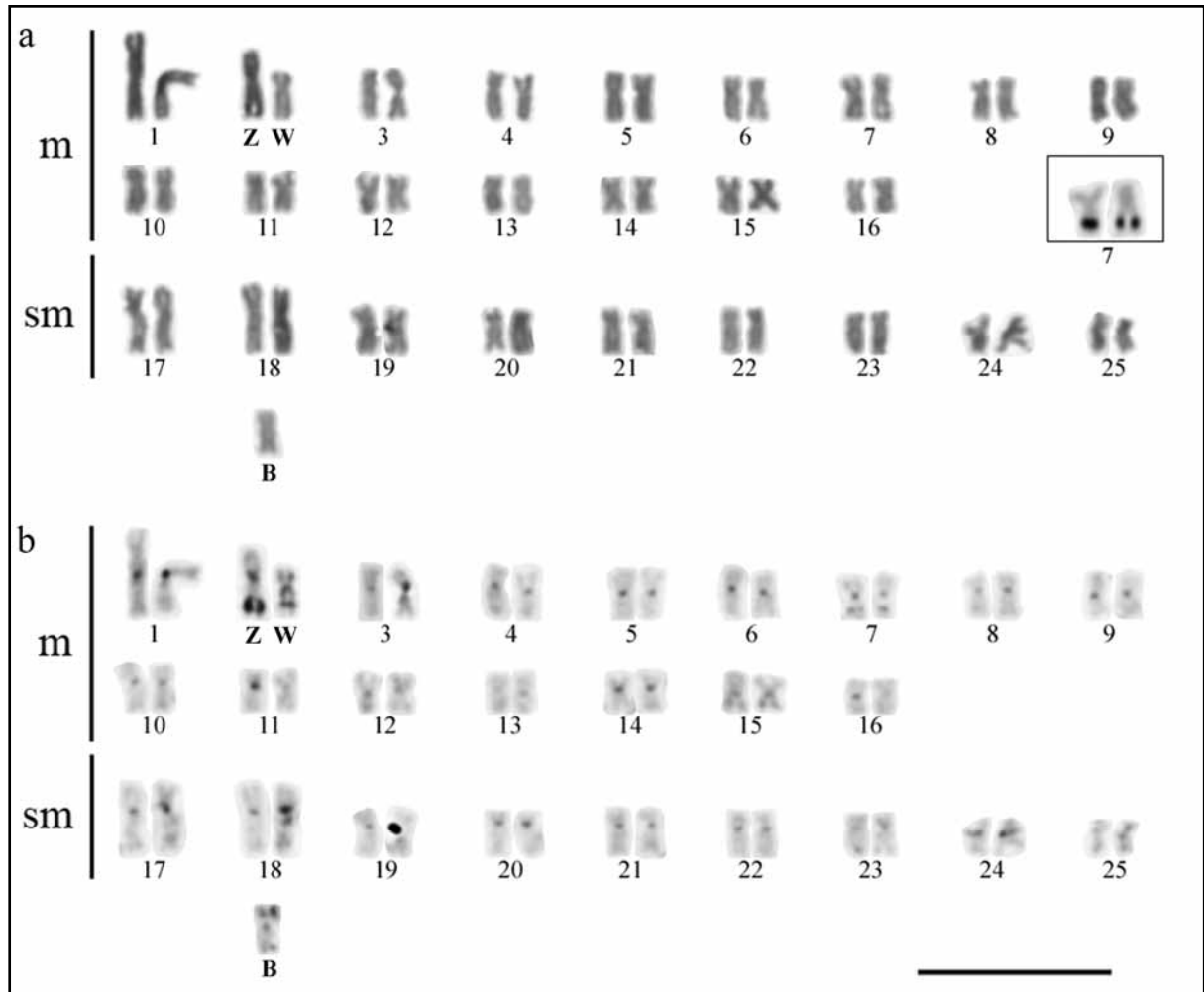


Figura 2: Cariótipos de exemplar fêmea de *Characidium* sp3 de Nova Mutum após coloração convencional por Giemsa (a) e bandamento C (b). Em destaque os cromossomos portadores das RONS. A barra equivale a 10 μm.

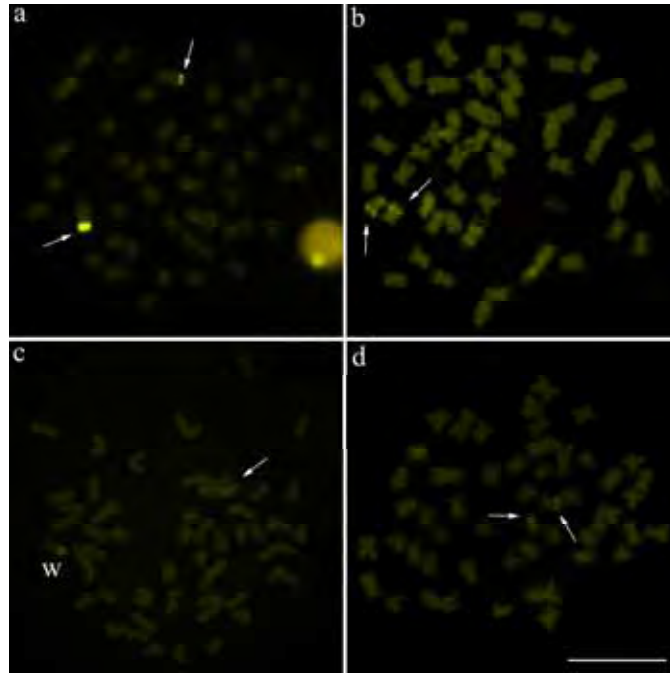


Figura 3: Metáfases de *Characidium* após tratamento com o fluorocromo Cromomicina A<sub>3</sub>. Em a, *C. alipioi*, em b, *Characidium* sp3, em c, *Characidium* sp2 e em d, *Characidium* cf. *zebra*. As setas indicam os cromossomos com sítios CG positivos.

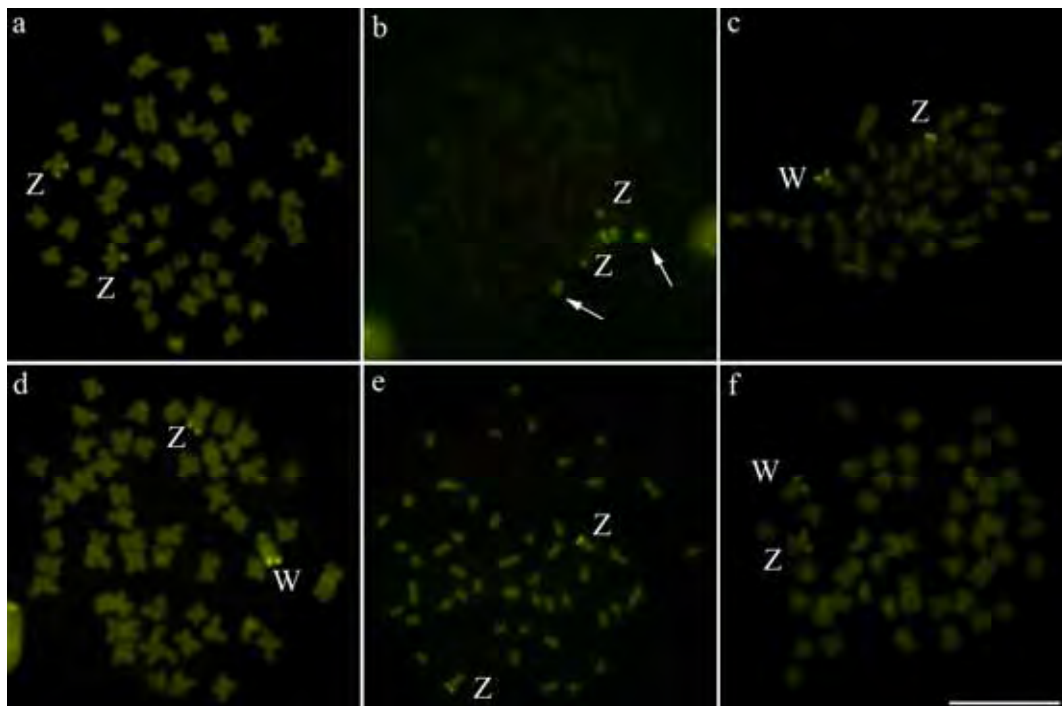


Figura 4: Metáfases de *Characidium* após tratamento com o fluorocromo Cromomicina A<sub>3</sub>. Em a, *C. lanei*, em b, *Characidium pterostictum*, em c, *Characidium oiticicai*, em d, *Characidium lauroi*, em e, *Characidium schubarti* e em f, *Characidium* sp1. Nestas espécies, os sítios CG positivos estão nos cromossomos sexuais. Note que em *C. pterostictum* (b), os sítios CG positivos estão presentes nas duas extremidades dos cromossomos sexuais e também no par acrocêntrico. A barra representa 10µm.

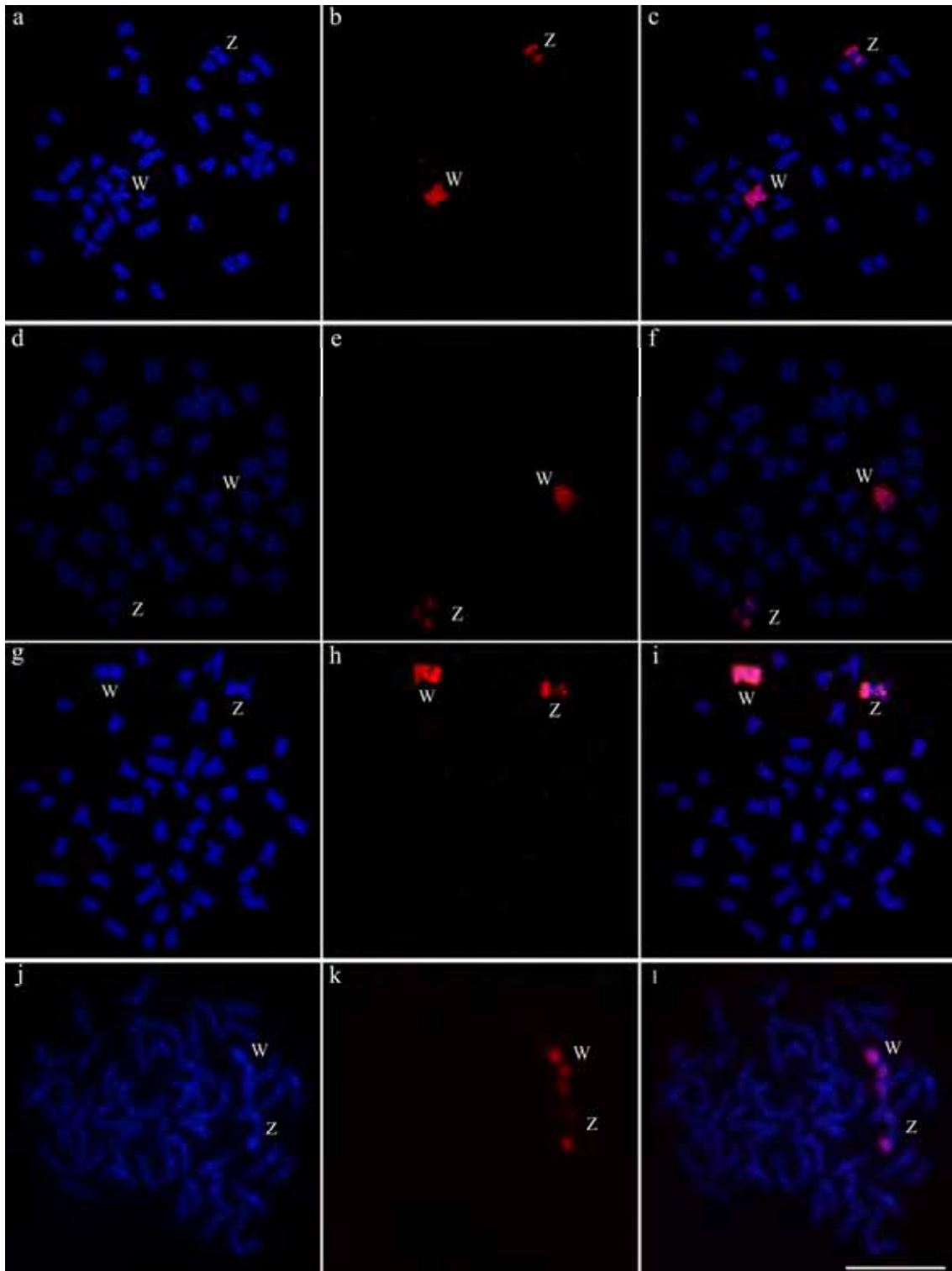


Figura 5: Pintura cromossômica em células mitóticas de exemplares fêmeas de *Characidium* usando a sonda CgW obtida por microdissecção e DOP-PCR. Cada metáfase pintada (c, f, i, l) é acompanhada por sua metáfase correspondente corada com DAPI (a, d, g, j) e após a hibridação das sondas (b, e, h, k). Em a, b e c, metáfases *Characidium lanei*, em d, e e f, metáfases de *Characidium lauroi*, em g, h e i, metáfases de *Characidium schubarti* e em j, k e l, metáfases de *Characidium* sp1. Observe os cromossomos W totalmente hibridizados e os cromossomos Z com sinais de hibridação pericentroméricos e periteloméricos. A barra representa 10  $\mu$ m.

