



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Instituto de Biociências, Campus de Botucatu



Natália Bortholazzi Venturelli

**Cromossomo B: comportamento meiótico e padrões de segregação em  
*Astatotilapia latifasciata***

Botucatu  
2018



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Instituto de Biociências, Campus de Botucatu



Natália Bortholazzi Venturelli

**Cromossomo B: comportamento meiótico e padrões de segregação em  
*Astatotilapia latifasciata***

Tese de doutorado apresentado ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas (Genética), do Instituto de Biociências, da Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho', Campus de Botucatu, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

**Orientador:** Professor Dr. Cesar Martins

Botucatu  
2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Venturelli, Natália Bortholassi.

Cromossomo B: : comportamento meiótico e padrões de  
segregação em *Astatotilapia latifasciata* / Natália  
Bortholassi Venturelli. - Botucatu, 2018

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio  
de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu  
Orientador: Cesar Martins  
Capes: 20204000

1. Meiose. 2. Células - Divisão. 3. Cromossomos. 4.  
Citogenética. 5. Ciclídeos. 6. Expressão gênica.

Palavras-chave: Citogenética; Cromossomo B; Meiose.

Natália Bortholazzi Venturelli

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Cesar Martins

Prof. Dr. Orlando Moreira Filho

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lucia Giuliano Caetano

Prof Dr. Celso Luis Marinho

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maeli Del Pai

Botucatu, 09 de março de 2018

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pela vida, por todas as graças recebidas e por estar sempre me fortalecendo em todos os momentos, permitindo todas as vitórias. É a Ele que dirijo toda minha gratidão

Sou profundamente agradecida aos meus queridos pais pelos valores morais, dedicação, incentivo, carinho, amor, compreensão. São infinitos os agradecimentos. Vocês, com certeza, são um exemplo de vida para mim, os principais responsáveis por esta conquista.

Ao meu irmão, eterno companheiro. Obrigada pela amizade, conselhos, incentivo e apoio durante todos esses anos de estudo. Sou muito grata por ter você em minha vida.

Ao curso de pós-graduação em Ciências Biológicas (Genética), ao Instituto de Biociências e ao Departamento de Morfologia por terem dado condições para desenvolver este trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro (número do processo 2013/04533-3, 2015/016661-1), pela bolsa concedida (número do processo 2013/25234-4) e auxílio no exterior (número do processo BEPE 2016/03912-9).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro (número do processo 474684/2013-0).

À Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro (número do processo 3272/2013).

Ao meu orientador, Prof. Dr. Cesar Martins, pelo exemplo de sucesso profissional, pela dedicação e esforço na busca por recursos financeiros sempre nos proporcionando um ambiente de trabalho confortável e com

tecnologia de ponta. Agradeço, também, os momentos de descontração proporcionados ao grupo, churrascos, *happy hour*, piscina e pizzada.

A todos os professores da pós-graduação pelos ensinamentos, amizade e pelo incentivo.

Ao Professor Dr. Ricardo Benavente, por me receber em seu laboratório na Universidade de Würzburg, Alemanha, onde utilizei o microscópio de super resolução. Também agradeço a sua aluna, Irene da Cruz, pelo apoio no desenvolvimento deste trabalho.

Aos membros da comissão examinadora pelas críticas e sugestões.

Ao meu namorado, Marcos, pelo companheirismo, compreensão, incentivo e amor.

E, finalmente, um agradecimento especial aos meus colegas do laboratório Genômica Integrativa (LGI). Vocês fizeram parte da minha vida durante a pós-graduação e contribuíram para minha formação. Vocês se tornaram minha família durante esses anos e tornaram o laboratório um ambiente único. Vou sentir muita falta. Meus inesquecíveis amigos: Aduino Cardoso, Bianca Carmelo, Bruno Fantinatti, Érica Ramos, Jornada Oliveira, Juliana Giusti, Maryan Farhan, Rafael Coan, Rafael Nakajimae Syed Farhan.

"Há coisas que são boas por alguns instantes, outras por algum tempo. Só algumas são para sempre."

Olavo de Carvalho

## Resumo

As células possuem um conjunto regular de cromossomos denominados cromossomos do complemento A e, eventualmente cromossomos extras a esse complemento. Uma destas classes de elementos extras é denominada de cromossomos B (Bs) e ocorrem em uma ampla diversidade de eucariotos incluindo fungos, plantas e animais. Desde sua descrição, os Bs tem atraído a atenção dos pesquisadores. Para ser classificado com um um cromossomo B, este deve apresentar algumas características como: ter uma morfologia distinta dos cromossomos As, número da cópia pode variar entre os indivíduos que o possuem, muitas vezes são heterocromáticos, não são homólogos ao complemento A, não se pareiam ou se recombinam aos As, e frequentemente exibem herança não-Mendeliana. Os cromossomos B tem sido descritos em diversos vertebrados, incluindo o peixe ciclídeo *Astatotilapia latifasciata*, natural dos lagos Kyoga e Nawampasa, lagos satélites ao lago Vitória no leste Africano, este ciclídeo possui 44 cromossomos e a presença de 1 a 2 cromossomos B. O objetivo deste trabalho foi investigar o comportamento meiótico dos cromossomos B via imunocoloração com anticorpos específicos contra proteínas do complexo sinaptonêmico, coesinas e modificações de histonas; cruzamentos direcionados entre machos e fêmeas com e sem B; e análise de expressão dos genes *synaptonemal complex protein 2-like*, *mitochondrial cardiolipin hydrolase-like*, *separin-like*, *tubulin beta-1 chain-like* e *kinesin-like*. A imunocoloração com os anticorpos H3K27me3 e H3K4me3 apresentou uma distribuição global na fase de paquíteno. Já o anticorpo H3K9ac apresentou-se de forma dispersa ao longo de todas as regiões da cromatina interfásica e mantido até o paquíteno da prófase I, onde está associada ao complexo sinaptonêmico. Utilizando-se da tecnologia de super resolução de iluminação estruturada (SIM) observamos, com o dobro da resolução, anticorpos específicos contra coesinas e proteínas do complexo sinaptonêmico. Todos os cromossomos, incluindo o B, apresentam a estrutura regular de complexo sinaptonêmico sendo estas fundamentais para garantir a progressão meiótica e a manutenção do cromossomo B na célula. A hipótese do auto pareamento do cromossomo B investigado foi confirmada e esse auto-pareamento é um mecanismo que possibilita que o cromossomo B se mantenha nas células durante a divisão meiótica. A partir dos dados de cruzamentos direcionados e análise estatística podemos inferir que existe um *drive* meiótico atuando na espécie *A. latifasciata*, sendo este mais intenso nas fêmeas. Além disso, a expressão de alguns genes presentes no cromossomo B apresentam-se mais intensa em fêmeas, evidenciando o envolvimento desses genes no controle da transmissão meiótica deste cromossomo.



## Abstract

The cells have a regular set of chromosomes known as A chromosomes. However, there are extra chromosomes and one of them is the extra elements called B-chromosomes (Bs) that occurs in a wide variety of eukaryotes including fungi, plants and animals. Since its description, Bs have attracted the attention of the researchers. To be classified as a B, some characteristics must be present such as: distinct morphology of A chromosomes, number of copy can vary between the individuals bearing it, they are often heterochromatic, they are not homologous to the A complement set, they did not pair or recombine with As, and often exhibit non-Mendelian heritage. B chromosomes have been described in several vertebrates, including the cichlid fish *Astatotilapia latifasciata*, native to Kyoga and Nawampasa lakes, satellite lakes to Victoria lake in East Africa, which has 44 chromosomes and the presence of 1 to 2 B chromosomes. This work aimed to investigate the meiotic behavior of B chromosomes via immunostaining with specific antibodies against synaptonemal complex proteins, cohesins and histone modifications; directed crosses between males and females with and without B; and gene expression analysis: *synaptonemal complex protein 2-like*, *mitochondrial cardiolipin hydrolase-like*, *separin-like*, *tubulin beta-1 chain-like* and *kinesin-like*. Immunostaining with antibodies H3K27me3 and H3K4me3 showed a global distribution in the pachytene phase. The H3K9ac antibody was dispersed throughout all the regions of the interphase chromatin and maintained until the pachytene, where it is associated with the synaptonemal complex. Using structured lighting super-resolution (SIM) technology, we observed, with double of the resolution, specific antibodies against cohesins and proteins of the synaptonemal complex. All chromosomes, including B, present the regular structure of the synaptonemal complex, which are fundamental to guarantee the meiotic progression and maintenance of the B chromosome in the cell. The self-pairing hypothesis of the investigated chromosome B has been confirmed and this self-pairing is a mechanism that allows the B chromosome to be maintained in the cells during the meiotic division. From the data of directed crossings and statistical analysis we can infer that there is a meiotic drive acting in the species *A. latifasciata*, being this more evident in females. In addition, the expression of some intact B chromosome genes is more intense in females, evidencing the involvement of these genes in the control of the meiotic transmission of chromosome B.

## Lista de figuras

- Figura 1: Fotomicroscopia de diferentes morfologias do cromossomo B em espécies distintas\_\_\_\_\_16
- Figura 2: Localização dos lagos africanos onde os peixes ciclídeos sofreram rápida radiação adaptativa\_\_\_\_\_19
- Figura 3: Estrutura do complexo sinaptonêmico\_\_\_\_\_22
- Figura 4: Resolução espacial de técnicas de imagem biológica\_\_\_\_\_23
- Figura 5: Franjas de Moiré: conceito de aprimoramento de resolução por iluminação estruturada\_\_\_\_\_27
- Figura 6: Análise meiótica em machos da espécie *Astatotilapia latifasciata*\_\_38
- Figura 7: Modificações de histona em *Astatotilapia latifasciata*\_\_\_\_\_42
- Figura 8: Imunodeteção com anticorpo contra proteínas coesinas (SCM3)\_\_\_43
- Figura 9: Fotomicroscopia de super resolução da imunolocalização das proteínas do complexo sinaptonêmico\_\_\_\_\_44
- Figura 10: Fotomicroscopia de super resolução da imunodeteção com o anticorpo SYCP3 seguida de hibridização *in situ* com sonda específica do cromossomo B\_\_\_\_\_45
- Figura 11: Distribuição das proles geradas por meio dos cruzamentos\_\_\_\_\_48
- Figura 12: : Análise da diferença de expressão dos genes *synaptonemal complex protein 2-like*, *separin-like*, *kinesin-like KIF11-like*, *tubulin beta-1 chain-like* e *mitochondrial cardiolipin hydrolase-like*\_\_\_\_\_51

## Lista de tabelas

Tabela 1: Anticorpos primários e secundários aplicados à técnica de imunocoloração\_\_\_\_\_31

Tabela 2: Esquema de cruzamentos dialélicos de genitores quanto ao número de cromossomos Bs (0B, 1B)\_\_\_\_\_33

Tabela 3: Lista de *Primers* dos genes candidatos usados para o ensaio de nível de expressão\_\_\_\_\_35

Tabela 4: Dados dos cruzamentos direcionados entre indivíduos com e sem cromossomo B\_\_\_\_\_46

Tabela 5: Razões de chances para um filhote ser B positivo\_\_\_\_\_47

Tabela 6: Interpretação da análise estatística sobre a diferença de expressão de genes presente no cromossomo B\_\_\_\_\_50

## Sumário

<b>1. Introdução</b>	<b>13</b>
1.1. Cromossomos supranumerários ou B	13
1.2. Peixes Ciclídeos como material de estudo	18
1.3. Análise meiótica e imunodeteção aplicadas ao cromossomo B	21
<b>2. Justificativa</b>	<b>28</b>
<b>3. Hipóteses</b>	<b>28</b>
<b>4. Objetivos</b>	<b>29</b>
4.1. Objetivos gerais	29
4.2. Objetivos específicos	29
<b>5. Material e Métodos</b>	<b>29</b>
<b>5.1. Material</b>	<b>29</b>
<b>5.2. Métodos</b>	<b>30</b>
5.2.1. Extração de DNA segundo Sambrook <i>et al.</i> (1989) com modificações.	30
5.2.2. Genotipagem	30
5.2.3. Preparação de cromossômico meióticos e imunodeteção.	31
5.2.4. Hibridização <i>in situ</i> após imunocoloração	33
5.2.5. Cruzamentos dialélicos e análise estatística	33
5.2.6. Confeção dos <i>primers</i>	35
5.2.6. Extração do RNA e síntese de cDNA	36
<b>6. Resultados e Discussão</b>	<b>37</b>
<b>6.1. Comportamento meiótico do cromossomo B em <i>Astatotilapia latifasciata</i></b>	<b>37</b>
6.1.1. Imunolocalização e análises meióticas de alta resolução	38
6.1.2. Segregação cromossômica via cruzamentos dirigidos e <i>drive</i>	47
<b>6.2. Análises de expressão de genes envolvidos com ciclo celular</b>	<b>50</b>
<b>7. Conclusão final</b>	<b>53</b>
<b>8. Referências:</b>	<b>53</b>
<b>9. Material suplementar</b>	<b>62</b>

## 1. Introdução

### 1.1. Cromossomos supranumerários ou B

Wilson foi o primeiro a observar um cromossomo supranumerário no inseto *Metapodius* (WILSON, 1907) e desde sua descrição esses cromossomos tem atraído a atenção dos pesquisadores. Porém, o termo cromossomo supranumerário ou B foi incorporado a partir 1928 quando Randolph usou o termo para distingui-los dos cromossomos autossomos regulares (As) do cariótipo (RANDOLPH, 1928).

O conjunto regular de cromossomos é denominado cromossomos do complemento A e os cromossomos B são chamados de elementos extra a esse complemento. Existem algumas características importantes que um cromossomo deve possuir para ser identificado como um cromossomo B e não outra classe de cromossomo especial, como cromossomo sexual ou segmento cromossômico. Segundo revisão recente (DOUGLAS, BIRCHLER, 2017), as características abaixo definem cromossomos B.

1- Bs são cromossomos não essenciais, são dispensáveis para o genoma. Não são encontrados em todos os membros de uma população e o número de cópias pode variar entre os indivíduos que possuem Bs. Na verdade, o número de Bs podem até variar entre as células de um indivíduo (MENDELSON, ZOHARY 1972; OHTA 1996; VUJOŠEVIĆ, BLAGOJEVIĆ 2004).

2-Bs tem uma morfologia distinta dos cromossomos As e muitas vezes são heterocromáticos. Além disso, os Bs não são homólogos aos As, não se pareiam ou se recombinam com os cromossomos do complemento A durante a meiose (JONES, REES 1982; VUJOŠEVIĆ, BLAGOJEVIĆ 2004).

3- Bs frequentemente exibem herança não-Mendeliana. Nas plantas, isso geralmente ocorre por não-disjunção pós-meiótica em gametófitos, mas também pode ocorrer pré-meiose como no gafanhoto *Locusta migratoria* ou durante a meiose como no lírio *Lilium callosum* ou depois da fertilização do oócito como na vespa parasita *Nasonia vitripennis*. Poucos mamíferos com Bs exibem mecanismos de direção, mas os que possuem esse mecanismo de migração preferencial o exibem na fêmea, e este é denominado *drive* meiótico (KAYANO 1957; NUR 1963; NUR *et al.* 1988; JONES 1991; VUJOŠEVIĆ, BLAGOJEVIĆ 2004).

Portanto, os cromossomos B são definidos como supranumerários dispensáveis para o genoma, não homólogos aos cromossomos A, e ainda, têm sido caracterizados por apresentarem diferentes morfologias, são herdados por mecanismos não Mendelianos, frequência variável e por não carregarem genes com grandes efeitos (**figura 1**). As características apontadas aqui foram discutidas na primeira conferência internacional sobre cromossomo B em 1993, na Espanha (1st B Chromosome Conference), e continuam sendo discutidas e atraindo mais esforços para responder as questões sobre a evolução do cromossomo B nas diferentes espécies, se esses cromossomos carregam genes, se são ativos, se codificam proteínas, como se mantém na célula, etc.

O cromossomo B está presente em 15% dos eucariotos (BEUKEBOOM, 1994) e grande parte das espécies conhecidas com Bs pertencem ao Reino Vegetal. Um último levantamento feito por Jones (2017), desde a década de 1982 até o presente, 406 novas espécies foram descritas com B, totalizando 1685 espécies. Como já mencionado, as angiospermas representam a maioria com 66% das espécies com B, em menor quantidade, porém não menos significativo estão os animais com 32%. Dentre estes, mais de 100 espécies de peixes já foram descritas com cromossomos B e em sua maioria estudos provenientes do Brasil (JONES, 2017).

Pelo fato dos Bs serem componentes dispensáveis do genoma, o papel que eles desempenham na vida do hospedeiro tem sido de grande interesse para os pesquisadores. Os Bs podem ter efeitos negativos, neutros ou positivos em seu hospedeiro e muitas vezes são vistos como elementos egoístas ou parasíticos que sequestram a maquinaria celular necessária para se replicar e se transmitir às células filhas (ÖSTERGREN, 1945; JONES, REES 1982; CAMACHO *et al.* 2000).

Geralmente, à medida que o número de Bs aumenta, o tamanho da célula e sua massa também aumentam (MÜNTZING, AKDIK; 1948), o tempo necessário para completar a mitose aumenta (EVANS *et al.* 1972), e os níveis de proteína nucleolares e de RNA diminuem (KIRK, JONES, 1970). Possivelmente, a idéia de que Bs são elementos parasitas foi apoiada por numerosos casos em que a presença de Bs, especialmente em números elevados, é prejudicial para o hospedeiro e causa redução do desempenho da célula (JONES, REES; 1982).

Além disso, a visão de que o B não é essencial ao genoma vem de algumas evidências de que as alterações nos cromossomos do complemento A podem causar fenótipos distorcidos, já a presença do B não estava associada a nenhum fenótipo até então (SIEGEL, AMON 2012). Evidências como esta levantaram hipóteses de que Bs não possuíam função para a célula, no entanto com o avanço dos estudos essa visão foi modificada.

No fungo *Nectria haematococca*, Bs são responsáveis pela resistência a antibióticos e a patogenicidade (COLEMAN *et. al.*, 2009). Foi demonstrado também, que a presença de Bs diminui a atividade de enzimas antioxidantes na planta *Acanthophyllum laxiusculum* sob condições de estresse por salinidade (MERATAN *et. al.*, 2013).

Em centeio, estudos genômicos demonstraram que o cromossomo B desta espécie é rica em sequências derivadas de genes. Comparando essas sequências com a espécie ancestral de centeio comprovou-se que essas sequências têm origem do complemento A ancestral e que 15% desses fragmentos (pseudogenes) são transcritos no genoma do hospedeiro. Provavelmente existe uma compensação na dosagem dos transcritos independente do número de cópias (BANAEI-MOGHADDAM *et. al.*, 2013).

Em insetos, Camacho *et. al.*, (2011) sugerem que o cromossomo B, em muitos casos, se assemelha ao cromossomo sexual. Eles apresentam pontos de condensação e descondensação durante a meiose assim como o cromossomo X, além disso, a origem do cromossomo sexual a partir do cromossomo B também foi sugerida com base em extensa revisão de dados da literatura.

Além de Camacho, Yoshida *et. al.*, (2011) associou cromossomos B à cromossomos sexuais. Estudos com os peixes ciclídeos do lago Vitória demonstrou que os cromossomos B têm um efeito funcional na determinação do sexo feminino e a análise de FISH usando um clone BAC contendo DNA do cromossomo B sugeriu que os cromossomos B são derivados de cromossomos sexuais. Determinação de sequências deste clone (104,5 kb) revelaram a presença de vários genes codificadores de proteínas no cromossomo B, sugerindo que os cromossomos B têm o potencial de conter genes funcionais. Como alguns cromossomos sexuais de anfíbios e artrópodes são considerados derivados dos cromossomos B, os cromossomos B em ciclídeos do Lago

Victoria podem representar uma transição evolutiva para a geração de cromossomos sexuais (YOSHIDA *etal* 2011).

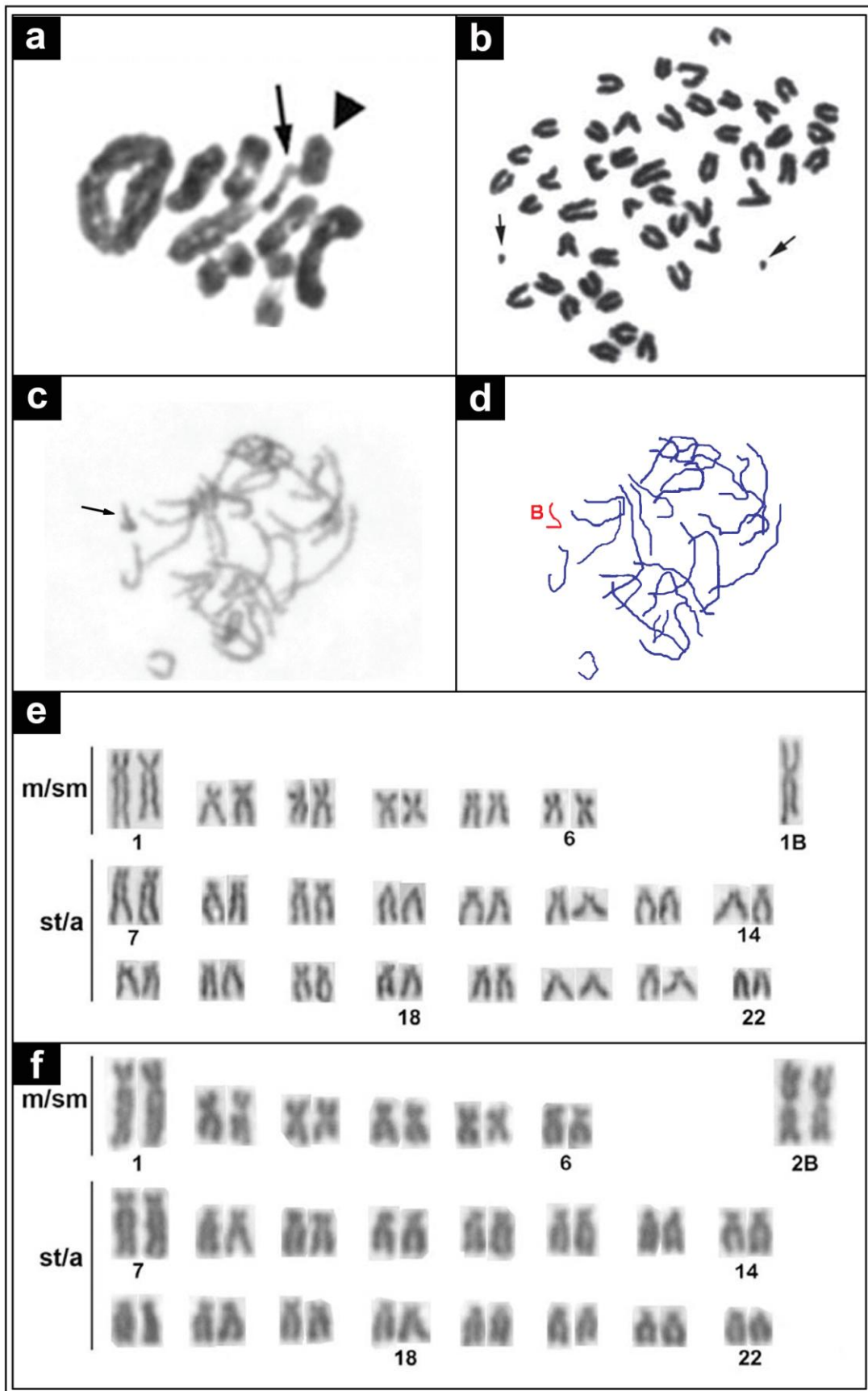
Clark *et. al.*, (2017) caracterizaram o cromossomo B de várias espécies de ciclídeos do lago Malawi do leste da África por meio do sequenciamento genômico e identificaram blocos de DNA que se repetiam somente nas fêmeas que carregam o cromossomo B (*B-carriers*). Das sete espécies com cromossomo B, 43 fêmeas das 323 investigadas possuíam o B e nenhum macho dos 317 investigados carregam esses fragmentos de B. Ou seja, a presença do cromossomo B é exclusivo das fêmeas e essas sequências originam um único cromossomo B. A presença do B envolve dois mecanismos de *drive*: um envolvendo não-disjunção e segregação preferencial na divisão mitótica e a outra envolvendo segregação preferencial durante a meiose I.

Segundo Houben (2017), apesar dos possíveis efeitos negativos do B, eles se mantêm na célula porque conta com um mecanismos de *drive* que o seleciona. Eles não se recombinaem na meiose e, portanto, tem seu próprio caminho evolutivo.

Sendo assim, mecanismos que promovem a manutenção e transmissão do cromossomo B na célula pode ser a chave para entender a maioria dos Bs. Na tentativa de entender o cromossomo B da espécie *Astatitilapia latifasciata*, propomos estudar o comportamento do cromossomos B durante a divisão meiótica por meio de análises do complexo sinaptonêmico, utilizando para isso microscopia de super resolução. Bem como, observar padrões de modificações de histona que possam estar envolvidas com silenciamento deste cromossomo.

Juntamente com as análises meióticas, cruzamentos direcionados entre indivíduos com e sem cromossomos B foram conduzidos na tentativa de ilustrar um padrão de segregação e se existe um mecanismos *drive* atuando durante esse processo de divisão celular. Além disso, análises de expressão diferencial de genes do ciclo celular presentes no cromossomos B, também foram conduzidos. A expressão diferencial destes também podem estar atuando na manutenção e permanência do B na célula.





**Figura 1:** Fotomicroscopia de diferentes morfologias do cromossomo B em espécies distintas. **a)** Metáfase I da meiose em macho do coleóptero *Dicotomius geminatus* (cabeça de seta indica o cromossomo B), o cromossomo tem um padrão de condensação semelhante ao dos autossomos, mas foi facilmente reconhecido como

elemento univalente na metáfase I e foi freqüentemente observado fora do bloco formado por autossomos (Fonte: CABRAL-DE-MELLO *et al.* 2010). **b)** Metáfase da mitose do peixe *Poecilia formosa*, setas indicam 2 microcromossomos B (Fonte: LAMATSCH *et al.* 2011). **c)** Fase de paquíteno da espécie de ciclídeo *Crenicichla lepidota*, seta indica o cromossomo B isolado dos bivalentes. **d)** Esquema representando os cromossomos da foto “c” (Fonte: PIRES *et al.* 2015). **e, f)** Cariótipos da espécie de peixe, foco deste estudo, *Astatotilapia latifasciata* com 44 cromossomos e 1 ou 2 cromossomos B (Fonte: POLETTTO *et al.*, 2010).

## **1.2. Peixes Ciclídeos como material de estudo**

Os peixes vivem em quase todo tipo de ambiente aquático, desde os grandes oceanos, lagos, rios, riachos e até pequenas poças d’água no deserto. Como consequência da adaptação a esses diversos habitats, os peixes possuem grandes variedades morfológica e diversidade de espécies. Essas características fazem com que a compreensão da sua sistemática e história evolutiva seja um tema ainda muito discutido, tornando-os um excelente modelo nos estudos voltados a questões adaptativas, taxonômicas e evolutivas (POUGH *et al.* 2003; NELSON, 2006).

A família Cichlidae, pertencente à ordem Perciformes, contém mais de 3.000 espécies distribuídas pela América do Sul e Central, sudeste da Índia, Madagascar e África. As espécies presentes nos grandes lagos africanos (Malawi, Tanganyka e Victoria) sofreram uma rápida radiação adaptativa, o que tornou estes peixes um modelo fundamental para os estudos de biologia evolutiva e de grande interesse para a citogenética (**figura 2**).

Em relação à análise de cromossomos B em representantes da família Cichlidae, os mesmos foram descritos em diversas espécies pertencentes à subfamília sul-americana (Cichlinae), tais como *Gymnogeophagus balzanii* (FELDBERG, BERTOLLO, 1984), *Geophagus brasiliensis*, *Cichlasoma paranaensis*, *Crenicichla niederleinii* (MARTINS-SANTOS *et al.*, 1995), *Cichla monoculus*, *Cichla* sp. e *Crenicichla reticulata* (FELDBERG *et al.*, 2004), *Crenicichla lepidota* (PIRES *et al.* 2015; PERAZZO *et al.*, 2018) e em espécies da subfamília africana Pseudocrenilabrinae, como *Astatotilapia latifasciata*, *Metriaclima lombardoi* (POLETTTO *et al.*, 2010; FANTINATTI *et al.*, 2011; CLARK *et al.* 2017), *Metriaclima zebra* "Boadzulu", *Metriaclima greshakei*, *Metriaclima mbenji*, *Labeotropheus trewavasae*, *Melanochromis auratus*, *Metriaclima zebra* "Nkhata Bay" (CLARK *et al.* 2017), *Lithochromis rubripinnis*, *Haplochromis plagiodon*, *Pundamilia pundamilia*, *Haplochromis pyrrhocephalus*, *Neochromis greenwoodi*, *Haplochromis tanaos*, *Lithochromis rufus*,

*Haplochromis* sp. 'purpleyellow', *Neochromis rufocaudalis*, *Haplochromis* sp. "Matumbi Hunter" e *Haplochromis fisheri* (YOSHIDA *et al.*, 2011), variando em quantidade de 1-3.