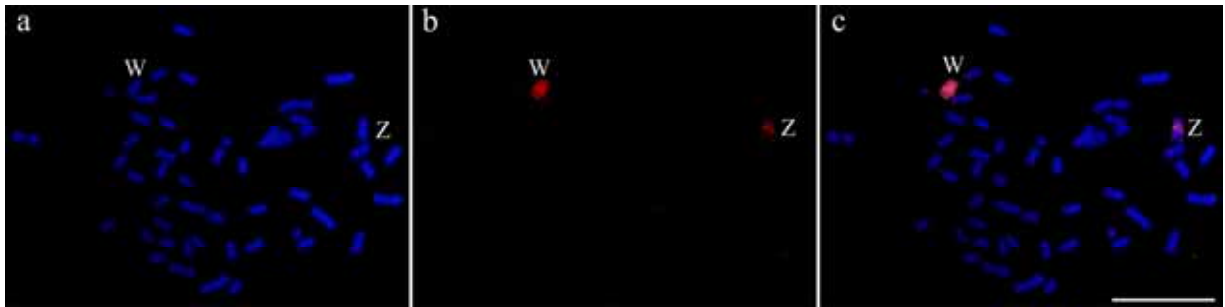


Figura 6: Pintura cromossômica em células mitóticas de exemplar fêmea de *Characidium oiticicai* usando a sonda CgW obtida por microdissecção e DOP-PCR. A metáfase pintada (c) é acompanhada por sua metáfase correspondente corada com DAPI (a) e após a hibridação da sonda CgW (b). Observe o cromossomo W totalmente hibridizado e o cromossomo Z com sinais de hibridação mais evidentes próximos ao centrômero. A barra representa 10  $\mu$ m.

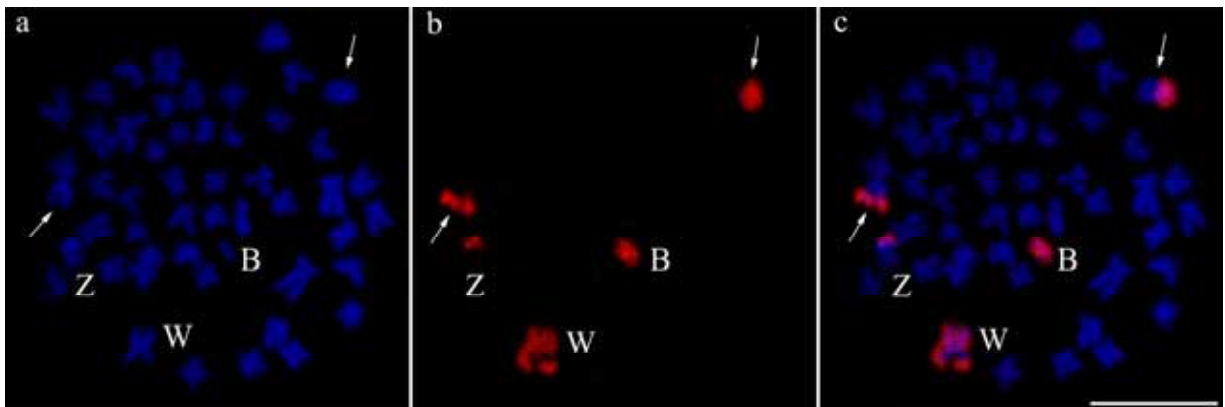


Figura 7: Pintura cromossômica em células mitóticas de exemplar fêmea de *Characidium pterostictum* usando a sonda CgW obtida por microdissecção e DOP-PCR. A metáfase pintada (c) é acompanhada por sua metáfase correspondente corada com DAPI (a) e após a hibridação da sonda CgW (b). Observe o cromossomo W totalmente hibridizado e o cromossomo Z com sinais de hibridação apenas em sua região peritelomérica. A sonda CgW também hibridou sobre o cromossomo B e sobre as regiões heterocromáticas do par acrocêntrico (setas). A barra representa 10  $\mu$ m.

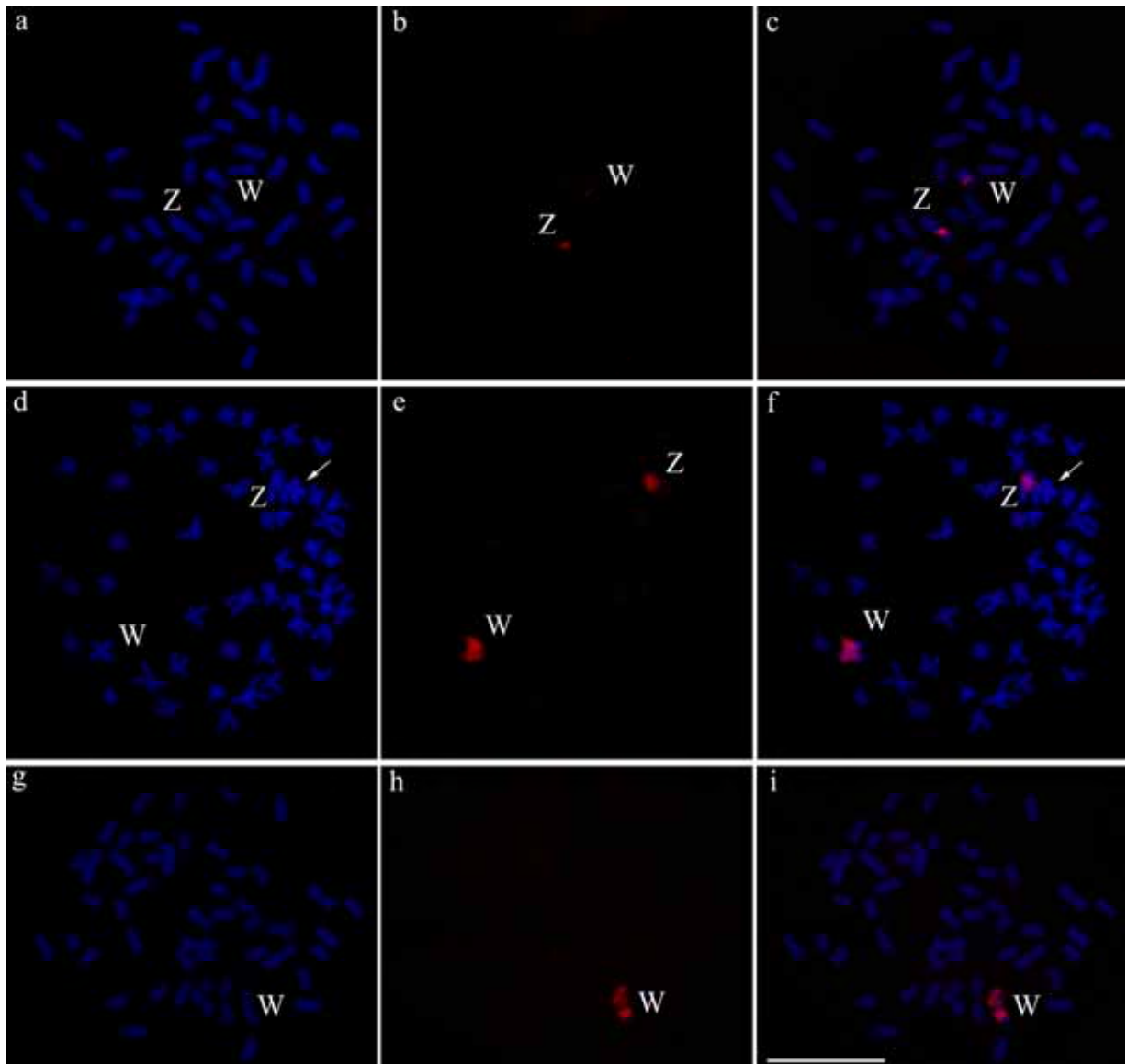


Figura 8: Pintura cromossômica em células mitóticas de exemplares fêmeas de *Characidium* usando a sonda CgW obtida por microdissecção e DOP-PCR. Cada metáfase pintada (c, f, i) é acompanhada por sua metáfase correspondente corada com DAPI (a, d, g) e após a hibridação das sondas (b, e, h). Em a, b e c, metáfases de *Characidium* sp2, em d, e e f, metáfases de *Characidium* sp3 e em g, h e i, metáfases de *Characidium alipioi*. Observe que em *Characidium* sp2 (c) a sonda CgW hibrida apenas as regiões centroméricas do Z e do W. Em *Characidium* sp3 (f), a sonda hibrida a região pericentromérica do Z e quase que totalmente o W. O cromossomo extra indicado pela seta em d e f, não apresenta sinais de hibridação. Já em *Characidium alipioi* (i), apenas o cromossomo W apresenta sinais de hibridação. A barra representa 10 μm.

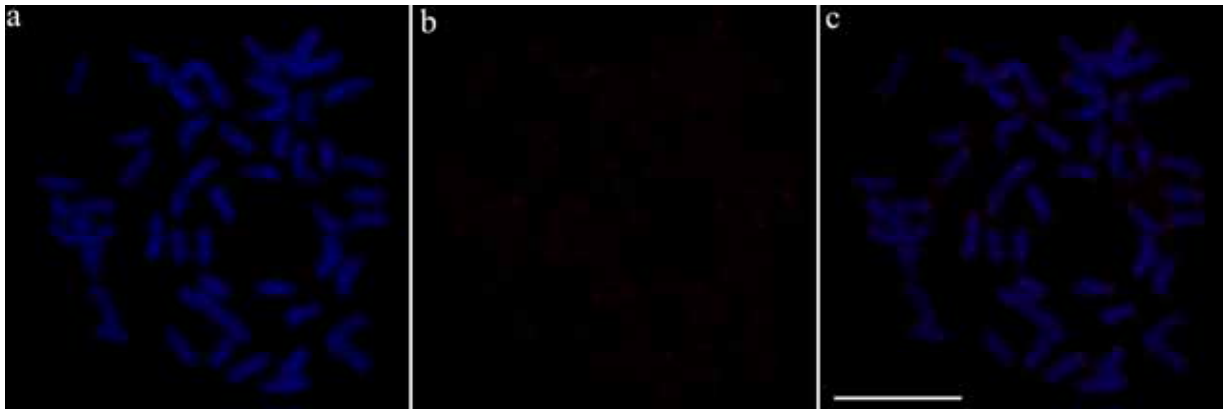


Figura 9: Pintura cromossômica em células mitóticas de exemplar fêmea de *Characidium cf. zebra* usando a sonda CgW obtida por microdissecção e DOP-PCR. A metáfase pintada (c) é acompanhada por sua metáfase correspondente corada com DAPI (a) e após a hibridação da sonda CgW (b). Observe que não há sinais de hibridação em nenhum cromossomo específico. A barra representa 10  $\mu\text{m}$ .

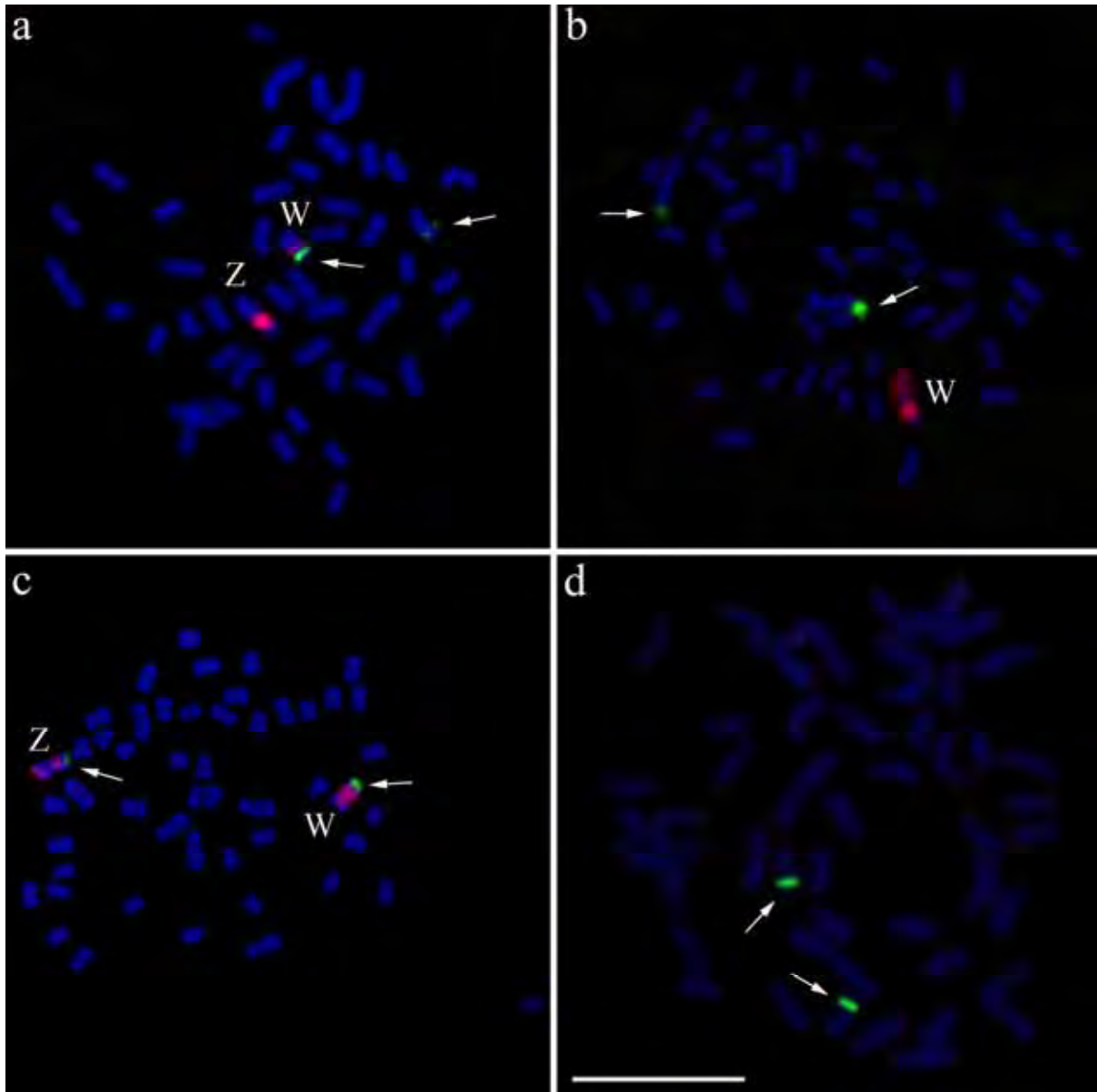


Figura 10: Metáfases de exemplares fêmeas de *Characidium* após a hibridação simultânea com as sondas CgW e 18S. Observe que em *Characidium* sp2 (a), o DNAr 18S (corado com avidina FITC) está presente junto ao cromossomo W (corado com anti digoxigenina rodamina) e junto a um cromossomo autossômico (seta). Já em *Characidium alipioi* (b), o DNAr 18S está localizado no par autossômico 18, sem associação com os cromossomos sexuais. Em c, metáfase de *Characidium schubarti* que representa o padrão observado em várias outras espécies. Neste caso, o DNAr 18S está alocado junto aos cromossomos sexuais Z e W. Em d, metáfase de *Characidium cf. zebra*, apontando a inexistência de cromossomos sexuais diferenciados e os sítios de DNAr 18S junto aos cromossomos do par 23. A barra representa 10 µm.

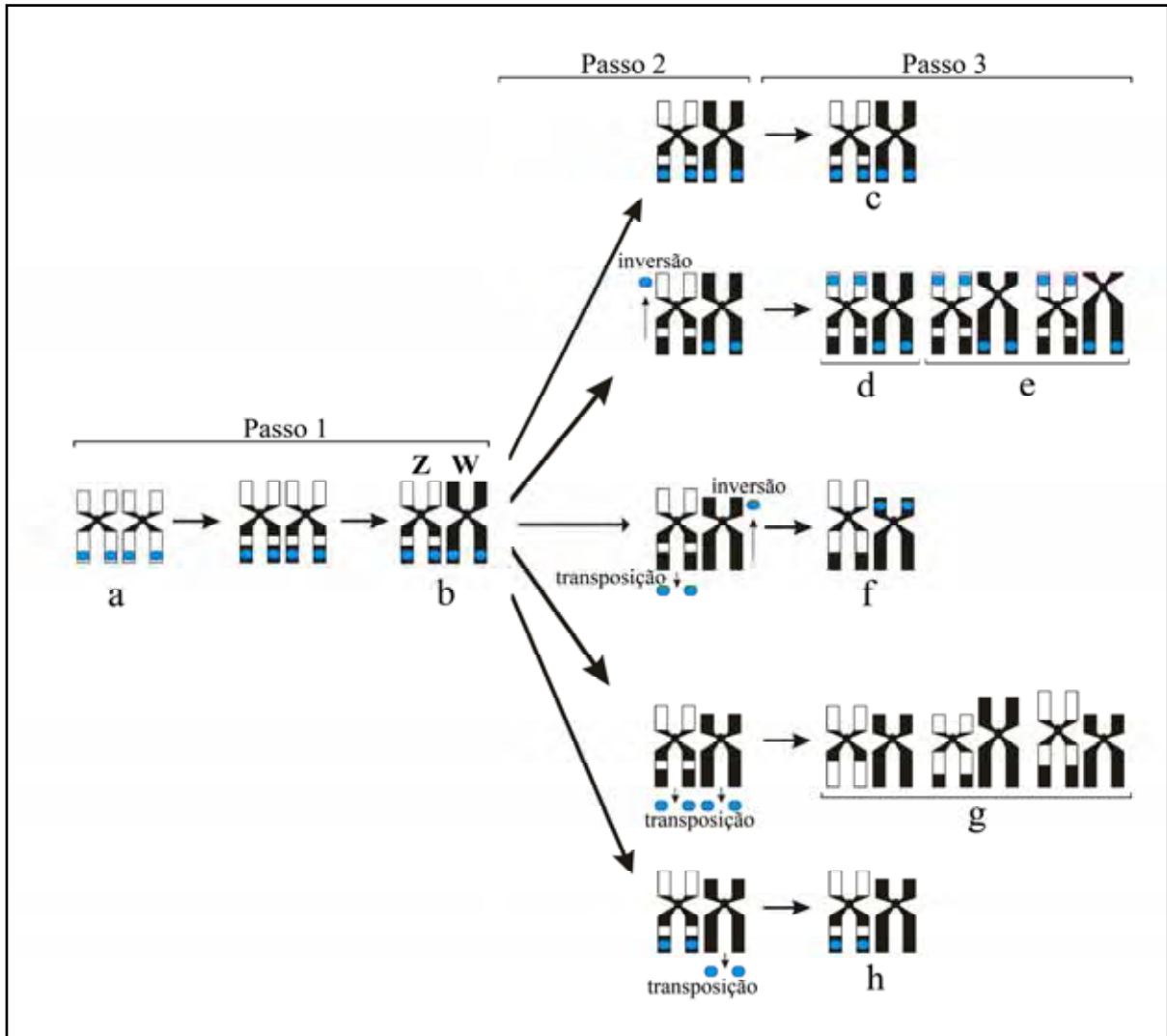


Figura 11: Diferenciação dos cromossomos sexuais em espécies de *Characidium*: O passo 1 representa um mecanismo inicial de diferenciação molecular de um dos homólogos do proto par sexual ancestral (a) que possivelmente desencadeou um processo de diferenciação cromossômica. A progressão da diferenciação partiria de uma pequena região modificada para um estágio considerado mais avançado, em que os cromossomos portadores de determinantes sexuais mostrar-se-iam parcial ou inteiramente heterocromáticos (b). O passo 2 representa as modificações estruturais relacionadas ao posicionamento das RONS ocorridas de maneira independente em diferentes espécies e populações. O passo 3 representa a contínua diferenciação dos cromossomos Z e W em algumas espécies e populações. Em c, cromossomos sexuais ZW em *Characidium cf. gomesi* da bacia do Tietê (Capítulo 7). Em d, cromossomos sexuais ZW em *Characidium pterostictum*, *Characidium lanei*, *Characidium schubarti* e *Characidium* sp1. Em e, cromossomos sexuais em *Characidium oiticicai* e *Characidium lauroi*, respectivamente. Em f, cromossomos sexuais em *Characidium* sp2. Em g, cromossomos ZW em *Characidium cf. gomesi* da bacia do rio Grande (Capítulo 7), em *Characidium alipioi* e *Characidium* sp3, respectivamente. Em h, cromossomos sexuais em *Characidium cf. gomesi* da bacia do rio Paranapanema (Capítulo 7).



### Considerações finais

Os estudos citogenéticos desenvolvidos em diferentes espécies e populações do gênero *Characidium* trouxeram significativas informações relacionadas à evolução cromossômica neste gênero. Os representantes deste grupo de peixes apresentam número diplóide de  $2n=50$  cromossomos, com cariótipos constituídos principalmente de cromossomos dos tipos metacêntrico e submetacêntrico. No entanto, esse conservadorismo no número diplóide não reflete a acentuada diversidade existente na microestrutura dos cariótipos observada nas diferentes espécies e populações. Estudos anteriores já indicavam a importância da heterocromatina como elemento primordial no processo de diferenciação cromossômica, fato este comprovado pelos dados obtidos no presente trabalho.

A análise citogenética convencional (Giemsa, RONS e banda C) mostrou a existência de dois grupos de cariótipos nas espécies analisadas, identificados com relação a diferentes conteúdos e distribuição da heterocromatina constitutiva. Um dos grupos é formado por *Characidium lagosantensis* (Miyazawa e Galetti Jr. 1994) e pelas populações de *Characidium cf. zebra* que apresentaram heterocromatina restrita à região pericentromérica de todos os cromossomos e ausência de sistema ZZ-ZW de cromossomos sexuais. O segundo grupo é formado por um conjunto de espécies que evidenciam grandes blocos heterocromáticos intersticiais e/ou terminais e um sistema cromossômico de diferenciação sexual do tipo ZZ-ZW, além da heterocromatina pericentromérica observada nos cromossomos dos representantes do primeiro grupo.

Neste último grupo, a heterocromatinização parcial ou até mesmo total observada em um dos cromossomos do par sexual, o cromossomo W, é uma característica comum a todas as espécies analisadas. No entanto, o padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva observada neste cromossomo sexual, assim como em alguns pares de autossomos, indica que ocorreram eventos de diferenciação cromossômica posteriores ao surgimento do sistema cromossômico sexual ancestral. Algumas espécies de *Characidium* apresentaram ainda sítios de DNAr 18S associados aos cromossomos sexuais Z e W, enquanto outras apresentaram sítios de DNAr 18S em cromossomos autossômicos e ausentes no par sexual ZW. A origem das RONS nos cromossomos Z e W possivelmente ocorreu antes do processo de diferenciação dos cromossomos sexuais nestas espécies, sendo anterior até mesmo aos eventos de heterocromatinização deste par de cromossomos. A utilização da sonda CgW e da sonda para DNAr 18S simultaneamente em experimentos da técnica de hibridação *in situ* fluorescente com marcadores duplos (*double-FISH*), evidenciou a relação específica das RONS com os

cromossomos sexuais na maioria das espécies estudadas, corroborando os dados anteriormente obtidos pelo bandamento C sequencial à impregnação pelo nitrato de Prata. Neste sentido, apesar da diferenciação morfológica dos cromossomos Z e W estarem diretamente relacionadas com a diminuição da taxa de recombinação, os cromossomos sexuais portadores de RONS de algumas espécies e populações de *Characidium* apresentaram ainda regiões recombinantes, representadas pelos segmentos nucleolares ativos, permitindo, ao menos de maneira parcial, a ocorrência de trocas cromossômicas. De fato, as espécies de *Characidium* que apresentaram seus cromossomos sexuais mais diversificados morfológicamente, não apresentaram RONS associadas. Por outro lado, nas espécies cujo DNAr está associado aos cromossomos sexuais, estes apresentaram-se morfológicamente mais semelhantes e as pequenas diferenças possivelmente ocorreram por não haver inibição total de recombinação durante a prófase meiótica.

Apesar da hibridação com a sonda CgW não ter revelado homologies com os cromossomos de *Characidium cf. zebra*, foi assumido que a formação dos cromossomos sexuais no gênero *Characidium* possivelmente ocorreu a partir do processo de heterocromatinização de um par cromossômico ancestral desta espécie. A ocorrência de DNAr junto aos cromossomos sexuais da maioria das espécies analisadas, apontou o par 23 (portador de DNAr em *C. cf. zebra*), como o candidato mais parcimonioso para representar o par cromossômico sexual ancestral em *Characidium*. Desta forma, o processo de inserção de elementos genéticos de transposição e/ou amplificação de sequências repetitivas em regiões eucromáticas do par 23 de *C. cf. zebra*, ou até mesmo a evolução *in situ* de função de determinação sexual, representou um mecanismo inicial de diferenciação molecular de um dos homólogos do *proto* par sexual ancestral, desencadeando um processo de diferenciação cromossômica. A progressão da diferenciação partiu de uma pequena região modificada para um estágio considerado mais avançado, em que os cromossomos portadores de determinantes sexuais mostraram-se parcial ou inteiramente heterocromáticos. Em um segundo momento, destacou-se o processo de heterocromatinização destes cromossomos e outros possíveis rearranjos estruturais, associados a eventos biogeográficos que culminaram com a formação atual das principais bacias hidrográficas brasileiras que determinaram o isolamento parcial ou total das espécies e populações. A contínua diferenciação destes cromossomos, agora sexuais, em algumas populações geograficamente isoladas, representou a causa das modificações e da fixação de diferentes fenótipos relacionadas às RONS e aos cromossomos Z e W nas espécies de *Characidium* atualmente conhecidas. Neste sentido, o processo de heterocromatinização

modificou estruturalmente o posicionamento das RONS e, em alguns casos, o deslocamento dos cístrons ribossômicos de suas posições originais possivelmente evitou a sua inativação.