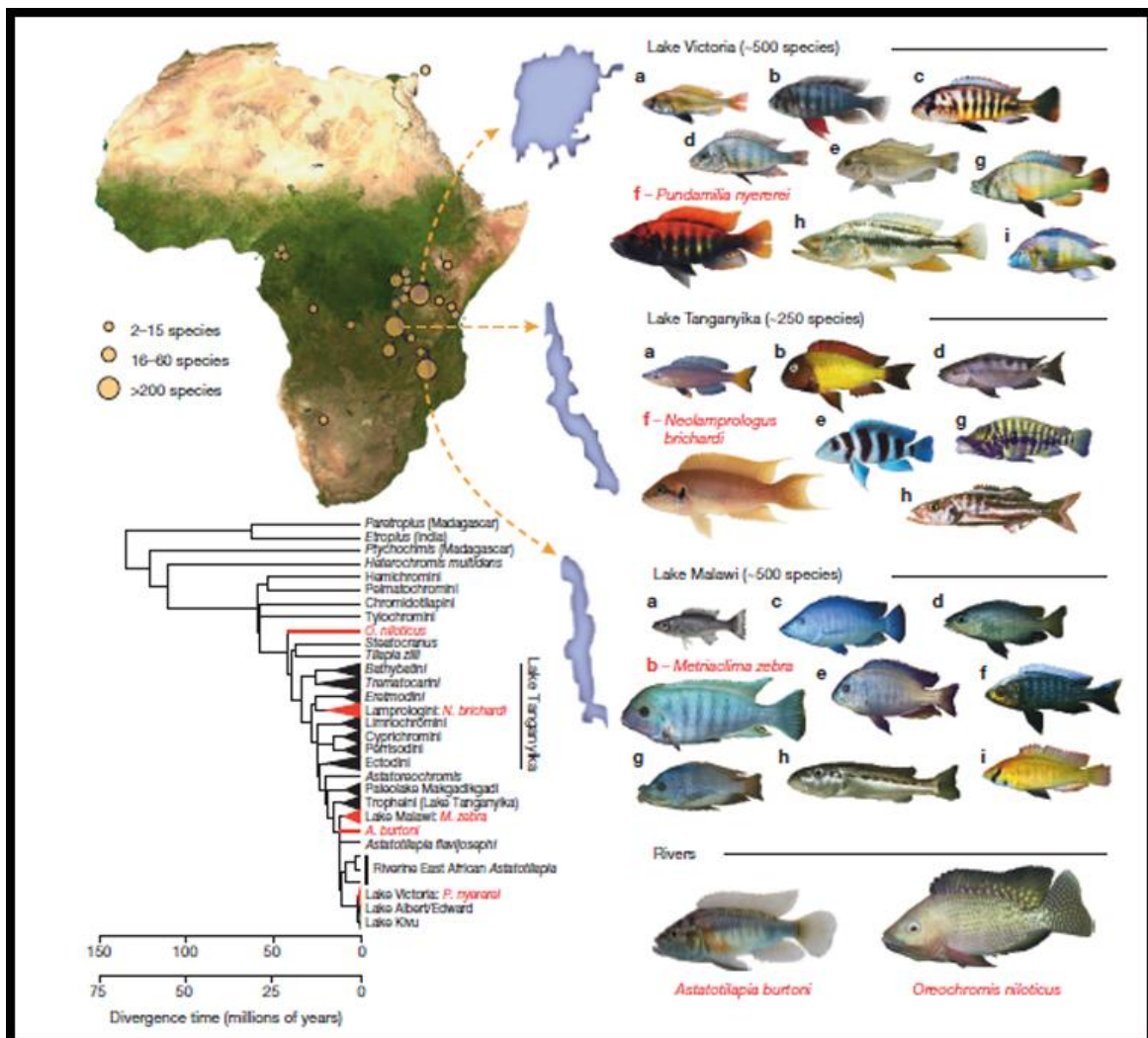
A espécie *Astatotilapia latifasciata* natural dos lagos Kyoga e Nawampasa, lagos satélites ao lago Vitória no leste Africano (STEEVES *et al.* 2010), possui cariótipo padrão constituído por 44 cromossomos, sendo 14 meta-submetacêntricos e 30 subtelo-acrocêntricos, sem cromossomos sexuais diferenciados morfológicamente (**figura 1e, f**). Alguns indivíduos desta espécie possuem um ou dois cromossomos B metacêntricos, caracterizado como o maior do complemento, com tamanho de 3,35 µm, o que corresponde a 6,48% do genoma total, e que se mostram totalmente heterocromáticos e constantes em todas as células dos indivíduos que as possuem (FANTINATTI *et al.*, 2011).

Mapeamento físico cromossômico indica acúmulo de sequências repetitivas nestes cromossomos, incluindo DNA ribossomal 18S inativo. Esta abordagem também revela uma relação estreita entre o conteúdo genômico do cromossomo B e o maior cromossomo do complemento A (par1). Deste modo, sugere-se que estes elementos supranumerários tenham surgido por aneuploidia de algum cromossomo do complemento A, seguido por perda de eucromatina, formando um proto-cromossomo B. Posteriormente, ocorreu ganho de sequências repetitivas em um braço cromossômico seguido da formação de um isocromossomo (POLETTI *et al.*, 2010; FANTINATTI *et al.*, 2011).

Investigando com mais detalhes o conteúdo de cromossomos B de *A. latifasciata*, um estudo usando abordagens genômicas integradas, dentre elas o sequenciamento de genomas inteiros, foi conduzido e revelou que além do acúmulo de sequências repetitivas existem também cópias gênicas com alta integridade e de fragmentos de genes nos cromossomos supranumerários (VALENTE *et al.* 2014). Mais recentemente foram sequenciadas bibliotecas de pequenos (FANTINATTI, MARTINS; 2016) e longos RNAs (MARQUES, 2015) de diversos tecidos, indicando que cromossomos supranumerários afetam a expressão de genes e de miRNAs, revelando aspectos funcionais destes elementos. Outros estudos revelam a diversidade de sequências presentes nestes elementos, como a presença de retrogenes (CARMELLO *et al.*, 2017) e genes de RNAs longos não codificadores (RAMOS *et al.* 2017).

Assim, este conjunto de abordagens diversificadas e complementares tem tornado a espécie *A. latifasciata* um modelo importante na compreensão da origem, evolução e função de cromossomos B.

Até o momento abordagens citogenéticas e genômicas vem somando para ajudar a esclarecer a origem evolutiva do cromossomo B e sua constituição genômica. Porém, poucos tentam responder como o cromossomo B se mantém na célula e quais mecanismos eles utilizam para isso. Investigar a divisão meiótica, o processo de segregação dos cromossomos e a atuação de alguns genes nesses momentos específicos pode ajudar a entender melhor o cromossomo B das espécies.



**Figura 2:** Localização dos lagos africanos onde os peixes ciclídeos sofreram rápida radiação adaptativa. Destaque para o lago Victoria, onde encontra-se os lagos satélites Kyoga e Nawampasa no qual a espécie *Astatotilapia latifasciata*, foco deste estudo, foi descrita (fonte: BRAWAND *et al.*, 2014). Na imagem a direita, as cinco espécies que foram sequenciadas por Brawand *et al.* (2014): *Pundamilia nyererei* (endêmica do lago Victoria); *Neolamprologus brichardi* (endêmica do lago Tanganyika); *Metriaclima zebra* (endêmica do lago Malawi); *Oreochromis niloticus* (dos rios do norte da África); *Astatotilapia burtoni* (de rios que se conectam com o lago Tanganyika). Principais ecótipos de cada lago: **a)** pelágico; **b)** raspador de algas; **c)**

carnívoro (ausente no lago Tanganyika); **d)** triturador; **e)** comedor de caracol; **f)** comedor de plantas de recife; **g)** comedor de insetos **h)** comedor de organismos pelágicos; **i)** ancestral dos rios também encontrado em lagos (ausente do lago Tanganyika). A esquerda, árvore filogenética que ilustra as relações entre as cinco espécies sequenciadas (vermelhas), grandes radiações adaptativas e grandes linhagens dos rios.

### **1.3. Análise meiótica e imunodeteção aplicadas ao cromossomo B**

A maioria dos organismos eucarióticos se reproduzem sexualmente, um processo que envolve a fusão de gametas dos dois sexos para formar um novo organismo. Um pré-requisito é o complemento cromossômico tornar-se reduzido de diplóide á haplóide durante a diferenciação celular gamética. Este tipo especial de divisão celular chama-se meiose (FRAUNE *et al.* 2012).

A meiose começa com uma célula-mãe que é diplóide, o que significa que tem duas cópias de cada cromossomo. A célula-mãe sofre uma rodada de replicação de DNA seguida de dois ciclos separados de divisão nuclear. O processo resulta em quatro células-filhas que são haplóides, o que significa que elas contêm a metade do número de cromossomos da célula diplóide. O processo é dividido em meiose I e meiose II, e ambas as divisões meióticas têm diferentes fases. A meiose I é um tipo de divisão celular exclusiva das células germinativas, enquanto a meiose II é similar à mitose.

Esse processo é essencial para produzir gametas com o número exato de cromossomos. Nos humanos, 30% dos abortos espontâneos são resultados de eventos de segregação cromossômica incorreta (GERTON, HALLEY 2005). Alguns exemplos desta segregação incorreta, porém viáveis, são as síndromes de Down (trissomia do cromossomo 21), Turner (monossomia do cromossomo X) e Klinefelter (XXY).

Na maioria dos organismos a segregação incorreta dos cromossomos inviabiliza o desenvolvimento celular, embora, as características essenciais da meiose como, emparelhamento, *cross-over* e recombinação de homólogos é conservada nos diferentes grupos taxonômicos. Presume-se, que a meiose evoluiu apenas uma vez nos Eucariotos (WILKINS, HOLLIDAY; 2009).

A maquinaria de recombinação meiótica, que é responsável pelo *crossing-over* mostra uma forte conservação evolutiva e pode ser encontrada na meiose nos organismos modelo *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* e em mamíferos com pouca variação (VILLENEUVE, HILLERS, 2001; COLE *et al.* 2010).

As células que se replicam por meiose, independente da espécie, utilizam de recursos especializados que permitem a progressão para outras fases. Como por exemplo, as cromátides-irmãs são mantidas unidas tanto na meiose quanto na mitose por complexo de proteínas coesinas. Um exemplo exclusivo da meiose é que os cromossomos homólogos devem ser identificados e pareados corretamente para, posteriormente, se separar na primeira divisão da meiose (meiose I), os cromossomos homólogos interagem através da recombinação e ainda assim, devem se segregar corretamente na meiose I. A primeira divisão é seguida da dissolução da coesão entre os cromossomos homólogos e segregação das cromátides-irmãs progredindo para a segunda divisão meiótica (GERTON, HALLEY, 2005).

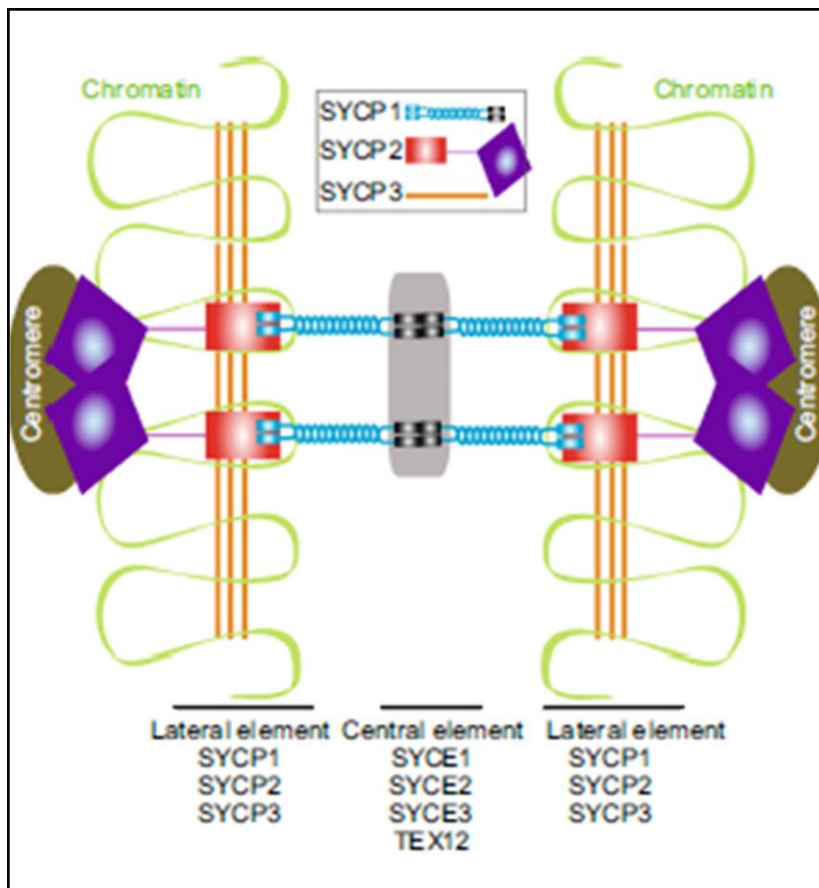
O mecanismo de homologia ainda não é bem compreendido, mas a montagem de uma estrutura protéica conhecida como complexo sinaptonêmico, que medeia sinapses de homólogos, é um importante facilitador ou estabilizador de emparelhamento homólogo (HUNTER, 2003; HANDEL, SCHIMEDNTI, 2010).

O complexo sinaptonêmico é uma estrutura protéica meiose-específica bem conservada entre diferentes espécies (WILKINS, HOLLIDAY, 2009; VILLENEUVE, HILLERS, 2001). Como revelado por microscopia eletrônica de transmissão, quando totalmente montados, os complexos sinaptonêmicos formam estruturas semelhantes a fitas de 200 nm de espessura que se estendem ao longo de um cromossomo bivalente (COLE *et al.* 2013; HOUTER, 2003). O complexo sinaptonêmico têm uma organização característica em escalas que é altamente conservada através de evolução e consiste em dois elementos laterais, em que a cromatina de cromossomos homólogos é anexada à uma região central. A região central mantém os cromossomos homólogos juntos e é constituído por numerosos filamentos transversais e o elemento central.

Atualmente, sete componentes protéicos do complexo sinaptonêmico foram identificados em mamíferos: as proteínas mais presentes no elemento lateral são SYCP2 e SYCP3 (LAMMERS *et al.*, 1994; OFFENBERG *et al.*, 1998); a proteína do filamento transversal é SYCP1 (MEUWISSEN *et al.*, 1992); e as proteínas do elemento central são SYCE1, SYCE2, SYCE3 e TEX12 (COSTA, *et al.* 2005; HAMER *et al.* 2006; SCHRAMM *et al.* 2011) -

**Figura3.**



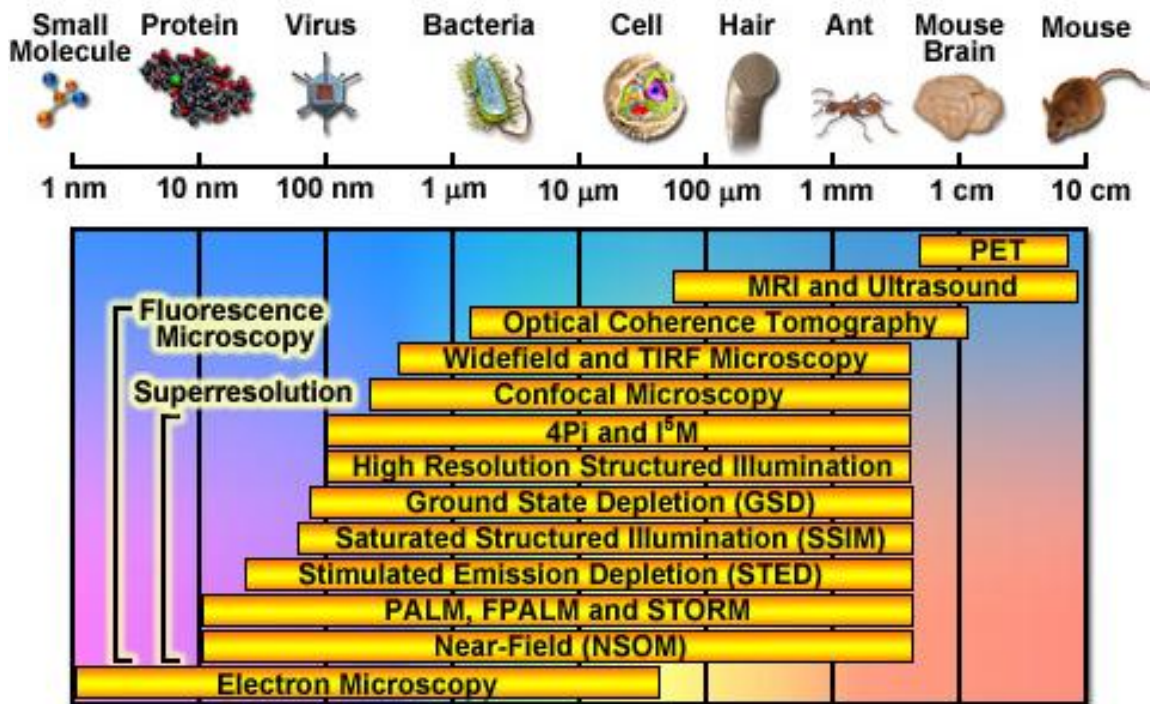


**Figura 3:** Estrutura do complexo sinaptonêmico mostrando as principais proteínas presentes no elemento lateral (SYCP3), central (SYCP1) e a cromatina associada a ele (fonte: FENG *et al.*, 2017).

Dados de identificação do complexo sinaptonêmico vem sendo explorado em diferentes espécies. Em peixe existem algumas descrições como em *Prochilodus lineatus* (DIAS *et al.*, 1995), *Orzias latipes* (IWAI *et al.*, 2006), *Oreochromis niloticus* (OCALEWICZ *et al.*, 2009; ARAYA-JAIME *et al.*, 2015), *Eigenmannia sp2*, *Astyanax paranae* e *Characidium gomesi* (ARAYA-JAIME *et al.*, 2015; SERRANO *et al.*, 2016). Estes trabalhos tiveram como objetivo esclarecer o comportamento e pareamento de cromossomos sexuais ou cromossomos B, bem como, demonstrar montagem da estrutura do complexo sinaptonêmico por meio da imunocoloração. No entanto, estas análises estão restritas a microscopia eletrônica ou convencional de fluorescência.

A microscopia de fluorescência é uma ferramenta inestimável para a biologia. Ela é essencial para examinar uma grande variedade de moléculas, caminhos e dinâmicas biológicas em células vivas, tecidos e animais inteiros. Em contraste com outras técnicas (como o microscópio eletrônico), a imagem de fluorescência é compatível com células que estão sendo mantidas em cultura, o que permite a observação óptica de eventos minimamente invasivos

ocorrendo em uma grande extensão de escalas de tempo. Em termos de resolução espacial, várias técnicas, incluindo tomografia por emissão de pósitrons, ressonância magnética e tomografia óptica, podem gerar imagens de animais e humanos em resoluções entre 10 centímetros e 10 micrômetros, enquanto que as técnicas de microscopia eletrônica e sonda de varredura apresentam maior resolução, muitas vezes aproximando-se dos níveis molecular e atômico (**figura 4**).



**Figura 4:** Resolução espacial de técnicas de imagem biológica. Fonte: ZEISS.

Entre estes dois extremos no poder de resolução encontra-se o microscópio óptico. Além dos benefícios derivados da capacidade de imagem das células vivas, a desvantagem mais significativa para todas as formas de microscopia de fluorescência (incluindo o campo largo, a varredura a laser, o disco giratório, a multiphoton e a reflexão interna total) são os limites da resolução espacial que foram elucidados pela primeira vez e descrito por Ernst Abbe no final dos anos 1800.

Atualmente, as técnicas modernas e bem estabelecidas de microscopia de fluorescência podem facilmente proporcionar a visualização de uma variedade de características em células e tecidos isolados, como o núcleo, a mitocôndria, o complexo de Golgi, o citoesqueleto e o retículo endoplasmático. Várias imagem em fluorescência são freqüentemente usados para acompanhar



dinamicamente proteínas e peptídeos de sinal, bem como para monitorar outras interações em células vivas. A resolução espacial limitada, no entanto, exclui a capacidade de visualizar estruturas importantes, incluindo vesículas sinápticas, ribossomos ou interações moleculares, que apresentam intervalos de tamanho que se situam sob os limites da detecção em microscopia de fluorescência (INGARAMO *et al.* 2014).

Esse limite de difracção do microscópio óptico foi superado por meio de duas estratégias. A primeira estratégia foi a utilização de conjuntos lentes para se obter mais informação da amostra analisada e assim surgiu o microscópio confocal. O microscópio é capaz de focar um cone de luz laser em uma profundidade pré-determinada da amostra a ser estudada. Mudando-se o ponto focal (mantendo a profundidade) é possível iluminar todo o plano em estudo, ponto a ponto. Ao retornar pelo mesmo caminho óptico, a luz devida á fluorescência é separada utilizando-se um conjunto de espelhos chamados *divisor de luz*. Em seguida a luz separada passa por um pequeno orifício, chamado *pinhole*, capaz de separar apenas a luz proveniente do ponto focado, eliminando a luz emitida por pontos fora de foco. Com isso só a luz dos pontos em foco é registrada, com a ajuda de tubos fotomultiplicadores. Estes sinais gerados pelas fotomultiplicadoras são processados por um computador e assim imagens bidimensionais extremamente precisas podem ser construídas (PAWLEY, 2006).

No início da década de 1990, os instrumentos com objetivas opostas desenvolvidos por Stefan Hell, Mats Gustafsson, David Agard e John Sedat (técnicas denominadas 4Pi e I5M) conseguiram alcançar uma melhoria na resolução axial de cerca de 100 nanômetros usando configurações confocal e widefield, respectivamente. No entanto, mesmo que esses instrumentos tenham sido capazes de produzir um aumento de cinco vezes na resolução axial, a resolução lateral permaneceu não melhorada (CHOWDHURY *et al.*, 2017).

A segunda estratégia foi avançar em qualidade de iluminação e na resolução lateral, dando início a tecnologia de super resolução. Como já mencionado, na década de 1990, a tecnologia de microscópio fundamentalmente nova, pioneira por Stefan Hell, conseguiu superar o limite de difracção de resolução lateral, o que, em última instância, levou a uma revolução na microscopia de fluorescência. Como resultado, foram introduzidas uma

ampla gama de metodologias novas que agora são designadas coletivamente microscopia de super resolução e apresentam resolução lateral e axial medidas em dezenas de nanômetros e até menos. O que é compartilhando em todas essas novas técnicas é que eles são capazes de capturar imagens abaixo do limite de difração ao alternar os fluoróforos *on* e *off* sequencialmente no tempo para que os sinais possam ser gravados consecutivamente (GUSTAFSSON, 2000).

Os avanços mais significativos na imagem de super resolução foram alcançados no que é chamado de microscopia de campo distante e envolvem modulação espacial ou temporária da transição entre dois estados moleculares de um fluoróforo (como mudar entre um estado escuro e brilhante) ou reduzindo fisicamente o tamanho da função de propagação de pontos utilizada na iluminação de excitação. Entre os métodos que melhoram a resolução por modificação da propagação de pontos ou PSF (*point-spread function*), as técnicas mais importantes são referidas pelas siglas STED (depleção de emissão estimulada, do laboratório de Stefan Hell) e SSIM (microscopia de iluminação estruturada saturada, iniciada por Mats Gustafsson). As técnicas que dependem da detecção e da localização precisa de moléculas únicas incluem PALM (microscopia de localização fotoativada, introduzida por Eric Betzig e Harald Hess) e STORM - microscopia de reconstrução óptica estocástica, relatada pela primeira vez por Xiaowei Zhang (CHOWDHURY *et al.*, 2017).

Especificamente sobre a tecnologia de super resolução por Microscopia de Iluminação Estruturada (Structured Illumination Microscopy - SIM) utilizada neste trabalho, esta é baseada num padrão de iluminação através de franjas de Moiré (*Moiré fringes*). Padrões de Moiré são imagens produzidas quando um observador observa através de duas estruturas periódicas sobrepostas em movimento, com padrões semelhantes a ondas, a formação de franjas claras e escuras, denominadas franjas de Moiré (**figura 5**). Quando essa superposição ocorre formando um pequeno ângulo de interseção entre as linhas dos dois retículos, pequenos deslocamentos em um dos dois retículos provocará grandes deslocamentos nas franjas de moiré, isto é, o deslocamento será magnificado (GUSTAFSSON, 2000).

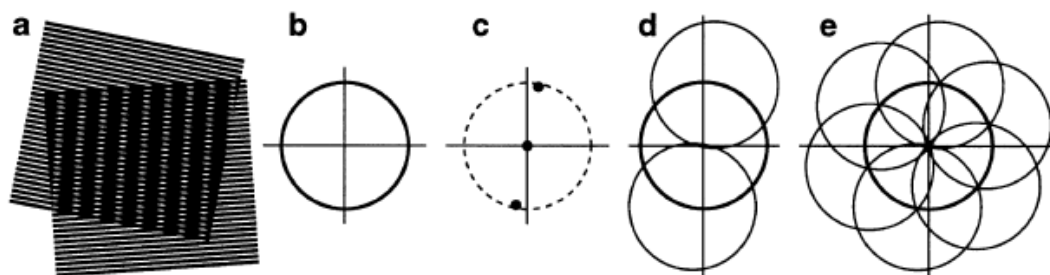
O conceito da Microscopia de Iluminação Estruturada pode ser bem compreendido por meio do conhecimento do efeito Moiré. Quando a amostra é

iluminado, a imagem que é vista através do microscópio contém, além da imagem normal, as informações das franjas de moiré. A região observável agora contém não apenas as informações usuais, mas também informações que se originam duas regiões deslocadas (**figura 5d**). As partes desses círculos deslocados que se encontram fora da região normalmente observável representam informação nova que não é acessível em um microscópio convencional. A imagem observada é uma soma dessas contribuições, e não é possível separá-los usando uma única imagem. No entanto, os coeficientes pelos quais são adicionados em conjunto depende da fase (conhecida e controlável) da luz de iluminação estrutura. Ao gravar três ou mais imagens da amostra com diferentes fases de iluminação, os componentes podem ser separados por aritmética, e as informações restauradas. (GUSTAFSSON, 2000).

Se a distância de deslocamento for escolhida para ser o maior possível (ou seja, a iluminação padrão escolhido é o melhor possível), é possível acessar informações para dobrar a resolução normal na direção do padrão. Ao repetir esta ou mais vezes com o padrão orientado em diferentes direções, pode-se reunir essencialmente toda a informação dentro de um círculo duas vezes maior como a região observável fisicamente (**figura 5e**). Com Esta informação, uma imagem da amostra pode ser reconstruída ao dobro da resolução normal (GUSTAFSSON, 2000; CHOWDHURY *et al.*, 2017).

Existem muitas variações nessas técnicas, bem como métodos avançados que podem combinar ou mesmo melhorar o desempenho de esquemas de imagem existentes.

Considerando a ampla distribuição de cromossomos B entre as mais variadas formas de vida, torna-se relevante entender o comportamento meiótico deste cromossomo através da investigação do pareamento cromossômico, organização da estrutura de pareamento e se existe algum padrão de silenciamento do B por meio da técnica de imunodeteção combinada com a tecnologia de microscopia de super resolução. Além disso, a investigação do padrão de segregação e a atuação do B na expressão de genes envolvidos com o ciclo celular, também se mostram interessantes. Tais investigações visão contribuir ao entendimento do cromossomo B.



**Figura 5:** Franjas de Moiré: conceito de aprimoramento de resolução por iluminação estruturada. **(a)** Dois padrões de linha são mostrados sobrepostos (multiplicados) para produzir franjas de moiré que se manifestam como listras quase verticais na região de sobreposição. **(b)** Denota a região observável do espaço recíproco que define os detalhes da amostra disponíveis com um microscópio de fluorescência com difração convencional. **(c)** As possíveis posições dos dois componentes laterais são limitadas pelo mesmo círculo que define a região observável (tracejada). **(d)** Se a amostra estiver iluminada com uma luz estruturada, aparecerão franjas de moiré que representam informações que mudaram de posição no espaço recíproco. A região observável conterá, além das informações normais, informações movidas que se originam em dois deslocamentos. **(e)** A partir de uma sequência dessas imagens com diferentes orientações e fases do padrão, é possível recuperar informações de uma área duas vezes o tamanho da região normalmente observável, correspondendo ao dobro da resolução normal. (Fonte: GUSTAFSSON, 2000).

## 2. Justificativa

O presente trabalho pretende contribuir ao entendimento do cromossomo B através da investigação do pareamento cromossômico, organização da estrutura de pareamento e se existe algum padrão de silenciamento do B por meio da técnica de imunocoloração combinada com a tecnologia de microscopia de super resolução. Além disso, pretende-se ainda investigar seu padrão de segregação via cruzamentos direcionados e a atuação do B na expressão de genes envolvidos com o ciclo celular.

## 3. Hipóteses

O cromossomo B metacêntrico dobra-se sobre si mesmo, autopareando-se e formando corretamente a estrutura do complexo sinaptonêmico durante a fase de pareamento dos cromossomos homólogos; o *drive* meiótico em fêmeas possibilita a manutenção do cromossomo B nas proles; e a presença de genes

Íntegros no cromossomo B, envolvidos com divisão celular, podem ter contribuição na manutenção do B nas células.

## **4. Objetivos**

### **4.1. Objetivos gerais**

Investigar o comportamento dos cromossomos B por meio de análise meiótica, análises do complexo sinaptonêmico, cruzamentos direcionados e análise de expressão de genes associados a divisão celular.

### **4.2. Objetivos específicos**

-Realizar cruzamentos entre machos e fêmeas com e sem cromossomo B a fim de identificar o padrão de segregação e possível *drive* meiótico;

-Análise de imunodeteção com tecnologia de super resolução para localização de proteínas de complexo sinaptonêmico utilizando os anticorpos SYCP1 (*synaptonemal complex protein 1*) e SYCP3 (*synaptonemal complex protein 3*) para elucidar o pareamento do cromossomo B;

-Análise de imunodeteção por meio da localização de proteínas de modificação de cauda de histona para identificar padrões de metilação de cromatina no complemento A e no cromossomo B.

-Análise de expressão por PCR tempo real (qPCR) dos seguintes genes íntegros envolvidos com ciclo celular e presente no cromossomo B: *synaptonemal complex protein 2-like*, *mitochondrial cardiolipin hydrolase-like*, *kinesin-like protein* e *tubulin Beta 1, separin-like*.

## **5. Material e Métodos**

### **5.1. Material**

As linhagens de *A. latifasciata* portadoras de cromossomos B são mantidas no biotério de peixes do Laboratório Genômica Integrativa, UNESP-Botucatu, em devidas condições de aeração e qualidade de água de acordo com os protocolos de ética em experimentação animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovado pelo comitê de ética para uso de animais do Instituto de Biociências-UNESP (protocolo nº486).

## **5.2. Métodos**

### **5.2.1. Extração de DNA segundo Sambrook et al. (1989) com modificações.**

A extração de DNA foi realizada em um microtubo de 2000µl, segundo o seguinte protocolo:

Adicionar 900µl de tampão de lise (NaCl 5M; EDTA 0,1M pH 8; Tris-HCl 1M; SDS 10%) e

Adicionar 5µl de Proteinase K (10µg/ml).