A origem e diferenciação dos cromossomos B em *C. cf. gomesi* e em *C. pterostictum* possivelmente ocorreu a partir de rearranjos cromossômicos envolvendo os cromossomos sexuais e as regiões organizadoras de nucléolo, com posterior amplificação do DNA em algumas regiões dos cromossomos B ancestrais. *Characidium cf. gomesi* e *C. pterostictum* possuem populações com e sem cromossomos B, bem como populações com polimorfismos no posicionamento e localização do DNAr 18S. Tendo em vista que a evolução dos cromossomos sexuais a partir de um par homomórfico portador de DNAr caracterizou-se como um evento basal para o gênero *Characidium*, o processo de diferenciação a que estes cromossomos sexuais estão submetidos possivelmente levou à total heterocromatinização do cromossomo W e de partes do Z, ocasionando a perda de conteúdo gênico nos cromossomos sexo-específicos e a ocorrência de polimorfismos estruturais. Como um dos mecanismos que possibilitaram evitar a inativação dos genes ribossomais alocados no cromossomo Z e no W, os segmentos genômicos responsáveis por esta característica devem ter passado por rearranjos ou foram transpostos para outros cromossomos.

Para explicar a origem independente dos cromossomos B em *Characidium*, assumindo o mecanismo descrito numa hipótese alternativa já postulada (Foresti, 1998), processos normais de síntese do material genômico nas células ou no processo de reorganização estrutural dos cromossomos das espécies possibilitariam a liberação de elementos genômicos, dando formação a pequenos fragmentos adicionais que ficaram a deriva no conteúdo nuclear, seguindo processos naturais de manutenção ou desmanche. Seguidos processos de formação de novos centrômeros, telomerização da parte final destes elementos genômicos e amplificação do DNA, culminariam com a formação dos cromossomos B atualmente existentes. A análise da heterocromatina dos cromossomos B por fluorocromos base-específicos parece corroborar esta hipótese, tendo em vista que a heterocromatina de *C. cf. gomesi* e *C. pterostictum* apresenta-se heterogênea em sua composição, sendo visíveis segmentos ricos em pares de base AT, mas também blocos intercalados GC positivos, característica que também é comum aos cromossomos sexuais destas espécies, que se mostram com regiões DAPI positivas co-existindo com frações de DNA ricas em pares de bases GC.

Por outro lado, o mesmo processo ocorrido em *Characidium cf. gomesi* e *C. pterostictum* pode ter ocasionado a formação dos cromossomos B em *Characidium oiticicai*. Se considerarmos que os dados da filogenia molecular apontam que estes elementos

supranumerários possuem uma origem recente em espécies de peixes do gênero *Characidium*, de menos de 250000 anos para os cromossomos B de *C. cf. gomesi* e *C. pterostictum* e de menos de um milhão de anos para os cromossomos B de *Characidium oiticicai*, poderia se especular que os cromossomos supranumerários de *C. oiticicai* teriam se formado há muito mais tempo do que os B das outras duas espécies. Neste sentido, os cromossomos B de *C. oiticicai* poderiam ter se originado dos mesmos eventos ocorridos em *C. cf. gomesi* e em *C. pterostictum* e acumulado mutações que fariam com que ele não tivesse mais homologia com os cromossomos do complemento A. No entanto, esta mesma falta de homologia entre estes elementos genômicos extras e os cromossomos do complemento A, notadamente os sexuais, também estariam indicando que outros eventos poderiam estar relacionados à formação e à diferenciação destes cromossomos B no conjunto genômico de *C. oiticicai*.

O mapeamento cromossômico dos genes de DNAr 5S em representantes do gênero *Characidium* evidenciou que o padrão de distribuição mais comum é a ocorrência de um único par de cromossomos envolvido na localização destes genes, embora a população de *Characidium cf. gomesi* do rio Tietê e duas populações de *Characidium cf. zebra* apresentaram mais de um par cromossômico portador de DNAr 5S, indicando diversificação posterior. Apesar dessa família gênica estar localizada preferencialmente em apenas um par cromossômico, característica comum entre os vertebrados, os cromossomos portadores deste DNAr apresentam morfologia diferente, indicando que rearranjos estruturais estejam relacionados com a dinâmica evolutiva deste gene em espécies de *Characidium*. De qualquer forma, em todas as espécies e populações analisadas, o DNAr 5S foi localizado em posição intersticial em compartimentos cromossômicos distintos do DNAr 18S, corroborando a situação mais frequentemente observada em vertebrados, na qual estes dois genes possivelmente seguem padrões evolutivos independentes.

Já o DNAr 18S foi localizado junto aos cromossomos sexuais Z e W na maioria das espécies e populações analisadas, confirmando a existência de apenas um *locus* para essa família gênica na maioria das espécies. No entanto, em espécies capturadas em riachos litorâneos, estes genes apresentaram-se em posição invertida neste par de cromossomos sexuais, indicando que processos de modificação estrutural ocorridos durante a evolução e diversificação dos cromossomos sexuais possivelmente determinaram o posicionamento destas sequências. Numa hipótese para explicar a dinâmica do processo de diferenciação a que estes cromossomos heteromórficos estão envolvidos, supõem-se que, inicialmente, este segmento de DNAr se reorganizou e se manteve, mesmo que na forma invertida, no par cromossômico original, agora chamado ZW. Um próximo passo evolutivo poderia determinar

a saída destes genes para outros cromossomos do lote autossômico, que se apresentariam meioticamente mais estáveis. Por outro lado, deve também ser considerado que, com a manutenção destes cístrons ribossomais junto aos cromossomos sexuais, sua atividade gênica poderia atuar no sentido de facilitar a permuta genética entre os homólogos heteromórficos e, ao mesmo tempo, manter uma certa frequência de permuta genética entre estes cromossomos.

Os estudos cromossômicos no gênero *Characidium* evidenciaram características particulares para cada espécie e/ou população analisada. Apesar dos dados citogenéticos indicarem uma conservação do número diplóide ( $2n=50$  cromossomos), observou-se uma extensa variação cariotípica entre as espécies, seja no posicionamento das RONS, existência de cromossomos sexuais em diferentes estágios de diversificação, presença de cromossomos B e até de casos de poliploidia. As características particulares existentes nas espécies e populações analisadas possivelmente estão diretamente relacionadas a uma elevada taxa de mutação cromossômica, bem como a alguns aspectos relacionados ao modo de vida e à distribuição geográfica dos representantes deste grupo, que facilitariam a fixação de novas variantes cromossômicas.

## 5 Referências Bibliográficas

- Abuín M, Martínez P, Sánchez L. Localization of the repetitive telomeric sequence (TTAGGG)<sub>n</sub> in four salmonid species. *Genome*. 1996; 39: 1035-1038.
- Affonso PRAM, Galetti Jr. PM. Chromosomal diversification of reef fishes from genus *Centropyge* (Perciformes, Pomacanthidae). *Genetica*. 2005; 123: 227-233.
- Almeida-Toledo LF, Foresti F, Toledo-Filho SA. An early stage of sex chromosome differentiation in the fish *Eigenmannia virescens* (Sternopygidae). *Genome*. 1988; v30 (1, Suppl): 132.
- Almeida Toledo LF, Foresti F, Toledo-Filho SA. Karyotypic evolution in Neotropical freshwater fish. *In* *Chromosome Today*. 2000a; 13: 169-182.
- Almeida Toledo LF, Foresti F, Daniel MFZ, Toledo-Filho SA. Sex chromosome evolution in fish: the formation of the neo-Y chromosome in *Eigenmannia* (Gymnotiformes). *Chromosoma*. 2000b; 109: 197-200.
- Almeida-Toledo LF, Foresti F. Morphologically differentiated sex chromosomes in Neotropical freshwater fish. *Genetica*. 2001; 111: 1-3.
- Almeida-Toledo LF, Foresti F, Péquignot EV, Daniel-Silva MFZ. XX:XY Sex chromosome system with X heterochromatinization: an early stage of sex chromosome differentiation in the neotropic electric eel *Eigenmannia virescens*. *Cytogenetics and Cell Genetics*. 2001; 95: 73-78.
- Alvarez L, Evans JW, Wilks R, Lucas JN, Brown JM, *et al.* Chromosomal radiosensitivity at intrachromosomal telomeric sites. *Genes Chromosomes Cancer*. 1993; 8: 8-14.
- Amemiya CT, Gold JR. Chromomycin A<sub>3</sub> stains nucleolus organizer regions of fish chromosomes. *Copeia*. 1986; 1986(1): 226-231.
- Amores A, Martinez G, Reina J, Alvarez MC. Karyotype, C-banding, and Ag-silver NOR analysis of *Diplodus bellottii* (Sparidae, Perciformes): Intra-individual polymorphism involving heterochromatic regions. *Genome*. 1993; 36: 672-675.
- Andreatta AA, Almeida-Toledo LF, Oliveira C, Toledo-Filho SA. Cytogenetic studies on the subfamily Hypoptopomatinae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). III. Analysis of seven species. *Caryologia*. 1994; 47: 27-37.

- Andreatta AA. Estudos citogenéticos no gênero *Microlepidogaster* (Pisces, Loricariidae, Hypoptopomatinae). Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, Universidade de Estadual Paulista (UNESP), Botucatu. 2002; 196p.
- Andreatta AA, Oliveira C, Fausto F. Karyological characterization of four Neotropical fish species of the genus *Hisonotus* (Teleostei, Loricariidae, Hypoptopomatinae) from distinct Brazilian river basins. *Genetics and Molecular Biology*. 2006; 29: 62-66.
- Arents G, Burlingame RW, Wang BC, Love WE, Moudrianakis EN. The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1991; 88: 10148-10152.
- Artoni RF, Venere PC, Bertollo LAC. A heteromorphic ZZ/ZW sex chromosome system in fish, genus *Hypostomus* (Loricariidae). *Cytologia*. 1998; 63: 421-425.
- Artoni RF, Molina WF, Bertollo LAC, Galetti Jr. PM. Heterochromatin analysis in the fish species *Liposarcus anisitsi* (Siluriformes) and *Leporinus elongatus* (Characiformes). *Genetics and Molecular Biology*. 1999; 22: 39-44.
- Artoni RF, Falcão JDN, Moreira-Filho O, Bertollo LAC. An uncommon condition for a sex chromosome system in Characidae fish. Distribution and differentiation of the ZZ/ZW system in *Triportheus*. *Chromosome Research*. 2001; 9: 449-456.
- Artoni RF, Bertollo LAC. Evolutionary aspects of the ZZ/ZW sex chromosome system in the Characidae fish, genus *Triportheus*. A monophyletic state and NOR. *Heredity*. 2002; 89: 15-19.
- Artoni RF, Vicari MR, Endler AL, Cavallaro ZI, Jesus CM, Almeida MC, Moreira-Filho O, Bertollo LAC. Banding pattern of A and B chromosomes of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae), with comments on B chromosomes evolution. *Genetica*. 2006; 127: 277-284.
- Baker RJ, Bickham JW. Speciation by Monobrachial centric fusions. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986; 83: 8245-8248.
- Bates GP, Wainwright BJ, Williamson R, Brown SDM. Microdissection and microcloning from the short arm of human chromosome 2. *Mol Cell Biol*. 1986; 6: 3826-3830.
- Beçak W, Beçak ML. Cytotaxonomy and chromosomal evolution in Serpents. *Cytogenetics*. 1969; 8: 247-262.

- Beçak W. Evolution and differentiation of sex chromosomes in lower vertebrates. *Differentiation*. 1983; 23: S3-S12.
- Bellafronte E, Vicari MR, Artoni RF, Margarido VP, Moreira-Filho O. Differentiated ZZ/ZW sex chromosomes in *Apareiodon ibitiensis* (Teleostei, Parodontidae): considerations on cytotaxonomy and biogeography. *Journal of Fish Biology*. 2009; 75: 1095-8649.
- Bertollo LAC, Takahashi CS, Moreira-Filho O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Rev Bras Genet*. 1978; 1: 103-120.
- Bertollo LAC, Takahashi CS, Moreira-Filho O. Multiple sex chromosomes in the genus *Hoplias* (Pisces, Erythrinidae). *Cytologia*. 1983; 48: 1-12.
- Bertollo LAC, Cavallaro ZI. A highly differentiated ZZ/ZW sex chromosome system in a Characidae fish, *Triportheus guentheri*. *Cytogenet Cell Genet*. 1992; 60: 60-63.
- Bertollo LAC, Born GG, Dergam JA, Fenocchio AS, Moreira-Filho O. A biodiversity approach in the Neotropical fish *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic distribution of cytotypes and cytotaxonomic considerations. *Chromosome Res*. 2000; 8: 603-613.
- Bertoni L, Attolini C, Faravelli M, Simi S, Giulotto E. Intrachromosomal telomere-like DNA sequences in Chinese hamster. *Mamm Genome*. 1996; 7: 853-855.
- Bolzán AD, Bianchi MS. Telomeres, interstitial telomeric repeat sequences and chromosomal aberrations. *Mutat Res*. 2006; 612: 189-214.
- Born GG, Bertollo LAC. An XX/XY sex chromosome system in a fish species, *Hoplias malabaricus*, with a polymorphic NOR-bearing X chromosome. *Chromosome Research*. 2000; 8:111-118.
- Breder CM, Rosen DE. *Modes of Reproduction in Fishes*. Garden City. NY: Natural History Press. 1966.
- Brinkman JN, Sessions SK, Houben A, Green DM. Structure and evolution of supernumerary chromosomes in the Pacific giant salamander, *Dicamptodon tenebrosus*. *Chromosome Res*. 2000; 8: 477-485.
- Buckup PA. The monophyly of the Characidiinae, a Neotropical group of characiform fishes (Teleostei: Ostariophysii). *Zoological Journal of the Linnean Society*. 1993; 108: 224-245.
- Buckup PA, Reis RE. Characidiin genus *Characidium* (Teleostei, Characiformes) in southern Brazil, with description of three new species. *Copeia*. 1997; 3: 531-548.



- Buckup PA. Relationships of the Characidiinae and phylogeny of characiform fishes (Teleostei: Ostariophysi). In: Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena CAS, Lucena ZMS editors. Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. Porto Alegre, Edipucrs. 1998; p 123-144.
- Buckup PA, Hahn L. *Characidium vestigipinne*: A new species of Characidiinae (Teleostei, Characiformes) from Southern Brazil. *Copeia*, 2000; 1: 150-155.
- Buckup PA. Family Crenuchidae (South American Darters). In: Reis R, Kullander ESO, Ferraris Jr CJ editors. Check list of the freshwater fishes of South and Central America. Porto Alegre, Edipucrs. 2003; p 87-95.
- Bugrov AG, Karamysheva TV, Pyatkova MS *et al.* B chromosomes of the *Podisma sapporensis* Shir (Orthoptera, Acrididae) analyzed by chromosome microdissection and FISH. *Folia Biol Krakow*. 2003; 51: 1-11.
- Bugrov AG, Karamysheva TV, Rubtsov DN, Andreenkova OV, Rubtsov NB. Comparative FISH analysis of distribution of B chromosome repetitive DNA in A and B chromosomes in two subspecies of *Podisma sapporensis* (Orthoptera, Acrididae). *Cytogenet Genome Res*. 2004; 106: 284-288.
- Bugrov AG, Karamysheva TV, Perepelov EA, *et al.* DNA content of the B chromosomes in grasshopper *Podisma kanoi* Storozh. (Orthoptera, Acrididae). *Chromosome Res*. 2007; 15: 315-325.
- Cabrero J, López-León MD, Teruel M, Camacho JPM. Chromosome mapping of H3 and H4 histone gene clusters in 35 species of acridid grasshoppers. *Chromosome Research*. 2009; 17: 397-404.
- Camacho JPM, Sharbel TF, Beukeboom LW. B chromosome evolution. *Phil Trans R Soc B Biol Sci*. 2000; 355: 163-178.
- Camacho JPM. B chromosomes. In: Gregory TR editor. *The evolution of the genome*. Elsevier, San Diego. 2005; p 223-286.
- Caputo V, Marchegiani F, Sorice M, Olmo E. Heterochromatin heterogeneity and chromosome variability in four species of gobiid fishes (Perciformes: Gobiidae). *Cytogenetics and Cell Genetics*. 1997; 79: 266-271.
- Castiglia R, Garagna S, Merico V, Oguge N, Corti M. Cytogenetics of a new cytotype of African *Mus* (subgenus *Nannomys*) *minutoides* (Rodentia, Muridae) from Kenya: C- and G-

- banding and distribution of (TTAGGG)<sub>n</sub> telomeric sequences. *Chromosome Research*. 2006; 14: 587-594.
- Centofante L, Bertollo LAC, Moreira-Filho O. Comparative cytogenetics among sympatric species of *Characidium* (Pisces, Characiformes). Diversity analysis with the description of a ZW sex chromosome system and natural triploidy. *Caryologia*. 2001; 54: 253-260.
- Centofante L, Bertollo LAC, Buckup PA, Moreira-Filho O. Chromosomal divergence and maintenance of sympatric *Characidium* fish species (Crenuchidae, Characidiinae). *Hereditas*. 2003; 138: 213-218.
- Charlesworth B. The evolution of sex chromosomes. *Science*. 1991; 251: 1030-1033.
- Charlesworth B, Sniegowski P, Stephan W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature*. 1994; 371: 215-220.
- Charlesworth B, Charlesworth D. The degeneration of Y chromosomes. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London: B Biological Sciences*. 2000; 355: 1563-72.
- Charlesworth B. Sex Determination: Primitive Y Chromosomes in Fish. *Current Biology*. 2004; 14: 745-747.
- Cheng YM, Lin BY. Cloning and characterization of maize B chromosome sequences derived from microdissection. *Genetics*. 2003; 164: 299-310.
- Childs G, Maxson R, Cohn RH, Kedes L. Orphans: dispersed genetic elements derived from tandem repetitive genes of eucaryotes. *Cell*. 1981; 23: 651-663.
- Cioffi MB, Martins C, Centofante L, Jacobina U, Bertollo LAC. Chromosomal variability among allopatric populations of Erythrinidae fish *Hoplias malabaricus*: Mapping of three classes of repetitive DNAs. *Cytogenet Genome Res*. 2009; 125: 132-141.
- Cole CJ, Levans CR. Chromosome preparations of amphibians and reptiles: improved technique. *Herpetol. Rev*. 1971; 3: p 102.
- Cuellar O, Uyeno T. Triploidy in rainbow trout. *Cytogenetics*. 1972; 11: 508-515.
- Deng HX, Yoshiura KI, Dirks RW, Harada N, Hirota T, Tsukamoto K, Jinno Y, Nuikawa N. Chromosome-band-specific painting: chromosome *in situ* suppression hybridization using PCR products from a microdissected chromosome band as probe tool. *Hum. Genet*. 1992; 89: 13-17.

- Dergan JA, Bertollo LAC. Karyotypic diversification in *Hoplias malabaricus* (Osteichthyes, Erythrinidae) of São Francisco and Alto Paraná basin, Brazil. *Brazil J Genet.* 1990; 13: 755-766.
- Devlin RH, Nagahama Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture.* 2002; 208: 191-364.
- Dimitri P, Arca B, Berghella L, Mei E. High genetic instability of heterochromatin after transposition of the LINE-like I factor in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997; 94: 8052-8057.
- Dimitri P. Constitutive heterochromatin and transposable elements in *Drosophila melanogaster*. *Genetica.* 1997; 100: 85-93.
- Diniz D, Moreira-Filho O, Bertollo LAC. Molecular cytogenetics and characterization of a ZZ/ZW sex chromosome system in *Triporthus nematurus* (Characiformes, Characidae) *Genetica.* 2008; 133: 85-91.
- Diniz D, Laudicina A, Cioffi MB, Bertollo LAC. Microdissection and whole chromosome painting. Improving sex chromosome analysis in *Triporthus* (Teleostei, Characiformes). *Cytogenet Genome Res.* 2008; 122: 163-168.
- Dobzhansky T, Epling C. The suppression of crossing over in inversion heterozygotes of *Drosophila pseudoobscura*. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 1948; 34: 137-41.
- Doolittle WF, Sapienza C. Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution. *Nature.* 1980; 284: 601-603.
- Eickbush TH, Moudrianakis EN. The histone core complex: an octamer assembled by two sets of protein-protein interactions. *Biochemistry.* 1978; 17: 4955-4964.
- Elder JF Jr, Turner BJ. Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eukaryotes. *Q Rev Biol.* 1995; 70: 297-320.
- Fagundes V, Yonenaga-Yassuda Y. Evolutionary conservation of whole homeologous chromosome arms in the Akodont rodents *Bolomys* and *Akodon* (Muridae, Sigmodontinae): maintenance of interstitial telomeric segments (ITBs) in recent event of centric fusion. *Chromosome Research.* 1998; 6: 643-648.
- Fauaz G, Vicente VE, Moreira-Filho O. Natural triploidy and B chromosomes in the Neotropical fish genus *Astyanax* (Characidae). *Brazil J. Genet.* 1994; 17: 157-163.

- Fernandes-Matioli FMC, Almeida-Toledo LF, Toledo-Filho SA. Extensive nucleolus organizer region polymorphism in *Gymnotus carapo* (Gymnotoidei, Gymnotidae). *Cytogenetics and Cell Genetics*. 1997; 78: 236-239.
- Ferro DAM, Néo DM, Moreira-Filho O, Bertollo LAC. Nucleolar organizing regions, 18S and 5S rDNA in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): Populations distribution and functional diversity. *Genetica*. 2001; 110: 55-62.
- Finato AO, Varella-Garcia M, Tajara EH, Taddei VA, Morielle-Versute E. Intrachromosomal distribution of telomeric repeats in *Eumops glaucinus* and *Euntops perotis* (Molossidae, Chiroptera). *Chromosome Research*. 2000; 8: 563-569.
- Flint J, Craddock CF, Villegas A, Bentley DP, Williams HJ, *et al.* Healing of broken human chromosomes by the addition of telomeric repeats. *Am J Hum Genet*. 1994; 55: 505-512.
- Foresti F, Almeida-Toledo LF, Toledo-Filho SA. Polymorphic nature of nucleolus organizer regions in fishes. *Cytogenetics and Cell Genetics*. 1981; 31:137-144.
- Foresti F. Hipótese alternativa sobre a origem dos cromossomos supranumerários em peixes. In: Resumos do VIII Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes, São Carlos, SP, 1998.
- Franck JPC, Wright JM. Conservation of a satellite DNA sequence (SATB) in the tilapiine and haplochromine genome (Pisces: Cichlidae). *Genome*. 1993; 36: 187-194.
- Franck JPC, Kornfield I, Wright JM. The utility of SATA satellite DNA sequences for inferring phylogenetic relationships among the three major genera of tilapiine Cichlidae fishes. *Mol. Phylogen. Evol.* 1994; 3: 10-16.
- Fujiwara AM, Abe S, Yamaha E, Yamazaki F, Yoshida MC. Chromosomal localization and heterochromatin association of ribosomal RNA gene loci and silver stained nuclear organizer regions in salmonid fishes. *Chromosome Research*. 1998; 6: 463-471.
- Galetti Jr. PM, Mestriner CA, Venere PC, Foresti F. Heterochromatin and karyotype reorganization in fish of the family Anostomidae (Characiformes). *Cytogen. Cell Genet.* 1991a; 56: 116-121.
- Galetti Jr. PM, Cesar ACG, Venere PC. Heterochromatin and NORs variability in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). *Caryologia*. 1991b; 44(3-4): 287-292.
- Galetti Jr. PM, Rasch EM. NOR variability in diploid and triploid forms of the Amazon molly *Poecilia formosa* as shown by silver nitrate and chromomycin A3 staining. *Brazil J Genet*. 1993; 16: 927-938.