Incubar em banho-maria a 55°C por aproximadamente 3 horas ou até que o tecido seja completamente digerido, homogeneizar a cada meia hora.

Adicionar 900µl de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico na proporção de 25:24:1, respectivamente.

Em seguida, centrifugar o material a 13000 RPM por 15 minutos.

Transferir o sobrenadante (aproximadamente 600µl) para um tubo limpo.

Acrescentar volume igual (600µl) de clorofórmio/álcool isoamílico na proporção 24:1, respectivamente.

Centrifugar e transferir o sobrenadante (500µl) para um tubo limpo e acrescentar o mesmo volume de NaCl 1M e duas vezes o volume de etanol 100% gelado.

Incubar *overnight* a 4°C.

Centrifugar a 15000 RPM por 10 minutos e descartar o sobrenadante.

Adicionar 200µl de etanol 70% gelado, centrifugar a 15000 RPM por 5 minutos e descartar o sobrenadante.

Secar os tubos na bancada ou na estufa a 37°C.

Acrescentar 50 a 200 µl de água

Manter em temperatura ambiente e no escuro por 2 dias.

Adicionar 3µl de RNase (10µg/ml) e deixar agir por 30 minutos

Estocar a -20°C.

### **5.2.2. Genotipagem**

Os animais foram genotipados por meio de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para identificar portadores e não portadores de cromossomos B. As PCRs foram conduzidas utilizando-se um conjunto de

*primers* que amplificam uma região específica presente em cromossomos B e uma região controle (FANTINATTI *et al.*, 2016). As reações com volume total de 15 uL são constituídas por 9,76 uL de água ultrapura, 0,56 uL de dNTP (8mM) (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 0,45 uL de MgCl<sub>2</sub>, 1,5 uL de tampão para Taq DNA Polimerase (10X), 0,4 uL de cada primer, 0,13 uL de Taq Polimerase (5U/uL) e 1uL de DNA genômico (100 ng/uL). As condições de ciclagem seguidas são: 95°C por 5 minutos, 95° por 1 minuto, 50°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos, repetir as etapas 2-3 34 vezes, 72°C por 30 segundos e 4°C para finalizar.

### **5.2.3. Preparação de cromossômico meióticos e imunodeteção.**

Ambas as técnicas estão de acordo com o protocolo desenvolvido por Boer *et al.* (2009) com algumas adaptações por Fraune *et al.* (2012).

#### *Preparação cromossômica:*

A técnica foi realizada em um microtubo de 1500µl, segundo o seguinte protocolo.

Adicionar o testículo em 500µl solução de PBSX1.

Macerar o tecido.

Mantendo sempre em gelo.

Adicionar o mesmo volume de solução hipotônica e hipotonizar por 1 hora.

Adicionar o mesmo volume de sacarose 100mM

Manter as lâminas de vidro imersas em paraformaldeído 1% por alguns minutos.

Remove-las e retirar um pouco do excesso do fixador

Em seguida manter a lâmina na diagonal e adicionar 40µL do preparado celular

Mover a lâmina para todos os lados para que o preparado espalhe.

Por último, manter em câmara úmida para que seque bem.

Congelar em -80°C.

#### *Imunodeteção do preparado celular:*

Os anticorpos aplicados para imunodeteção encontram-se listados na **tabela 1.**

Centrifugar a solução de bloqueio à 14000 RPM, 4°C por 30 minutos, em seguida, transferir o sobrenadante para um tubo limpo para uso (repetir 2x).

Centrifugar o anticorpo primário em solução de bloqueio por 14000 RPM, 4°C por 30 minutos, proporção de diluição 1:100.

Lavar as lâminas 3 vezes de 5 minutos em PBSX1.

Adicionar 300µl de solução de bloqueio e manter por 30 minutos em câmara úmida.

Após o bloqueio, adicionar 100µl da solução com anticorpo primário e manter as lâminas em câmara úmida à 4°C *overnight*.

Lavar as lâminas em PBSx1

Manter as lâminas em solução de bloqueio por 30 minutos novamente.

Preparar o anticorpo secundário e centrifugar a 14000 RPM, 4°C por 30 minutos, proporção de diluição 1:100

Adicionar o anticorpo secundário às lâminas e manter em temperatura ambiente por 1 hora em câmara úmida.

Lavar em PBSX1 e corar com DAPI.

Analisar em microscópio de fluorescência.

**Tabela 1:** Anticorpos primários e secundários aplicados à técnica de imunocoloração

<b>Anticorpo primário</b>	<b>Anticorpo secundário</b>	<b>Proteína</b>
medakaSYCP1 Guinea Pig (synaptonemal complex 1)	Anti-Guinea Pig IgG/ Alexa Fluor 488®	Reconhece o elemento central do complexo sinaptonêmico
medakaSYCP3 Rabbit (synaptonemal complex 3)	Anti-Rabbit IgG/ Alexa Fluor 647®	Reconhece o elemento lateral do complexo sinaptonêmico
mouseSMC3 Rabbit (coesin complex)	Anti-Rabbit IgG/Alexa Fluor 488®	Reconhece o elemento central da coesina
H3K27me3 (trimethyl-Histone H3 Lys27)	Anti-Rabbit IgG-FITC	Reconhece marca de trimetilação na lisina 27 da histona H3
H3K4me3 (trimethyl-Histone H3 Lys4)	Anti-Rabbit IgG-FITC	Reconhece marca de trimetilação na lisina 4 da histona H3
H3K9ac (acetyl-Histone	Anti-Rabbit IgG-FITC	Reconhece marca de



#### 5.2.4. Hibridização *in situ* após imunocoloração

O protocolo segundo Pinkel *et al.*, (1986) com modificações.

Após a imunocoloração, proceder da seguinte forma:

Lavar as lâminas em 4xSSSC/TWEENX20 por 10 minutos;

Lavar as lâminas em 2xSSC por 10 minutos;

Passá-las por série alcoólica (70%, 90%, 100%);

Secar por uma hora a 60°C;

Denaturar em formamida 70% por 37 segundos;

Série alcoólica (70%, 90%, 100%), deixar secar a temperatura ambiente;

Preparar mix de hibridização e denaturar a 70 °C por 10 minutos;

Adicionar o mix a lâmina e cobrir com lamínula, manter *over night* à 37°C.

No dia seguinte:

Lavar em 2xSSC por 10 minutos,

Preparar e adicionar solução de detecção a lâmina e manter por uma hora à 37°C;

Lavar em 4xSSSC/TWEENX20 por 5 minutos;

Adicionar DAPI e meio de montagem.

#### 5.2.5. Cruzamentos dialélicos e análise estatística

Foram realizados 4 cruzamentos (**tabela 2**) em aquários com volume de 62 Litros, em condição de aeração, alimentação, temperatura e luminosidade constante em todos os cruzamentos. A qualidade da água foi monitorada por meio de testes de pH, cloro, nitrito e amônia.

Após 15 dias de incubação dos ovos na cavidade bucal das fêmeas, estes foram removidos, sacrificados de acordo com o protocolo de ética, fixados e estocados em freezer -20°C. A presença e ausência de Bs na prole foi detectada por PCR por meio de marcadores específicos de acordo com Fantinatti, Martins (2016).

É importante destacar que os parentais foram trocados após cada fecundação, ou seja, após a retirada da prole, novos cruzamentos eram montados.

Cada cruzamento foi realizado no mínimo 3 vezes.

**Tabela 2:** Esquema de cruzamentos dialélicos de genitores quanto ao número de cromossomos Bs (0B, 1B)

		Genitores masculinos	
		0B	1B
Genitores Femininos	0B	H 00	H 01
	1B	H 10	H 11

H00 a H11 representam os diferentes cruzamentos.

Os resultados gerados foram analisados pelo modelo de regressão logística multivariada (*Generalized linear model* - PAULA, 2013).

Foi atribuído a variável dicotômica 0 para ausência do cromossomo B e 1 para a presença do B em função da contribuição do pai ou mãe ser positivo ou negativo para o B.

No modelo estatístico adotado, a variável independente representa a quantidade de filhotes com cromossomo B e a variável dependente representa o pai ou a mãe com ou sem o cromossomo B. Assim, as variáveis consideradas no modelo estão controladas entre si.

A medida de associação calculada a partir do modelo logístico é o *odds ratio*. Os *odds ratio* ajustados são obtidos através da comparação de indivíduos que diferem apenas na característica de interesse e que tenham os valores das outras variáveis constantes. O ajuste é apenas estatístico.

A seguir temos a saída do software estatístico R:

```
Call: glm(formula = cbind(Bpos, ntotal) ~ pai + mãe, family = binomial)
Coefficients:
(Intercept)   paiBpos   maeBpos
   -1.6122    0.5321    0.9065
Degrees of Freedom: 9 Total (i.e. Null); 7 Residual
Null Deviance: 25.41
Residual Deviance: 14.5    AIC: 53.19
> summary(fit.model)
Call:
```

```

glm(formula = cbind(Bpos, ntotal) ~ pai + mae, family = binomial)
Deviance Residuals:
    Min     1Q   Median     3Q      Max
-2.6971 -0.8315 -0.2137  0.6907  1.6086
Coefficients:
Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
(Intercept) -1.6122    0.3476 -4.639 3.5e-06 ***
paiBpos    0.5321    0.2556  2.082 0.03731 *
maeBpos    0.9065    0.3245  2.794 0.00521 **
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
(Dispersion parameter for binomial family taken to be 1)
Null deviance: 25.409 on 9 degrees of freedom
Residual deviance: 14.505 on 7 degrees of freedom
AIC: 53.187
Number of Fisher Scoring iterations: 4
Waiting for profiling to be done...
OR    2.5 %  97.5 %
(Intercept) 0.1994425 0.09802312 0.384833
    Aqui temos as razões de chances (odds ratio-OR) para proporção de
    filhotes Bpositivo.
paiBpos    1.7025640 1.03567450 2.824775
maeBpos    2.4757244 1.33683035 4.800124

```

### 5.2.6. Confecção dos *primers*

Foram construídos *primers* para os genes presentes no cromossomo B com alta integridade e que estão envolvidos com o ciclo celular, segundo levantamento de Valente *et al.*, (2014) Os genes candidatos são: *synaptonemal complexprotein 2-like*, *mitochondrial cardiolipin hydrolase-like*, *kinesin-like protein e tubulin Beta 1*, *separin-like*.

As sequências dos genes foram localizados no NCBI e blastadas contra o genoma do ciclídeo *Metriaclima zebra* no Sacibase (sacibase.ibb.unesp.br), permitindo, desta forma, a localização dos genes nos scaffolds genômicos de *M. zebra*. Via browser do Sacibase foram alinhados o genoma de *Astatotilapia latifasciata* contra o genoma de referência de *Metriaclima zebra* e localizados scaffolds e conseqüentemente os genes na espécie de interesse. Esses genes foram exportados para o Geneious®, os íntrons removidos e SNPs anotados. Em seguida, essas sequências já anotadas foram exportadas para o OligoExplorer® onde os *primers* foram desenhados (**tabela 3**). Estes foram testados no PrimerBlast, PCR Primer Stats (STOTHARD, 2000) e Primer3Plus (UNTERGASSER *et al.*, 2012).

Para identificar um gene de referência para os estudos de expressão gênica em *A. latifasciata* os genes *actb*, *ctsd*, *ctsz*, *ef1a* e *ubce* foram selecionados com base em trabalhos prévios que usaram peixes ciclídeos (DELOFFRE *et al.*, 2012; YANG *et al.*, 2013). Os *primers* foram desenhados seguindo instruções que permitem sua utilização em experimentos de qPCR – *Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction* – (BUSTIN *et al.*, 2009) utilizando-se as ferramentas Primer-BLAST e PCR Primer Stats. O gene *ubce* se mostrou mais estável entre os diferentes grupos e entre os tecidos e por isso foi selecionado como melhor gene de referência, e vem sendo empregado pelo grupo, como nos trabalhos de Ramos *et al.* (2017) e Carmello *et al.* (2017). Os *primers* foram desenhados a partir de sequências do genoma de indivíduo de *A. latifasciata* não portador de cromossomo B (previamente sequenciado) que foram recuperadas usando-se o programa BLASTALL.

**Tabela 3:** Lista de *primers* dos genes candidatos usados para o ensaio de nível de expressão por RT-qPCR

Primer ID	Sequência
SYCP2-F	5'-GATGAAGAGGATAGCCACTG-3'
SYCP2-R	5'-GCACCAACAATGACCACCT-3'
Separin-like F	5'-CGCAAGGTGGAATTTAGTGATG-3'
Separin-like R	5'-GCTGGGGTTGTTTTGGTATTG-3'
Mitochondrial cardiolipin hydrolase-like-F	5'-CACCACCACCATGTTTGACTC-3'
Mitochondrial cardiolipin hydrolase-like-R	5'-GCGACGACTGAAGAGCCAAA-3'
Tubulin beta-1 chain-like (Tubb1)-F	5'-TACGCTGTCAGTCCACCAAC-3'
Tubulin beta-1 chain-like (Tubb1)-R	5'-GTTGAGGTCCCCGTAAGTCG-3'
Kinesin-11 gene (Kiff11)-F	5'-CAGAGCAAAAAGGGCAACCC-3'
Kinesin-11 gene (Kiff11)-R	5'-GATAGACTTCAGGCTCCGCC-3'
Ubce-F (controle)	5'-GTCCGTTTCAATCCCAACTT-3'
Ubce-R (controle)	5'-GTTCTCCGTCATCAGAGACT-3'

### 5.2.6 Extração do RNA e síntese de cDNA

O RNA total foi extraído com TRIzolReagent (Life) de **gônadas** de 4 machos com B, 4 machos sem B, 4 fêmeas com B e 4 fêmeas sem B, totalizando 16 indivíduos. Foram quantificado com uso do espectrofotômetro NanoVue e sua integridade foi avaliada usando 2100 Bioanalyzer. cDNA foi

sintetizado com uso do kit High Capacity (Life). 2 microlitros de cDNA (20 ng/uL) foram amplificados usando o kit GoTaq qPCR Master Mix (Promega) e 400 nM de cada primer em um volume final de 20 uL.

As condições de ciclagem foram: 10 minutos as 95°C, 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos e anelamento e extensão a 60°C por 1 minuto.

Os níveis de expressão foram detectados no sistema StepOne Plus (Life). 2uL de cDNA (20ng/uL) foram amplificados usando o kit GoTaq qPCR Master Mix (Promega) e 400nM de cada primer em um volume final de 20uL. As condições de ciclagem foram: 10 minutos as 95°C, 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos e anelamento e extensão a 60°C por 1 minuto.

Os dados foram normalizados usando o programa Q-Gene (MULLER *et al.* 2002, SIMON, 2003).

#### *Análise estatística dos níveis de expressão:*

A análise estatística foi realizada comparando a expressão dos genes. As amostras foram agrupadas em quatro classes: machos não portadores de cromossomo B (MB-), machos portadores de cromossomo B (MB+), fêmeas não portadoras de cromossomo B (FB-) e fêmeas portadoras de cromossomo B (MB+). A variável sexo foi inserida nas análises em vista de explorar seu efeito interagindo com o cromossomo B, uma vez que estudos em outros ciclídeos mostram efeitos importantes da combinação destas variáveis (YOSHIDA *et al.* 2011; RAMOS *et. al.*, 2017; CARMELO *et. al.*, 2017).

Os dados de expressão gênica foram comparados usando-se o *software* SAS com um modelo linear generalizado (*Generalized Linear Model –GLM*) ajustado para modelar a média observada em função das variáveis categorizadas sexo e presença de cromossomo B, considerando a distribuição Gama para as variáveis respostas analisadas. O nível de significância estatística usado foi de 5% ( $p < 0,05$ ).

## **6. Resultados e Discussão**

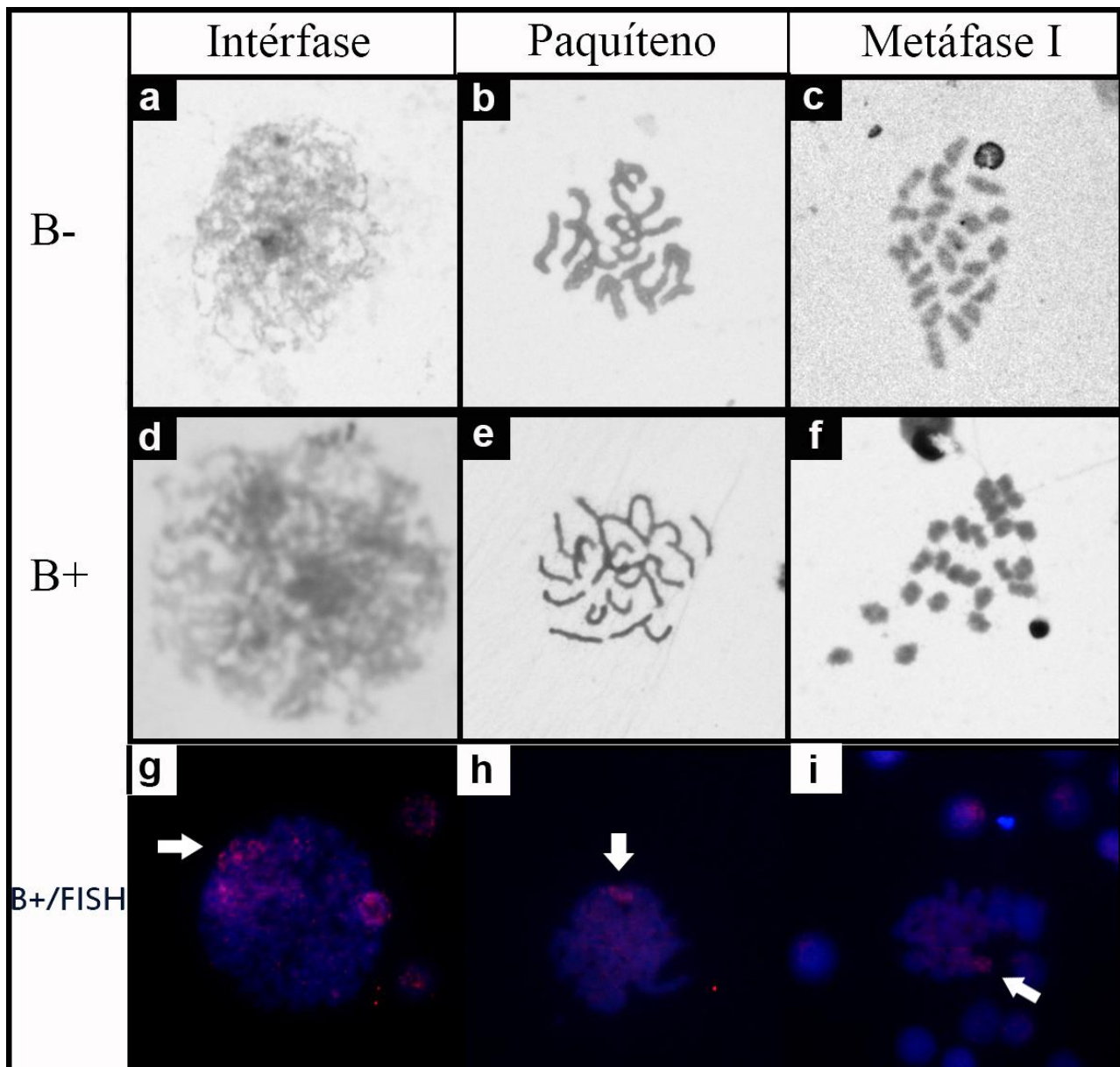
### **6.1. Comportamento meiótico do cromossomo B em *Astatotilapia latifasciata***

### 6.1.1. Imunolocalização e análises meióticas de alta resolução

A meiose é uma divisão celular exclusiva das células germinativas. Durante a meiose, cromossomos homólogos são emparelhados e recombinados, um processo essencial para gerar células haplóides geneticamente distintas (HEYTING, 1996; ROEDER, 1997). Em geral, estudos apontam que espécies com cromossomos B, durante a meiose apresentam uma região distinta, tal região é caracterizada como heteropicnótica. Essas regiões podem ser um indício da localização do cromossomo B. O padrão heteropicnótico pode estar relacionado ao fato do cromossomo ser bastante distinto, considerando seu tamanho reduzido e seu nível de condensação, etc. Curiosamente, este padrão heteropicnótico do B também foi observado em estágios meióticos subseqüentes, como paquíteno, diacinese e metáfase I tornando fácil a identificação do cromossomo B em algumas espécies de ciclídeos (MARTINS-SANTOS *et al.*, 1995; PIRES *et al.*, 2015).

As análises meióticas em indivíduos da espécie *Astatotilapia latifasciata* portadores de um cromossomos B demonstraram a presença de 22 bivalentes relativos aos 44 cromossomos autossomos e presença de 1 elemento univalente adicional, equivalente ao B (**figura 6**). Apesar do comportamento heteropicnótico do cromossomo B em algumas espécies, esse padrão não foi observado na espécie em estudo tornando difícil sua localização. A identificação do cromossomo B foi possível por meio da técnica de hibridização *in situ* (FISH) com a sonda específica do cromossomo B (sonda 174; VALENTE *et al.*, 2017).

Esse mesmo comportamento também é descrito para cromossomos sexuais em mamíferos. Pontos de condensação e descondensação correspondem a regiões de atividade e inatividade transcricional do corpo sexual formado durante a meiose. Assim como os cromossomos sexuais, acredita-se que o B tenha um comportamento parecido. Estudos indicam a origem de cromossomos sexuais a partir de cromossomos B em insetos (CAMACHO, 2000), e em ciclídeos, o B apresenta efeito funcional na determinação sexual em algumas espécies (YOSHIDA *et al.*, 2011).



**Figura 6:** Análise meiótica em machos da espécie *Astatotilapia latifasciata*. Em **a**, **b** e **c** imagens de intérfase, paquíteno e metáfase I, respectivamente, em indivíduos sem cromossomo B. Em **d**, **e** e **f** imagens de intérfase, paquíteno e metáfase I, respectivamente, em indivíduos com cromossomo B. Em **g**, **h**, e **i** imagens da localização do cromossomo B por meio da hibridização *in situ* com sonda específica do B apontando a localização do B nas fases de intérfase, paquíteno e metáfase I, respectivamente.

A atividade e inatividade transcricional pode ser demonstrada pela utilização de anticorpos contra modificações de histonas. Essas modificações ocorrem na porção N-terminal das caudas das histonas e podem ser acetilação, metilação, fosforilação, ubiquitinação, glicosilação, ADP-ribosilação e carbonilação. A acetilação de histonas esta principalmente relacionada com ativação da transcrição, recombinação e reparo do DNA (GRUNTEIN, 1997; BIRD *et al.* 2002). Já a metilação é uma modificação que ocorre apenas em



resíduos na lisina (K) e arginina (R) na cauda de histonas H3 e H4 e é realizada por histona-metiltransferase. Vários estudos têm mostrado que a modificação da cauda da histona H3 por metilação nos resíduos de lisinas 9 e 27 regula negativamente a transcrição, compactando a cromatina. Em contraste, a eucromatina é marcada por metilação nos resíduos das lisinas 36 e 4, indicando transcrição ativa (MARTIN, ZHANG, 2005).

Durante a prófase da meiose I em mamíferos do sexo masculino, os cromossomos sexuais passam por um silenciamento transcricional. Essa inativação é desencadeada pelo acúmulo de proteínas (BRCA1, ATR, e  $\gamma$ H2AX) nos cromossomos seguida de alterações na cromatina dos cromossomos sexuais, incluindo modificações de histonas, incorporação específica de histonas variantes, proteínas não histona, e RNAs (PEGE *et al.*, 2012).

Enquanto marcadores transcricionais aparecem abundantemente sobre os autossomos, eles não são dirigidos para os cromossomas sexuais em mamíferos. Já as modificações da cromatina relacionados a silenciamento da transcrição, ou seja, a trimetilação da lisina 9 da histona H3 (H3K9me3), a monometilação da lisina 4 da histona H3 (H3K4me1) aparecem nos cromossomos sexuais.

Utilizando-se esses marcadores em células meióticas de *A. latifasciata* esperava-se encontrar no cromossomo B um comportamento semelhante aos cromossomos sexuais. Porém, a trimetilação da histona H3 na lisina 27 (H3K27me3) e a trimetilação da histona H3 na lisina 4 (H3K4me3) apresentou uma distribuição global na fase de paquíteno (**figura 7**).

Essas duas marcas epigenéticas possuem um efeito antagônico (TERREINORE *et al.*, 2010). A H3K27me3 está associada com cromatina condensada e transcricionalmente inativa, típico das regiões heterocromáticas. Por outro lado, H3K4me3 é indicadora de cromatina aberta e, portanto, transcricionalmente ativa, caso das regiões eucromáticas. Apesar do cromossomo B apresentar-se totalmente heterocromático (POLETTO *et al.* 2010), a marca relacionada a inatividade transcricional não foi observada neste cromossomo.

A acetilação da histona H3 na lisina 9 (H3K9ac) distribui-se de forma dispersa ao longo de todas as regiões da cromatina interfásica e, durante a prófase I, é mantida até o paquíteno, onde está associada com o complexo



sinaptonêmico (**figura 7 g, h, i**). Depois que esta estrutura é desfeita, a marca H3K9ac também desaparece (**figura j, k, l**). Essa modificação está relacionada a eventos de recombinação na meiose de mamíferos (BUARD *et al.*, 2009) e isso parece explicar a sua associação com o complexo sinaptonêmico em *A. latifasciata*. Tais modificações durante a meiose podem estar envolvidas com a correta montagem do complexo sinaptonêmico e a progressão da meiose.

Assim como as modificações de histonas são importantes para o controle de inativação e ativação da transcrição durante a divisão celular, proteínas meiose-específicas são indispensáveis para a progressão da meiose. Estudos moleculares em cromossomos na fase de paquíteno identificaram vários componentes como: proteínas estruturais mitóticas como topoisomerase II, condensinas e coesinas, também identificaram componentes estruturais meiose específicos, como do complexo sinaptonêmico, que são únicos para a meiose.

Utilizando-se da tecnologia de super resolução de iluminação estruturada (SIM) observamos, com o dobro da resolução, os anticorpos específicos contra proteínas coesinas (SCM3) e contra proteínas do complexo sinaptonêmico (SYCP1 e SYCP3). Na **figura 8** é possível observar, por meio da microscopia de super resolução, que todos os 22 cromossomos bivalentes mais o cromossomo B apresentam dois filamentos, onde encontra-se ancorada as cromátides irmãs. As coesinas meióticas são os principais componente dos elementos axiais, que posteriormente formam os elementos laterais do complexo sinaptonêmico (PAGE, HAWLEY, 2003).

O anticorpo contra proteínas do elemento central (SYCP1) apresentaram-se como um único filamento, exatamente onde os numerosos filamentos transversais se ligam aos elementos laterais (**figura 9a**). Já o anticorpo contra as proteínas do elemento lateral (SYCP3) evidenciaram exatamente os dois filamentos para todos os cromossomos (**figura 9b**). Todos os cromossomos, incluindo o B, apresentam as estruturas estudadas sendo elas fundamentais para garantir a progressão meiótica e a manutenção do cromossomo B na célula.

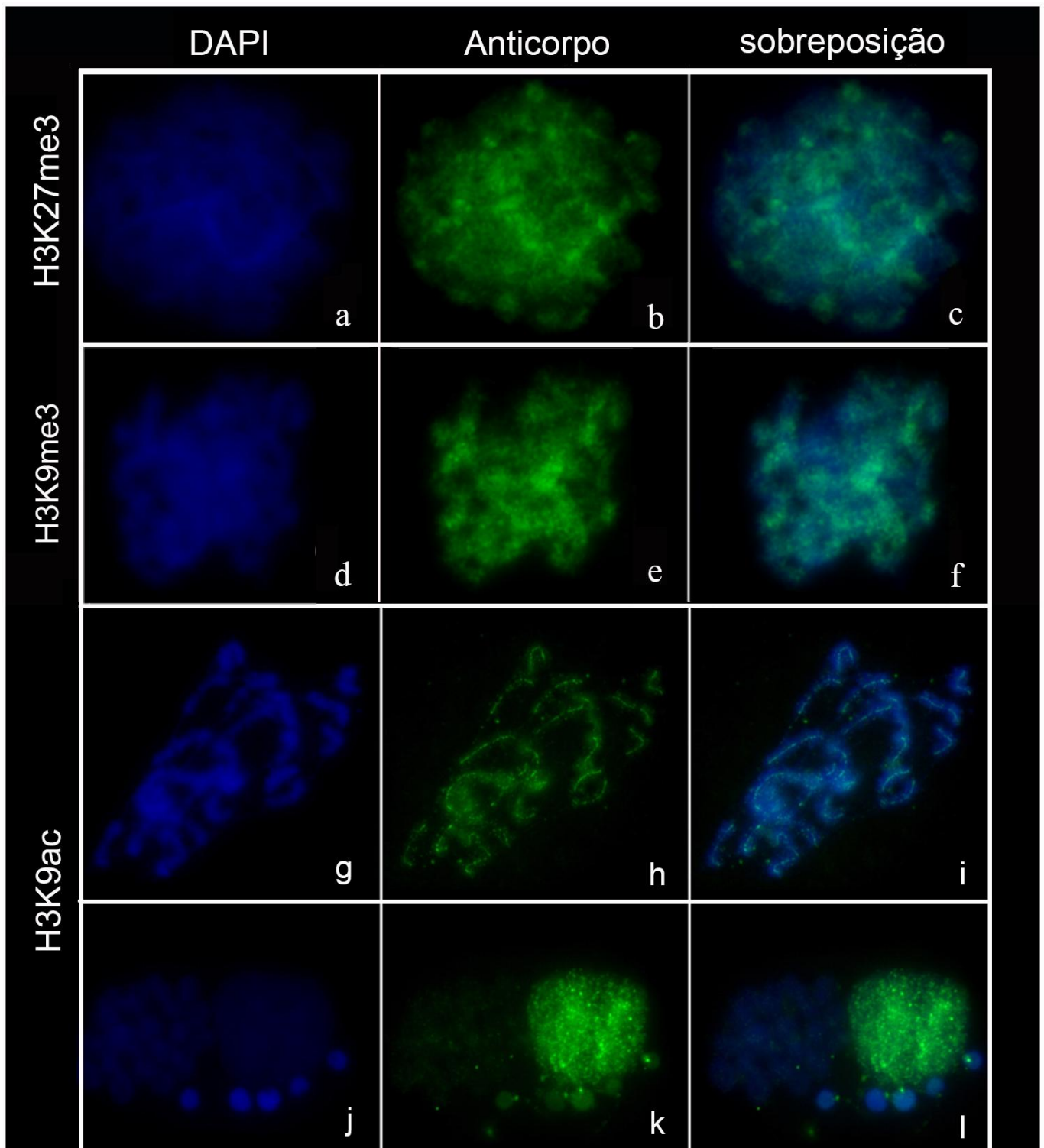
Os cromossomos foram organizados em ordem decrescente de tamanho e a localização do B foi confirmada pela FISH com sonda específica do B. O tamanho do cromossomo B, na fase de paquíteno, é aproximadamente metade

do tamanho do primeiro par do cariótipo. O cromossomo B metafásico corresponde em tamanho ao primeiro par do cariótipo. Portanto, na meiose ele apresentou-se com metade do tamanho, o que confirma a hipótese de que o cromossomo B está se dobrando sobre ele mesmo, formando a estrutura física do complexo sinaptonêmico necessária para garantir seu auto pareamento e a progressão na meiose, confirmando a hipótese de que ele seja um isocromossomo (**figura 10**). A microscopia de super resolução foi fundamental para visualizar detalhes em alta resolução da estrutura do complexo sinaptonêmico.