- Galetti Jr. PM, Mestriner CA, Monaco PJ, Rash EM. Post-zygotic modifications and intra and inter individual nucleolar organizing region variations in fish: Report of a case involving *Leporinus friderici*. Chromosome Research. 1995; 3: 285-290.
- Galetti Jr. PM. Chromosome diversity in Neotropical fish. NOR studies. Ital. J. Zool. 1998; 65: 53-56.
- Galetti Jr. PM, Martins C. Contribuição da hibridação *in situ* para o conhecimento dos cromossomos de peixes. In: Guerra M. Ed. Fluorescence *in situ* hybridization: conceitos e aplicações na citogenética. Ribeirão Preto, SBG. 2004; p 61-88.
- Garagna S, Ronchetti E, Mascheretti S, Crovella S, Formenti D, *et al.* Non-telomeric chromosome localization of (TTAGGG)<sub>n</sub> repeats in the genus *Eulemur*. Chromosome Research. 1997; 5: 487-491.
- Garagna S, Marziliano N, Zuccotti M, Searle JB, Capanna E, *et al.* Pericentromeric organization at the fusion point of mouse Robertsonian translocation chromosomes. Proc Natl Acad Sci USA. 2001; 98: 171-175.
- Gold JR, Li CY, Shipley NS, Powers PK. Improved methods for working with fish chromosomes with a review of metaphase chromosome banding. J. Fish Biol. 1990; 37: 563-575.
- Go Y, Rakotoarisoa G, Kawamoto Y, Randrianjafy A, Koyama N, *et al.* PRINS analysis of the telomeric sequence in seven lemurs. Chromosome Research. 2000; 8: 57-65.
- Gornung E, Gabrielli I, Cataudella S, Sola L. CMA<sub>3</sub>-banding pattern and fluorescence *in situ* hybridization with 18s rDNA genes in zebrafish Chromosomes. Chromosome Research. 1997; 5: 40-46.
- Graham GJ. Tandem genes and clustered genes. J. Theor. Bio. 1995; 175: 71-871.
- Green DM. Muller's ratchet and the evolution of supernumerary chromosomes. Genome. 1990; 33, 818-824.
- Green DM, Zeyl CW, Sharbel TF. The evolution of hypervariable sex and supernumerary (B) chromosomes in the relict New Zealand frog, *Leiopelma hochstetteri*. J. Evol. Biol. 1993; 6: 417-441.
- Griffin DK, Harvey SC, Campos-Ramos R, Ayling LJ, Bromage NR, Masamba JS, Penman DJ. Early origins of the X and Y chromosomes: lessons from tilapia. Cytogenetic and Genome Research. 2002; 99: 157-63.

- Griffiths AJF, Gelbart WM, Miller JH, Lewontin RC. Genética Moderna. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 2001; 589p.
- Haaf T, Schmid M. An early stage of ZZ-ZW Sex chromosome differentiation in *Poecilia sphenops* var. *melanistica* (Poeciliidae, Cyprinodontiformes). *Chromosoma*. 1984; 89: 37-41.
- Hadjiolov AA. The nucleolus and ribosome biogenesis. Cell Biology Monographs. Springer-Verlag: New York. 1985; 263 p.
- Hartley SE. Cytogenetic studies of atlantic salmon, *Salmo salar*. In Scotland. *J. Fish Biol.* 1988; 33: 735-740.
- Hatanaka T, Galetti Jr. PM. Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetica*. 2004; 122:239-244.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard Jr. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond.* 2003; 270: 313-321.
- Henning F, Trifonov V, Ferguson-Smith MA, Almeida-Toledo LF. Non-homologous sex chromosomes in two species of the genus *Eigenmannia* (Teleostei: Gymnotiformes). *Cytogenet Genome Res.* 2008; 121: 55-58.
- Hewitt GM. Grasshoppers and crickets. In: *Animal Cytogenetics*, Vol. 3, Insecta 1. Gebrüder Borntrager, Berlin-Stuttgart. 1979.
- Houben A, Leach CR, Verlin D, Rofe R, Timmis JN. A repetitive DNA sequence common to the different B chromosomes of the genus *Brachycome*. *Chromosoma*. 1997; 106, 513-519.
- Howell WM, Black DA. Location of the nucleolus organizer regions on the sex chromosomes of the banded killifish, *Fundulus diaphanus*. *Copeia*. 1979; 3: 544-546.
- Howell WM, Black DA. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: A 1-step method. *Experientia*. 1980; 36: 1014-1015.
- Hu L, Sham JS, Tjia WM, Tan YQ, Lu GX, Guan XY. Generation of a complete set of human telomeric band painting probes by chromosome microdissection. *Genomics*. 2004; 83: 298-302.
- Jamilena M, Garrido-Ramos M, Ruiz-Rejón M, Ruiz-Rejón C, Parker JS. Characterization of repeated sequences from microdissected B chromosomes of *Crepis capillaris*. *Chromosoma*. 1995; 104: 113-120.

- Jesus CM, Bertollo LAC, Moreira-Filho O. Comparative cytogenetics in *Apareiodon affinis* (Pisces, Characiformes) and considerations regarding diversification of the group. *Genetica*. 1999; 105:63-67.
- Jesus CM, Galetti Jr. PM, Valentini SR, Moreira-Filho O. Molecular characterization and chromosomal localization of two families of satellite DNA in *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae), A species with B chromosomes. *Genetica*. 2003; 118: 25-32.
- Jesus CM, Moreira-Filho O. Chromosomal location of 5S and 18S rRNA genes in *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae). *Caryologia*. 2003; 56: 281-287.
- John B. The biology of heterochromatin. In: Verma RS. ed. Heterochromatin: molecular and structural aspects. Cambridge University Press. 1988; 1-147.
- Jones RN, Rees H. B Chromosome. Academic Press, London. 1982.
- Juan C, Pons J, Petitpierre E. Localization of tandemly repeated DNA sequences in beetle chromosomes by fluorescence *in situ* hybridization. *Chromosome Research*. 1993; 1: 167-174.
- Kao TT. Microdissection and microcloning of human chromosome 21. *Proceedings of Clinical and Biological Research*. 1990; 360: 89-104.
- Kavalco KF. Estudos Evolutivos no gênero *Astyanax* (Pisces, Characidae). Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo. 2008; 197p.
- Kedes LH. Histone genes and histone messengers. *Annu Rev Biochem*. 1979; 48: 837-870.
- Lee C, Sasi R, Lin CC. Interstitial localization of telomeric DNA sequences in the Indian muntjac chromosomes: further evidence for tandem chromosome fusions in the karyotypic evolution of the Asian muntjacs. *Cytogenetics Cell Genetics*. 1993; 63: 156-159.
- Levan A, Fredga K, Sandberg AA. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*. 1964; 52: 201-220.
- Li YC, Cheng YM, Hsieh LJ, *et al.* Karyotypic evolution of a novel cervid satellite DNA family isolated by microdissection from the Indian muntjac Y chromosome. *Chromosoma*. 2005; 114: 28-38.
- Lim JK, Simmons MJ. Gross chromosome rearrangements mediated by transposable elements in *Drosophila melanogaster*. *Bioessays*. 1994; 16: 269-275.

- Long H, Qi ZX, Sun XM *et al.* Characters of DNA constitution in the rye B chromosome. *J Integr Plant Biol.* 2008; 50: 183-189.
- López-León MD, Neves N, Schwarzacher T, Heslop-Harrison TS, Hewitt GM, Camacho JPM. Possible origin of a B chromosome deduced from its DNA composition using double FISH technique. *Chromosome Res.* 1994; 2: 87-92.
- Lucchini S, Nardi I, Barsacchi G, Batistoni R, Andronico F. Molecular cytogenetics of the ribosomal (18S + 28S and 5S) DNA loci in primitive and advanced urodele amphibians. *Genome.* 1993; 36: 762-773.
- Lucena ZMS, Lucena CAS. Revisão das espécies de *Deuterodon* Eigenmann, 1907 dos sistemas costeiros do sul do Brasil com a descrição de quatro espécies novas (Ostariophysi, Characiformes, Characidae). *Comum. Mus. Ciênc. PUCRGS Sér. Zool.* 1992; 5: 123-168.
- Ludecke HJ, Senger G, Claussen U, Horsthemke B. Cloning defined regions of the human genome by microdissection of banded chromosomes and enzymatic amplification. *Nature.* 1989; 338: 348-350.
- Maistro EL, Dias AL, Foresti F, Oliveira C, Moreira O. Natural triploidy in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) and simultaneous occurrence of macro B-chromosomes. *Caryologia.* 1994; 47: 233-239.
- Maistro EL, Mata EP, Oliveira C, Foresti F. Unusual occurrence of a ZZ/ZW sex-chromosome system and supernumerary chromosomes in *Characidium cf. fasciatum* (Pisces, Characiformes, Characidiinae). *Genetica.* 1998; 104: 1-7.
- Maistro EL, Oliveira C, Foresti F. Cytogenetic analysis of A- and B-chromosomes of *Prochilodus lineatus* (Teleostei, Prochilodontidae) using different restriction enzyme banding and staining methods. *Genetica.* 2000; 108: 119-125.
- Maistro EL, Jesus CM, Oliveira C, Moreira-Filho O, Foresti F. Cytogenetic analysis of A, - B-chromosomes and ZZ/ZW sex chromosomes of *Characidium gomesi* (Teleostei, Characiformes, Crenuchidae). *Cytologia.* 2004; 69: 181-186.
- Mandrioli M, Manicardi GC, Marec F. Cytogenetic and molecular characterization of the MBSAT1 satellite DNA in holokinetic chromosomes of the cabbage moth, *Mamestra brassicae* (Lepidoptera). *Chromosome Research.* 2003; 11: 51-56.



- Mantovani M, Abel LDS, Mestriner CA, Moreira-Filho O. Accentuated polymorphism of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): Tools for understanding karyotypic evolution. *Genetica*. 2000; 109: 161-168.
- Marchal JA, Acosta MJ, Nietzel H, *et al.* X chromosome painting in *Microtus*: Origin and evolution of the giant sex chromosomes. *Chrom Res*. 1989; 12: 767-776.
- Margarido VP, Galetti Jr. PM. Amplification of a GC-rich heterochromatin in the freshwater fish *Leporinus desmotes* (Characiformes, Anostomidae). *Genetics and Molecular Biology*. 2000; 23: 569-573.
- Martins C, Galetti Jr. PM. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). *Chromosome Research*. 1999; 7:363-367.
- Martins C, Galetti Jr. PM. Two rDNA arrays in Neotropical fish species: is it a general rule for fishes? *Genetica*. 2001; 111: 439-446.
- Martins C, Ferreira IA, Oliveira C, Foresti F, Galetti Jr. PM. A tandemly repetitive centromeric DNA sequence of the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) is derived from 5S rDNA. *Genetica*. 2006; 127: 133-141.
- Maxson R, Cohn R, Kedes L. Expression and organization of histone genes. *Ann Rev Gen*. 1983; 17: 239-277.
- Mayr B, Kalat M, Ràb P. Localization of NORs and counterstain-enhanced fluorescence studies in *Perca fluviatilis* (Pisces, Percidae). *Genetica*. 1985; 67: 51-56.
- Mayr B, Ràb P, Kalat M. NORs and counterstain-enhanced fluorescence studies in Cyprinidae of different ploidy level. *Genetica*. 1986; 69: 111-118.
- Mayr B, Kalat M, Ràb P. Heterochromatins and band karyotypes in three species of salmonids. *Theor. Appl. Genet*. 1988; 76: 45-53.
- Mckee BD, Handel MA. Sex chromosomes, recombination and chromatin conformation. *Chromosoma*. 1993; 102: 71-80.
- McQuade L, Hill R, Francis D. B chromosome systems in the greater glider, *Petauroides volans* (Marsupialia, Pseudocheiridae). 2. Investigation of B chromosome DNA sequences isolated by micromanipulation and PCR. *Cytogenet Cell Genet*. 1994; 66: 155-161.
- Meltzer PS, Guan XY, Burgess A, Trent JM. Rapid generation of region specific probes by chromosome microdissection and their application. *Nature Genetics*. 1992; 1: 24-28.

- Menezes NA, Weitzman SH. Two new species of *Mimagoniates* (Teleostei: Characidae: Glandulocaudinae), their phylogeny and biogeography and a key to glandulocaudin fishes of Brazil and Paraguay. *Proc. Biol. Soc. Washington*. 1990; 103: 380-426.
- Mestriner CA, Galetti Jr. PM, Valentini SR, Ruiz IRG, Abel LDS, Moreira-Filho O, Camacho JPM. Structural and functional evidence that a B chromosome in the characid fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome. *Heredity*. 2000; 85: 1-9.
- Metcalf CJ, Eldridge MD, Johnston PG. Mapping the distribution of the telomeric sequence (T2AG3)<sub>n</sub> in the Macropodoidea (Marsupialia) by fluorescence *in situ* hybridization. II. The ancestral 2n=22 macropodid karyotype. *Cytogenetics Genome Research*. 2007; 116: 212-217.
- Meyne J, Baker RJ, Hobart HH, Hsu TC, Ryder OA, *et al.* Distribution of non-telomeric sites of the (TTAGGG)<sub>n</sub> telomeric sequence in vertebrate chromosomes. *Chromosoma*. 1990; 99: 3-10.
- Miller OJ, Miller DA, Dev VG, Tantravahi R, Croce CM. Expression of human and suppression of mouse nucleolus organizer activity in mouse-human somatic cell hybrids *Proc. Natl. Acad. Sc. USA*. 1976; 73: 4531-4535.
- Mitchell-McGrath J, Helgeson JP. Differential behavior of *Solanum brevidens* ribosomal DNA loci in a somatic hybrid and its progeny with potato. *Genome*. 1998; 41: 435-439.
- Miyazawa CS, Galetti Jr. PM. First cytogenetical studies in *Characidium* species (Pisces: Characiformes, Characidiinae). *Cytologia*. 1994; 59: 73-79.
- Molina WF, Schmid M, Galetti Jr. PM. Heterochromatin and sex chromosomes in the Neotropical fish genus *Leporinus* (Characiformes, Anostomidae). *Cytobios*. 1998; 94: 141-149.
- Moran P, Martinez JL, Garcia-Vasquez E, Pendas AM. Sex chromosome linkage of 5S rDNA in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Cytogenetics Cell Genetic*. 1996; 75: 145-150.
- Moreira-Filho O, Bertollo LAC, Galetti Jr. PM. Structure and variability of nucleolar organizer regions in Parodontidae fish. *Genome*. 1984; 26: 564-568.
- Moreira-Filho O, Bertollo LAC, Galetti Jr. PM. Distribution of sex chromosome mechanisms in Neotropical fish and description of a ZZ/ZW system in *Parodon hilarii* (Parodontidae). *Caryologia*. 1993; 46: 115-125.

- Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, Dani M, Deaven LL, *et al.* A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)<sub>n</sub>, present at the telomeres of human chromosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1988; 85: 6622-6626.
- Mühlmann-Diaz MC, Christian AT, Bedford JS. Chromosom microdissection. Tenth International Congress of Radiation Research. Wiirzburg, Germany. 1995.
- Multani AS, Ozen M, Furlong CL, Zhao YJ, Hsu TC, Pathak S. Heterocromatin and interstitial telomeric DNA homology. Chromosoma. 2001; 110: 214-220.
- Nakayama S, Fujishita M, Sone T, Ohyama K. Additional locus of rDNA sequence specific to the X chromosome of the liverwort, *Marchantia polymorpha*. Chromosome Research. 2001; 9: 469-473.
- Namekawa SH, Lee JT. XY and ZW: Is meiotic sex chromosome inactivation the rule in evolution? PLoS Genetics. 2009; 5(5): e1000493.
- Nanda I, Shan Z, Schartl M, *et al.* 300 million years of conserved synteny between chicken Z and human chromosome 9. Nat Genet. 1999; 21: 258-259.
- Nanda I, Schrama D, Feichtinger W, Haaf T, Schartl M, Schmid M. Distribution of telomeric (TTAGGG)<sub>n</sub> sequences in avian chromosomes. Chromosoma. 2002; 111: 215-227.
- Nanda I, Fugate M, Steinlein C, Schmid M. Distribution of (TTAGGG)<sub>n</sub> telomeric sequences in karyotypes of the *Xenopus* species complex. Cytogenetics Genome Res. 2008; 122: 396-400.
- Nelson JS. Fishes of the World. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. 2006; p 601.
- Nei M, Rooney AP. Concerted evolution and birth-and-death evolution of multigene families. Annual Review of Genetics. 2005; 39: 121-152.
- Neusser M, Münchb M, Anzenbergerb G, Müllera S. Investigation of marmoset hybrids (*Cebuella pygmaea* × *Callithrix jacchus*) and related Callitrichinae (Platyrrhini) by cross-species chromosome painting and comparative genomic hybridization. Cytogenet Genome Res. 2005; 108: 191-196.
- Nirchio M, Oliveira C, Ferreira IA, Granado A, Ron E. Extensive polymorphism and chromosomal characteristics of ribosomal DNA in the characid fish *Triportheus venezuelensis* (Characiformes, Characidae). Genetics and Molecular Biology. 2007; 30: 25-30.

- Noletto RB, Amorim AP, Vicari MR, Artoni RF, Cestari MM. An unusual ZZ/ZW sex chromosome system in *Characidium* fishes (Crenuchidae, Characiformes) with the presence of rDNA sites. *Journal of Fish Biology*. 2009; 75: 448-453.
- Nuntakarn L, Mevatee U, Withyachumnarnkul B, Leardkamolkarn V, Fuchareon S. Application of micro-FISH for characterization of structural human chromosome abnormalities. *Science Asia*. 2002; 28: 1-9.
- Ohno S. Sex chromosome and sex determining mechanisms. In: *Animal cytogenetics*. Berlin: Gebruder Borntraeger. 1974; 4: 46-63.
- Ojima Y, Ueda T. New C-banded marker chromosomes found in carp-funa hybrids. *Proc. Japan Acad*. 1979; 54: 15-20.
- Oliveira C, Almeida-Toledo LF, Foresti F, Britski HA, Toledo-Filho SA. Chromosome formulae of Neotropical freshwater fishes. *Rev. Brasil. Genet*. 1988a; 11: 577-624.
- Oliveira C, Wright JM. Molecular cytogenetic analysis of heterochromatin in the chromosomes of tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae). *Chromosome Res*. 1998; 6: 205-11.
- Oliveira C, Almeida-Toledo LF, Foresti F, Toledo-Filho SA. Supernumerary chromosomes, Robertsonian rearrangements and multiple NORs in *Corydoras aeneus* (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae). *Caryologia*. 1988b; 41: 227-236.
- Oliveira C, Almeida-Toledo LF, Mori L, Toledo-Filho SA. Extensive chromosomal rearrangements and nucleolar DNA content changes in the evolution of the armoured catfishes genus *Corydoras* (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae). *J. Fish Biol*. 1992; 40: 419-431.
- Oliveira C, Almeida-Toledo LF, Mori L, Toledo-Filho SA. c (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae) from the southeast coast of Brazil. *Rev. Brasil. Genet*. 1993; 16: 617-629.
- Oliveira C, Foresti F, Almeida-Toledo LF. Karyotypic evolution in Neotropical fishes. In: *Fish Cytogenetics*. Pisano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F, Kapoor BG. eds. Enfield, Science Publisher, Inc. 2007; 111-164.
- Oshida T, Shindo J, Yoshida MC. Nor-bearing Y chromosome in American beaver, *Castor canadensis* (Rodentia, Castoridae). *Chromosome Science*. 1999; 3: 117-118.
- Paiva LRS, Pansonato-Alves JC, Utsonomia R, Oliveira C, Svartman M, Foresti F. Caracterização cariotípica por Banda G em peixes das espécies *Hoplias malabaricus* e

- Synbranchus marmoratus*. In: Resumos do XIII Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes, Ponta Grossa, PR. 2009.
- Pagnozzi JM, de Jesus Silva MJ, Yonenaga-Yassuda Y. Intraspecific variation in the distribution of the interstitial telomeric (TTAGGG)<sub>n</sub> sequences in *Micoureus demerarae* (Marsupialia: Didelphidae). *Chromosome Res.* 2000; 8:585-591.
- Pagnozzi JM, Ditchfield AD, Yonenaga-Yassuda Y. Mapping the distribution of the interstitial telomeric (TTAGGG)<sub>n</sub> sequences in eight species of Brazilian marsupials (Didelphidae) by FISH and the correlation with constitutive heterochromatin. Do ITS represent evidence for fusion events in American marsupials? *Cytogenetics Genome Res.* 2002; 98: 278-284.
- Parise-Maltempi PP, Avancini RMP. C-banding and FISH in chromosomes of the blow flies *Chrysomya megacephala* and *Chrysomya putoria* (Diptera, Calliphoridae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2001; 96: 371-377.
- Parise-Maltempi PP, Martins C, Oliveira C, Foresti F. Identification of a new repetitive element in the sex chromosomes of *Leporinus elongatus* (Teleostei: Characiformes: Anostomidae): new insights into the sex chromosomes of *Leporinus*. *Cytogenet Genome Res.* 2007; 116: 218-223.
- Pathak S, Dolhonde JA, Multani AS. Amplification of telomeric DNA and the extent of karyotypic evolution. *Cytobios.* 1998; 93: 141-6.
- Pellegrini M, Manning J, Davidson N. Sequence arrangement of the rDNA of *Drosophila melanogaster*. *Cell.* 1977; 10: 213-214.
- Pellegrino KC, Rodrigues MT, Yonenaga-Yassuda Y. Chromosomal evolution in the Brazilian lizards of genus *Leposoma* (Squamata, Gymnophthalmidae) from Amazon and Atlantic rain forests: banding patterns and FISH of telomeric sequences. *Hereditas.* 1999; 131: 15-21.
- Pendás AM, Morán P, Garcia-Vásquez G. Ribosomal RNA genes are interspersed throughout a heterochromatic chromosome arm in Atlantic salmon. *Cytogenetics Cell Genetics.* 1993; 63: 128-130.
- Pendás AM, Morán P, Freije JP, Garcia-Vásquez E. Chromosomal location and nucleotide sequence of two *tandem* repeats of the Atlantic salmon 5S rDNA. *Cytogenetics Cell Genetics.* 1994; 67: 31-36.

- Pendás AM, Morán P, García-Vázquez E. Organization and chromosomal location of the major histone cluster in brown trout, Atlantic salmon and rainbow trout. *Chromosoma*. 1994; 103:147-152.
- Perdices A, Bermingham E, Montilla A, Doadrio I. Evolutionary history of the genus *Rhamdia* (Teleostei: Pimelodidae) in Central America. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 25 (2002) 172–189
- Phillips R, Pleyte KA, Hartley SE. Stock-specific differences in the number and chromosome positions of the nucleolar organizer regions in Arctic char (*Salvelinus alpinus*). *Cytogenet Cell Genet*. 1988; 48: 9-12.
- Phillips RB, Reed KM. Application of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) techniques to fish genetics: a review. *Aquaculture*. 1996; 140: 197-216
- Phillips B, Konkol NR, Reed KM, Stein JD. Chromosome painting supports lack of homology among sex chromosomes in *Oncorhynchus*, *Salmo*, and *Salvelinus* (Salmonidae). *Genetica*. 2001; 111: 119-123.
- Pieczarka JC, Mattevi MS. Some insights on the mechanism of *in situ* DNA digestion by restriction enzymes and on fluorochrome banding: Case of the argentata group. In: Sobti RC, Obe G, Athwal RS. eds. Some aspects of chromosome structure and functions. New Delhi: Narosa Publishing House. 2002; 3: 17-26.
- Pimpinelli S, Berloco M, Fanti L, Dimitri, P, Bonaccorsi S, Marchetti E, Caizzi R, Caggese C, Catti M. Transposable elements are stable components of *Drosophila melanogaster* heterochromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995; 92: 3804-8.
- Pinkel D, Straume T, Gray JW. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci*. 1986; 83: 2934-2938.
- Price DJ. Genetics of sex determination in fishes: A brief review. p 7789. In: Fish Reproduction: Strategies and Tactics. Potts GW, Wootton RJ. eds. London. Academic Press. 1984.
- Purdom CE. Genetic engineering by the manipulation of chromosomes. *Aquaculture*. 1983; 33: 287-300.
- Ramakrishnan V, Finch JT, Graziano V, Lee PL, Sweet RM. Crystal structure of globular domain of histone H5 and its implications for nucleosome binding. *Nature (London)*. 1993; 362: 219-223.

- Redi CA, Garagna S, Zacharias H, Zuccotti M, Capanna E. The other chromatin. *Chromosoma*. 2001; 110: 136-47.
- Reed KM, Phillips RB. Molecular cytogenetic analysis of the double CMA<sub>3</sub> chromosome of lake trout, *Salvelinus namaycush*. *Cytogen. Cell Genet*. 1995; 70: 104-107.
- Reed KM, Phillips RB. Molecular characterization and cytogenetic analysis of highly repeated DNAs of lake trout, *Salvelinus namaycush*. *Chromosoma*. 1995; 104: 242-251.
- Reed KM, Phillips RB. Polymorphism of the nucleolus organizer region (NOR) on the putative sex chromosomes of arctic char (*Salvelinus alpinus*) is not sex related. *Chromosome Research*. 1997; 5: 221-227.
- Reis RE, Schaefer SA. New cascudinhos from Southern Brazil: Systematics, Endemism and Relationships (Siluriformes, Loricariidae, Hypoptopomatinae). *Am. Mus. Novitates*. 1998; 3254: 1-25.
- Reis RE, Kullander SO, Ferraris C. Check List of freshwater Fishes of South and Central America. Porto Alegre: Edipucrs. 2003; 742p.
- Ribeiro AC. Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil: an example of faunal evolution associated with a divergent continental margin. *Neotrop. ichthyol*. 2006; 4: 225-246.
- Ribeiro AC. Filogenia e biogeografia do gênero *Oligosarcus* Günther, 1864 (Ostariophysi; Characidae). Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, Universidade de Estadual Paulista (UNESP), Botucatu. 2007; 135p.
- Rice WR. Evolution of the Y sex chromosome in animals. *Bioscience*. 1996; 46: 331-343.
- Rubtsov NB, Karamysheva TV, Andreenkova OV, *et al*. Comparative analysis of micro and macro B chromosomes in the Korean field mouse *Apodemus peninsulae* (Rodentia, Murinae) performed by chromosome microdissection and FISH. *Cytogenet Genome Res*. 2004; 106: 289-294.
- Ruiz-Herrera A, Nergadze SG, Santagostino M, Giulotto E. Telomeric repeats far from the ends: mechanisms of origin and role in evolution. *Cytogenet Genome Res*. 2008; 122:219-228.
- Saito Y, Edpalina R, Abe S. Isolation and characterization of salmonidae telomeric and centromeric satellite DNA sequences. *Genetica*. 2007; 131: 157-166.
- Santani A, Raudsepp T, Chowdhary BP. Interstitial telomeric sites and NORs in Hartmann's zebra (*Equus zebra hartmannae*) chromosomes. *Chromosome Res*. 2002; 10: 527-534.