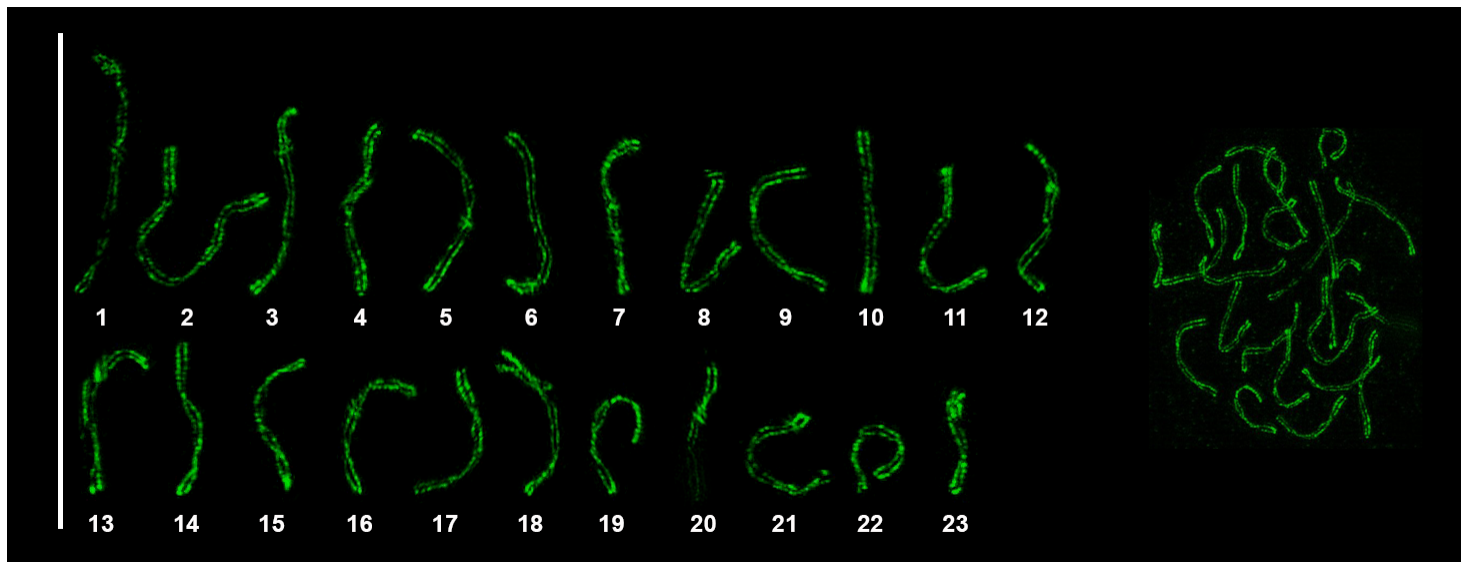
O correto emparelhamento cromossômico garante que a sinapse e o *crossing over* ocorram entre os cromossomos homólogos nas células. Estes são eventos que asseguram a correta segregação cromossômica na primeira divisão meiótica (DE VRIES *et al.* 2005; KOUZNETSOVA *et al.* 2011).

A estrutura do complexo sinaptonêmico geralmente é estudada por microscopia eletrônica de transmissão, sendo que os avanços em imagens de super resolução representam uma resolução espacial que se aproxima de uma resolução virtualmente molecular. Além disso, os anticorpos marcados com fluoróforo, específicos de peixes, exibem uma maior afinidade de ligação que permite a visualização de proteínas do complexo como estruturas contínuas. Assim, a microscopia de super resolução combinada com moléculas marcadas com fluoróforos podem fornecer o mapa de localização de diferentes proteínas com alta precisão.

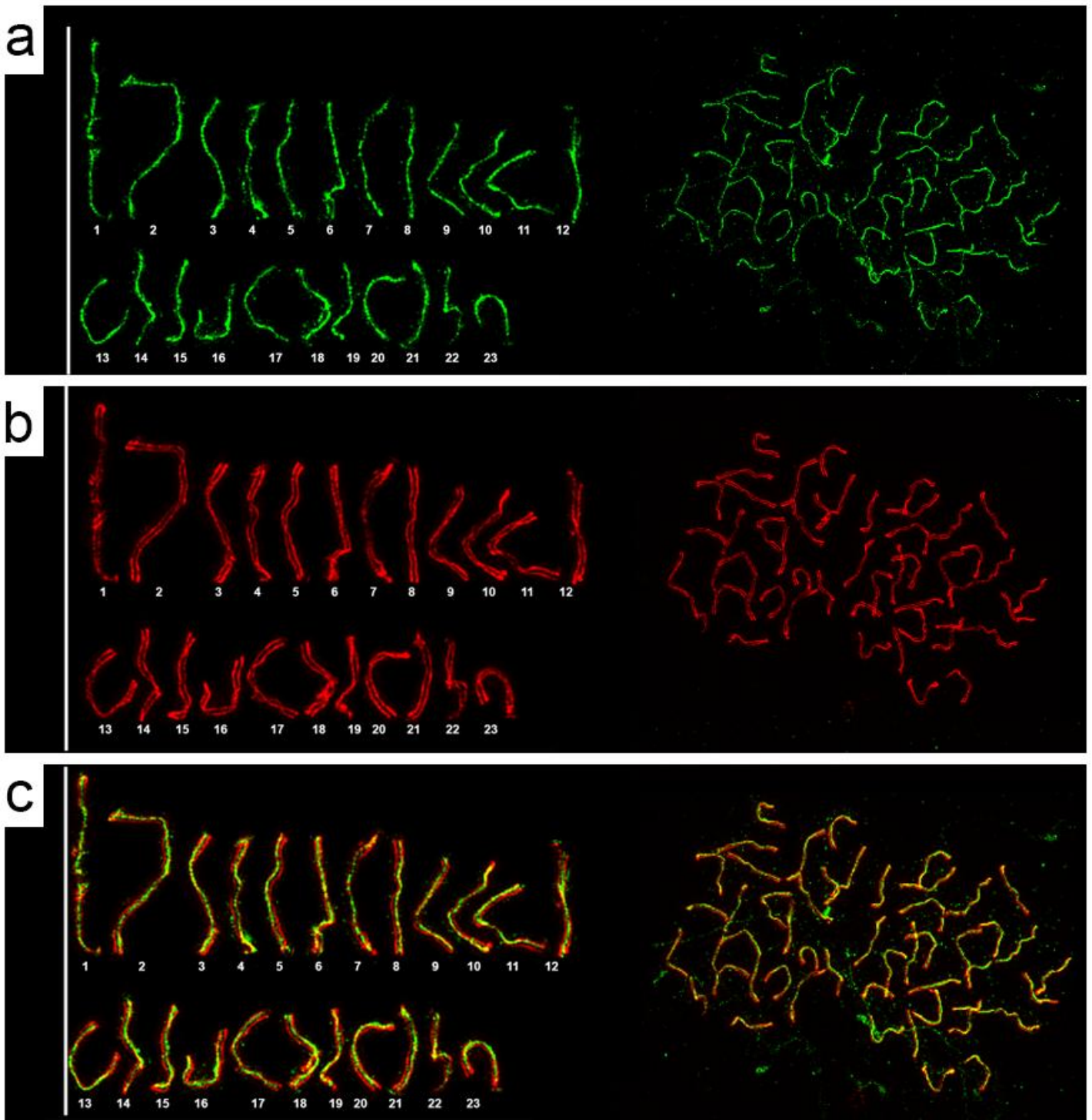
Em conclusão, o trabalho desenvolvido gerou dados sobre microscopia de super resolução no estudo do complexo sinaptonêmico do cromossomo B. A hipótese do auto pareamento do cromossomo B investigado foi confirmada e esse auto-pareamento é um mecanismo essencial que possibilita o cromossomo B se manter nas células durante a divisão meiótica.



**Figura 7:** Imonocoloração com anticorpos contra modificações de histona em *A. latifasciata* (indivíduos com cromossomo B). Distribuição de modificações H3K27me3 (a, b, c) e H3K9me3 (d, e, f), ambas em paquítenos. Distribuição da modificação H3K9ac em paquíteno (g, h, i), em interfase e em metafase (j, k, l).

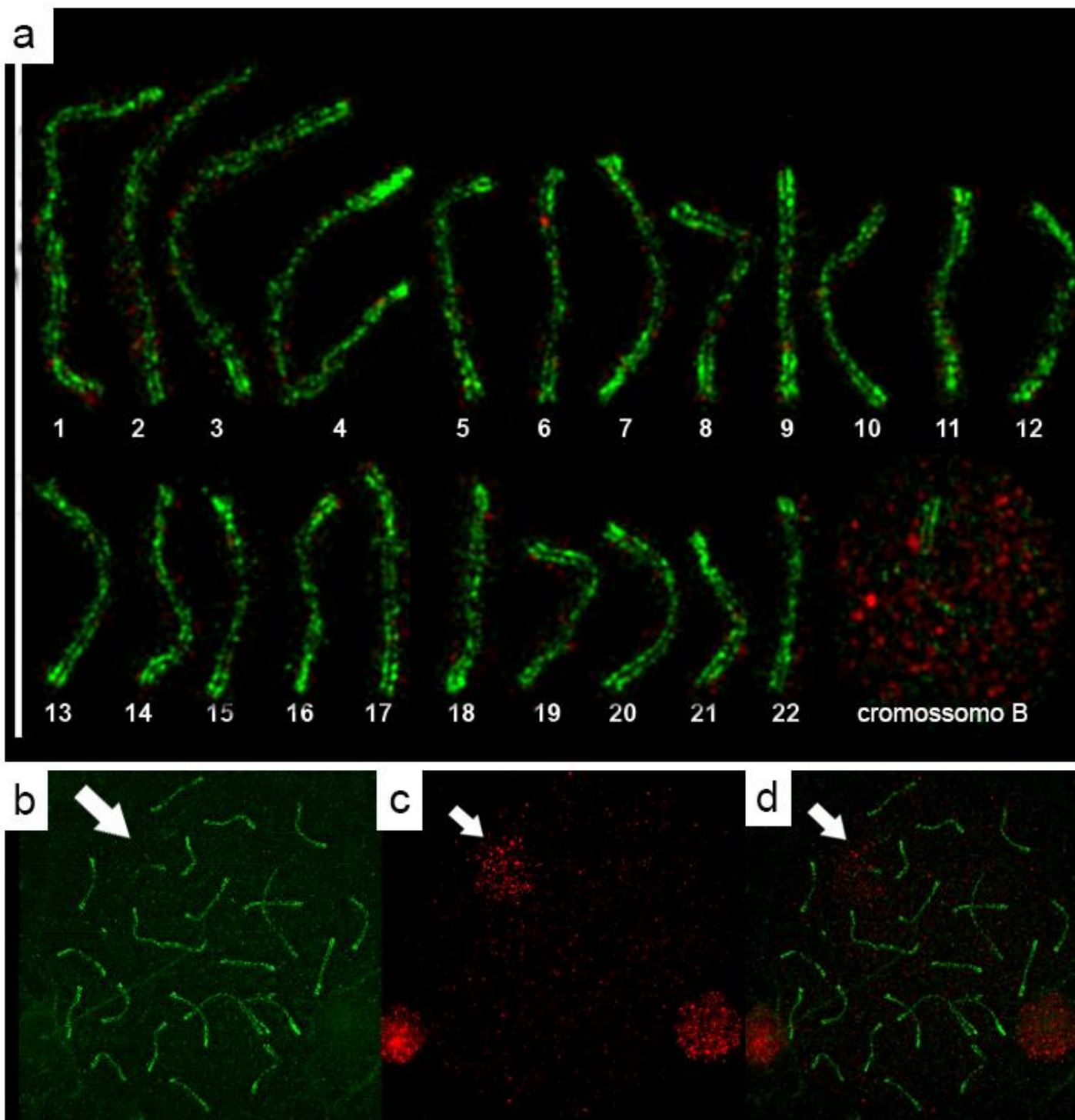


**Figura 8:** Imunodeteção com anticorpo contra proteínas coesinas (SCM3). Na imagem a direita fotomicroscopia de super resolução de paquíteno e a esquerda os filamentos encontram-se organizados em ordem decrescente de tamanho. São 22 cromossomos homólogos mais um elemento adicional, representando o cromossomo B, totalizando 23 cromossomos. Não é possível identificar precisamente o cromossomo B a partir desta análises.



**Figura 9:** Fotomicroscopia de super resolução da imunolocalização das proteínas do complexo sinaptonêmico. A direita encontram-se as imagens dos paquítenos e a esquerda os mesmos organizados em ordem decrescente de tamanho. São 22 cromossomos bivalente mais um elemento adicional correspondendo ao cromossomo B, totalizando 23 cromossomos. A imagem **a** corresponde ao anticorpo SYCP1 (verde), a imagem **b** corresponde ao anticorpo SYCP3 (vermelho) e a imagem **c** corresponde a sobreposição de ambos anticorpos. Não é possível identificar precisamente o cromossomo B a partir desta análises.





**Figura 10:** Fotomicroscopia de super resolução da imunodeteção com o anticorpo SYCP3 (verde) seguida de hibridização *in situ* com sonda específica do cromossomo B (vermelho). **a)** Cariótipo da sobreposição da imunocoloração e da FISH. Os cromossomos homólogos foram organizados em ordem decrescente, totalizando 22 cromossomos, e o cromossomos B localizado por meio da FISH. **b)** Imagem do paquíteno com anticorpo SYCP3; **c)** Hibridização *in situ* com sonda B específica; **d)** Sobreposição da imuno e da FISH. A seta indica a localização do cromossomo B.

### 6.1.2. Segregação cromossômica via cruzamentos dirigidos e *drive*

Os cromossomos B ou supranumerários não apresentam uma herança Mendeliana usual e sua manutenção no hospedeiro pode ser determinada pelo *drive* que pode ocorrer de muitas maneiras em divisões pré-meióticas, meióticas ou pós-meióticas. A compreensão do mecanismo de *drive* representa a chave no entendimento da maioria dos cromossomos B (HOUBEN, 2017).