- Scavone MD, Julio Jr. HF. Cytogenetics analysis and heterochromatin distribution in ZZ/ZW sex chromosomes of the mailed catfish *Loricariichthys platymetopon* (Loricariidae, Siluriformes). *Brazil J Genet.* 1995; 1: 31-35.
- Sharbel TF, Green DM, Houben A. B-chromosome origin in the endemic New Zealand frog *Leiopelma hochstetteri* through sex chromosome devolution. *Genome.* 1998; 41: 14-22.
- Schartl M. Sex chromosome evolution in non-mammalian vertebrates. *Current Opinion in Genetics e Development.* 2004; 14: 634-641.
- Scherthan H. Localization of the repetitive telomeric sequence (TTAGGG)<sub>n</sub> in two muntjac species and implications for their karyotypic evolution. *Cytogenetics Cell Genet.* 1990; 53: 115-117.
- Schmid M. Chromosome banding in Amphibia IV. Differentiation of GC- and AT-rich chromosome regions in Anura. *Chromosoma.* 1980; 77: 83-103.
- Schmid M. Chromosome banding in Amphibia. VII. Analysis of the structure and variability of NORs in Anura. *Chromosoma.* 1982; 87: 327-344.
- Schmid M, Guttenbach M. Evolutionary diversity of reverse (R) fluorescent chromosome bands in vertebrates. *Chromosoma.* 1988; 97: 101-114.
- Schmid M, Feichtinger W, Nanda I, Schakowski R, Visbal Garcia R, *et al.* An extraordinarily low diploid chromosome number in the reptile *Gonatodes taniae* (Squamata, Gekkonidae). *J Hered.* 1994; 85: 255-260.
- Schweizer D. Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. *Chromosoma.* 1976; 58: 307-324.
- Schweizer D, Ambros P, Andrlé M. Modification of DAPI banding on human chromosomes by prestaining with a DNA-binding oligopeptide antibiotic, Distamycin A. *Experimental Cell Research.* 1978; 111: 327-332.
- Schweizer D, Loidl J. A model for heterochromatin dispersion and the evolution of C band patterns. *Chromosomes Today.* 1987; 9: 61-74.
- Senger G, Ludecke HJ, Horsthemke B, Claussen U. Microdissection of banded human chromosomes. *Hum Genet.* 1990; 84: 507-511.
- Silva AR, Maistro EL. Cytogenetic divergence between two sympatric species of *Characidium* (Teleostei, Characiformes, Crenuchidae) from the Machado river, Minas Gerais, Brazil. *Genetics and Molecular Biology.* 2006; 29: 459-463.



- Singer MF. Highly repeated sequences in mammalian genomes. *Int. Rev. Cytol.* 1982; 76: 67-112.
- Singh L, Purdom IF, Jones KW. Sex chromosome associated satellite DNA: evolution and conservation. *Chromosoma.* 1980; 79: 137-157.
- Slijepcevic P. Telomeres and mechanisms of Robertsonian fusion. *Chromosoma.* 1998; 107: 136-140.
- Smith GP. Evolution of repeated DNA sequences by unequal crossover. *Science.* 1976; 191: 528-535.
- Souza IL, Moreira-Filho O, Galetti Jr. PM. Heterochromatin differentiation in the characid fish *Astyanax scabripinnis*. *Brazilian Journal of Genetics.* 1996; 19: 405-410.
- Sprung CN, Reynolds GE, Jasin M, Murnane JP. Chromosome healing in mouse embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96: 6781-6786.
- Steinemann M, Steinemann S. Degenerating Y chromosome of *Drosophila miranda*: a trap for retrotransposons. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA.* 1992; 89: 7591-7595.
- Steinemann S, Steinemann M. Biased distribution of repetitive elements: a landmark for neo-Y chromosome evolution in *Drosophila miranda*. *Cytogenetics Cell Genetics.* 2001; 93: 228-233.
- Sumner AT. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research.* 1972; 75: 304-306.
- Sumner AT. *Chromosome Banding.* Unwin Hyman, London. 1990
- Sumner AT. *Chromosomes: Organization and Function.* Blackwell Publishing. Oxford; 2003.
- Suzuki H, Sakurai S, Matsuda Y. Rat rDNA spacer sequences and chromosomal assignment of the genes to the extreme terminal region of chromosome 19. *Cytogenetics Cell Genetics.* 1996; 72: 1-4.
- Taft RJ, Pheasant M, Mattick JS. The relationship between non-protein-coding DNA and eukaryotic complexity. *BioEssays.* 2007; 29: 288-299.
- Takehana Y, Naruse K, Hamaguchi S, Sakaizumi M. Evolution of ZZ/ZW and XX/XY sex-determination systems in the closely related medaka species, *Oryzias hubbsi* and *O. dancena*. *Chromosoma.* 2007; 116: 463-470.

- Takehana Y, Hamaguchi S, Sakaizumi M. Different origins of ZZ/ZW sex chromosomes in closely related medaka fishes, *Oryzias javanicus* and *O. hubbsi*. *Chromosome Research*. 2008; 16: 801–811.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*. 2007; 24:1596-1599
- Telenius H, Carter NP, Bebb CE, Nordenskjöld M, Ponder BA, Tunnacliffe A. Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics*. 1992; 13: 718-25.
- Teruel M, Cabrero J, Montiel EE, Acosta MJ, Sánchez A, Camacho JPM. Microdissection and chromosome painting of X and B chromosomes in *Locusta migratoria* *Chromosome Research*. 2009; 17: 11-18.
- Thomsen PD, Hoyheim B, Christensen K. Recent fusion events during evolution of pig chromosomes 3 and 6 identified by comparison with the babirusa karyotype. *Cytogenetics Cell Genet*. 1996; 73: 203-208.
- Thorgaard GH, Jazmin ME, Stier AR. Polyploidy induced by heat shock in rainbow trout. *Trans. Am. Fish. Soc.* 1981; 110: 546-550.
- Thorgaard GH, Allen Jr. SK. Chromosome manipulation and markers in fishery management. In: Ryman N, Utter F editors. *Population Genetic and Fishery Management*. University of Washington. 1987.
- Trask BJ. Fluorescence in situ hybridization: applications in cytogenetics and gene mapping *Trends Genet*. 1991; 7: 149-154.
- Trifonov VA, Perelman PL, Kawada SI, Iwasa MA, Oda SI, Graphodatsky AS. Complex structure of B-chromosomes in two mammalian species: *Apodemus peninsulae* (Rodentia) and *Nyctereutes procyonoides* (Carnivora) *Chromosome Res*. 2002; 10: 109-116.
- Ushinsky SC, Bussey H, Ahmed AA, Wang Y, Friesen J, Williams BA, Storms RK. Histone H1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 1997; 13: 151-161.
- van Holde KE. *Chromatin*. In: Rich A. ed. Springer, New York. 1989; 1-497.
- Vasilev VP, Makeeva AP, Ryabov IN. On the triploidy of remote hybrids of carp (*Cyprinus carpio*) with other representative Cyprinidae. *Genetika*. 1975; 11:49-56.

- Venere PC, Galetti Jr. PM. Natural triploidy and chromosome B in the fish *Curimata modesta* (Curimatidae, Characiformes). *Rev Brasil Genet.* 1985; 7: 681-687.
- Venere PC, Galetti Jr. PM, Miyazawa CS. New cases of supernumerary chromosomes in Characiform fishes. *Genetics and Molecular Biology.* 1999; 22:345-349.
- Ventura K, Silva MJ, Fagundes V, Christoff AU, Yonenaga- Yassuda Y. Non-telomeric sites as evidence of chromosomal rearrangement and repetitive (TTAGGG) n arrays in heterochromatic and euchromatic regions in four species of *Akodon* (Rodentia, Muridae). *Cytogenetics Genome Res.* 2006; 115: 169-175.
- Vermeesch JR, De Meurichy W, Van Den Berghe H, Marynen P, Petit P. Differences in the distribution and nature of the interstitial telomeric (TTAGGG)<sub>n</sub> sequences in the chromosomes of the Giraffidae, okapi (*Okapia johnstoni*), and giraffe (*Giraffa camelopardalis*): evidence for ancestral telomeres at the okapi polymorphic rob (5; 26) fusion site. *Cytogenetics Cell Genet.* 1996; 72: 310-315.
- Vicari MR, Artoni RF, Bertollo LAC. Comparative cytogenetics of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae): A population analysis in adjacent hydrographic basins. *Genet Mol Biology.* 2005; 28: 103-110.
- Vicari MR, Artoni RF, Moreira-Filho O, Bertollo LAC. Diversification of a ZZ/ZW sex chromosome system in *Characidium* fish (Crenuchidae, Characiformes). *Genetica.* 2008; 134: 311-317.
- Vicente VE, Bertollo LAC, Valentini SR, Moreira-Filho O. Origin and differentiation of a sex chromosome system in *Parodon hilarii* (Pisces, Parodontidae). Satellite DNA, G- and C-banding. *Genetica.* 2003; 139: 1-6.
- Volff JN. Genome evolution and biodiversity in teleost fish. *Heredity.* 2005; 94: 280-294.
- Völker M, Sonnenberg R, Ráb P, Kullmann H. Karyotype differentiation in *Chromaphyosemion* killifishes (Cyprinodontiformes, Nothobranchiidae). III: Extensive karyotypic variability associated with low mitochondrial haplotype differentiation in *C. bivittatum*. *Cytogenet Genome Res.* 2007; 116: 116-126.
- Yang F, O'Brien PCM, Milne BS *et al.* A complete comparative chromosome map for the dog, red fox, and human and its integration with canine genetic maps. *Genomics.* 1999; 62:189-202

- Yonenaga-Yassuda Y, Assis MFL, Kasahara S, L'abbate ML, Souza MJ. Nucleolar organizer regions in *Akodon arviculoides* (Cricetidae, Rodentia): Evidence for the activity of rDNA genes in both X chromosomes of females. *Cytogenetics Cell Genetics*. 1983, 35: 143-147.
- Wasko AP, Martins C, Wright JM, Galetti Jr. PM. Molecular organization of 5 rDNA in fishes of the genus *Brycon*. *Genome*. 2001; 44: 893-902.
- Weiler KS, Wakimoto BT. Heterochromatin and gene expression in *Drosophila*. *Annu. Rev. Genet.* 1995; 29: 577-605.
- Weitzman SH, Menezes NA, Weitzman MJ. Phylogenetic biogeography of the Glandulocaudini (Teleostei: Characiformes, Characidae) with comments on the distributions of others freshwater fishes in eastern and southeastern Brazil. *Proceedings of a Workshop on Neotropical Distribution Patterns*. Academia Brasileira de Ciências. 1988; p 379-427.
- Wiley JE, Meyne J, Little ML, Stout JC. Interstitial hybridization sites of the (TTAGGG)<sub>n</sub> telomeric sequence on the chromosomes of some North American hylid frogs. *Cytogenetics Cell Genet.* 1992; 61: 55-57.
- Wiltshire RN, Dennis TR, Sondak VK, Meltzer PS, Trent JM. Application of molecular cytogenetic techniques in a case study of human cutaneous metastatic melanoma. *Cancer Genet Cytogenet.* 2001; 131: 97-103.
- Woram RA, K Gharbi T, Sakamoto B, Hoyheim LE, Holm K, Naish C. *et al.* Comparative genome analysis of the primary sex-determining locus in Salmonid fishes. *Genome Res.* 2003; 13: 272-280.
- Wurster-Hill DH, Ward OG, Davis BH, Park JP, Moyzis RK, *et al.* Fragile sites, telomeric DNA sequences, B chromosomes, and DNA content in raccoon dogs, *Nyctereutes procyonoides*, with comparative notes on foxes, coyote, wolf, and raccoon. *Cytogenetics Cell Genet.* 1989; 49: 278-281.
- Ziegler CG, Lamatsch DK, Steinlein C, Engel W, Schartl M, Schmid M. The giant B chromosome of the cyprinid fish *Alburnus alburnus* harbours a retrotransposon-derived repetitive DNA sequence. *Chrom. Res.* 2003; 11: 23-35.