O *drive* meiótico descrito em muitas espécies está baseado essencialmente em análises meióticas convencionais. Recentemente, alguns trabalhos moleculares apontaram o envolvimento de genes que codificam proteínas e RNAs não codificantes como possíveis agentes no controle do *drive* (MARTIS *et al.* 2012; BANAEI-MOGHADDAM *et al.* 2013; SILVA *et al.* 2014; VALENTE *et al.* 2014; MA *et al.*, 2016; RAMOS *et al.* 2017).

O presente trabalho investigou a hipótese de *drive* por meio de cruzamentos direcionados e análise estatística subsequente. Geralmente, os cruzamentos direcionados realizados com peixes buscam o aprimoramento da espécie ou um maior vigor híbrido, como já realizado em tilápia do Nilo (LAGO, *et al.* 2017). Entretanto, Oliveira *et al.*, (1997) analisou parentais e F1 de cruzamento controlados na espécie *Prochilodus lineatus* e constatou comportamento meiótico, seguindo o modelo Mendeliano. Por meio de testes não paramétricos (Testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney.) foi inferido uma taxa de transmissão de  $kB = 0,511$ , muito parecido com o valor Mendeliano de 0.5.

Enquanto que, em cruzamentos com centeio, constatou-se um atraso anafásico em células com B, esse mesmo atraso foi observado em trigo, caracterizando-se como um *drive* pós-meiótico (revisado por HOUBEN, 2017). Além disso, Clark *et al.*, (2017) sugere que a presença do B em fêmeas de Ciclídeos africanos envolve dois mecanismos de *drive*: um envolvendo não-disjunção e segregação preferencial na divisão mitótica e a outra envolvendo segregação preferencial durante a meiose I.

Os cruzamentos realizados em *A. latifasciata* entre machos e fêmeas com e sem cromossomo B geraram proles F2 que foram genotipadas com os marcadores específicos para presença ou ausência do cromossomo B de Fantinatti, Martins (2016), os dados encontram-se na **tabela 4**.

**Tabela 4:** Dados dos cruzamentos direcionados entre indivíduos com e sem cromossomo B

Cruzamentos	Casal	Prole		Total Indivíduos	Data obtenção da prole
		B+	B-		
macho B- X fêmea B-	Casal 1	0	20	20	jun/2015
macho B+ X fêmea B-	Casal 2	2	8	10	18/08/2015
	Casal 3	6	5	11	11/11/2016
	Casal 4	8	5	13	20/04/2017
macho B+ X fêmea B+	Casal 5	6	5	11	25/06/2015
	Casal 6	27	8	35	11/11/2016
	Casal 7	13	3	16	28/03/2017
macho B- X fêmea B+	Casal 8	22	6	28	25/01/2017
	Casal 9	12	12	24	23/05/2017
	Casal 10	8	15	23	13/06/2017

A partir desses dados, foi realizado a análise estatística por meio do modelo de regressão logística multivariável para saber qual a chance dos parentais contribuírem para ocorrência do cromossomo B nas proles. A análise estatística paramétrica permite fazer uma análise binária e determinar valores relativos a contribuição paterna e materna para gerar prole com cromossomo B. A probabilidade do B varia entre 0 e 1, evento dicotômico, que pode ser entendido como 1 quando o cromossomo B ocorre e 0 quando não ocorre.

Por meio da interpretação dos resultados de *odds ratio* (OR) ou razão de chances, é possível afirmar que a contribuição, tanto do macho quanto da fêmea, é positiva. Na **tabela 5** apresentada abaixo, o primeiro valor (OR=1,70) refere-se à estimativa de chances de machos B positivos produzirem proles B positivas. Neste caso, os machos com cromossomo B possuem 1,7 chances maiores de obter filhotes com cromossomo B. No caso das fêmeas com B a estimativa é de OR=2,476. Neste caso, as fêmeas positivas aumentam em 2,476 vezes as chances de produzirem proles com B.

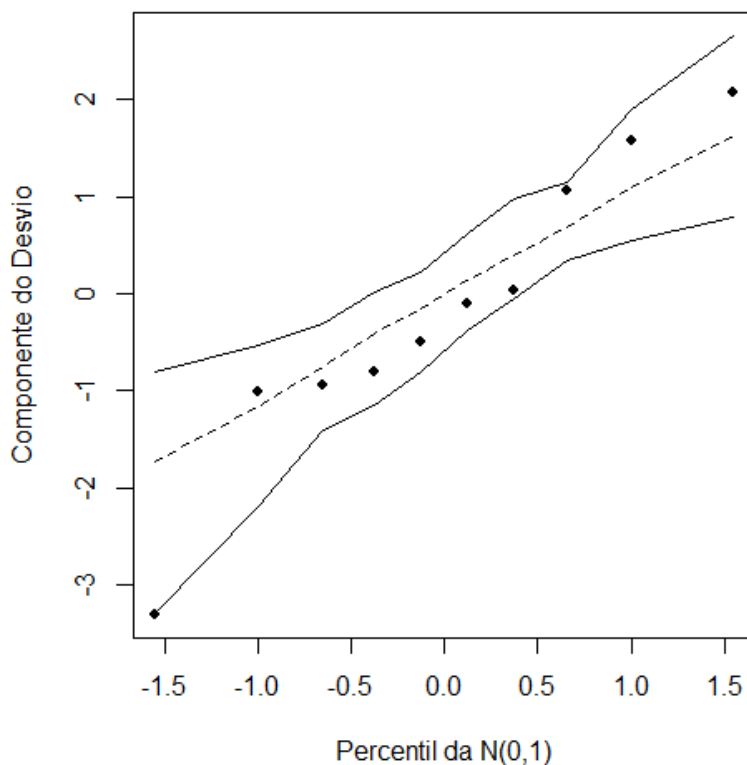
Note que ambos, machos e fêmeas, contribuem para os descendentes possuírem B, porém, a contribuição feminina é quase duas vezes maior que a contribuição dos machos.



**Tabela 5:** Razões de chances para um filhote ser B+

Variável	oddsratio (OD).	Intervalo de confiança	
paiB+	1.7025640	1.03567450	2.824775
maeB+	2.4757244	1.33683035	4.800124

Teste não paramétrico não foram conduzidos pois, não são tão fidedignos como os paramétricos visto que, eles apenas, verificam se existe uma associação ou não com a hipótese. Além disso, o modelo estatístico adotado está bem ajustado, pois os dados relativos a cada cruzamento encontra-se dentro dos limites de confiança das bandas do modelo proposto (**figura 11**). O teste paramétrico, apresentado aqui, além de afirmar que existe um *drive* meiótico tanto em machos como em fêmeas, consegue retornar o valor de chances com que o evento acontece.



**Figura 11:** Distribuição das proles geradas por meio dos cruzamentos. Os pontos correspondem as proles geradas nos cruzamento. Para o modelo estatístico proposto ser de confiança os pontos não devem sair dolimite de confiança definidopelas duaslinhascheias.

Concluimos, a partir dos dados de cruzamento e análise estatística, que existe um *drive* do cromossomo B para a espécie *A. latifasciata*, tanto em machos como em fêmeas, porém em fêmeas o *drive* é mais intenso.

## 6.2. Análises de expressão de genes envolvidos com ciclo celular

Observando os dados de expressão (RT-qPCR) de genes íntegros no cromossomo B desta espécie (**figura 12; tabela 6**), observamos que a diferença de expressão está, sempre, associada a fêmea. Trabalhos de Ramos *et al.* (2017) e Carmelo *et al.* (2017) suportam a idéia da interação entre a presença do B com o fenótipo (macho ou fêmea) na expressão dos genes, porém isto ainda não é muito bem compreendido.

Foram avaliados cinco genes em gônadas de machos e fêmeas de indivíduos com e sem o cromossomo B. Estes genes foram identificados com cópias duplicadas em cromossomos B de *A. latifasciata* (VALENTE *et al.*, 2014). A presença desses genes no cromossomo B e sua interação são discutidos abaixo e suportam a teoria do *drive* meiótico. Os dados de expressão foram plotados em gráficos (**figura 12**) e a interpretação estatística que suportam os resultados encontram-se na **tabela 6**. No material suplementar é apresentado a análise estatística.

A expressão dos genes *tubulin beta-1 chain-like* e *kinesin-like KIF11-like* apresentou-se aumentada em fêmeas com cromossomo B. Segundo a análise estatística, a presença do cromossomo B em fêmeas altera a expressão desses dois genes (**figura 12**). Assim como descrito em outros trabalhos (RAMOS *et. al.*, 2017; CARMELO *et. al.*, 2017) existe uma interação entre o fenótipo (macho ou fêmea) e a presença do B. Os genes presentes no cromossomo B estão ativos e podem promover algum efeito ao hospedeiro. Neste caso, os genes *tubulin beta-1 chain-like* e *kinesin-like KIF11-like* traduzem proteínas que constituem o citoesqueleto celular.

As tubulina se organizam para formar os microtúbulo que servem como trilhos para o transporte intracelular, fornecem suporte mecânico e contribuem para determinação da forma celular, e ainda atua facilitando a segregação cromossômica na divisão. O citoesqueleto dos microtúbulos é notavelmente dinâmico, e muitas das suas funções dependem na sua capacidade de se organizar em diferentes arquiteturas, esta plasticidade assegura a distribuição igual dos cromossomos (ROOSTALU, SURREY,2017). As cinesinas também são responsável pelo transporte de estruturas dentro da célula interagindo quimicamente com os microtúbulos. Além disso elas são essenciais para o

estabelecimento da bipolaridade do fuso (SAWIN *et al.*, 1992; HECK *et al.*, 1993; BLANGY *et al.*, 1995).

O gene *mitochondrial cardiolipin hydrolase-like* também apresentou interação sexo e B significativa. Houve o aumento da expressão em fêmeas com cromossomo B (**figura 12**). Este genes transcreve uma endonuclease que desempenha um papel crítico na biogênese dos piRNAs. Os piRNAs oferecem proteção essencial contra a atividade de elementos genéticos móveis. O silenciamento do transposon mediado pelo piRNA é, portanto, crítico para a manutenção da estabilidade do genoma, em particular nas células germinativas quando os transposons são mobilizados como consequência da desmetilação genômica amplamente difundida (HUANG *et al.*, 2011).

Acreditamos que o aumento da expressão desses genes em fêmeas esteja envolvido com a manutenção do cromossomo B na prole. Os genes *tubulin beta-1 chain-like* e *kinesin-like KIF11-like* favorecem a segregação e o gene *mitochondrial cardiolipin hydrolase-like* protege o cromossomo B do silenciamento por transposon. São funções importante que ocorrem na meiose e que favorece o *drive* do cromossomo B nas fêmeas.

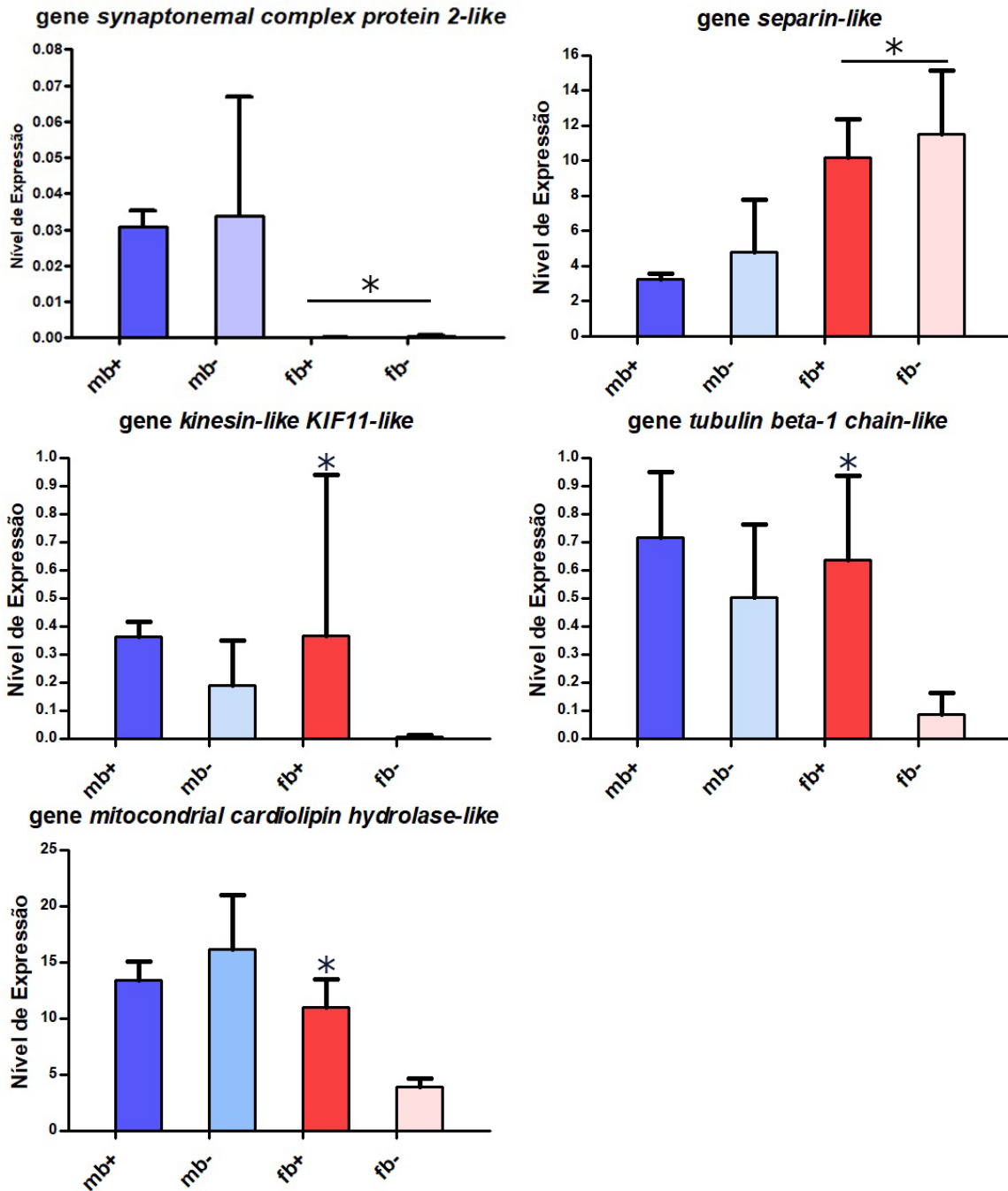
A expressão dos genes *synaptonemal complexprotein 2-like (sycp2)* e *separin-like* não apresentaram interação significativa com o cromossomo B. Apesar destes genes possuírem cópia duplicada no cromossomo B, a diferença de expressão está relacionada apenas ao fenótipo masculino e feminino (**figura 12**) e não à presença do B. Para todos os genes analisados, não ocorreram diferenças estatisticamente significativas de expressão dos genes nos machos com e sem o cromossomo B.

A partir dos dados de cruzamentos direcionados e análise estatística, podemos inferir que existe um *drive* meiótico atuando na espécie *A. latifasciata*, sendo este mais intenso nas fêmeas. Além disso, a expressão de alguns genes íntegros no cromossomo B apresenta-se mais intensa em fêmeas, isto é uma evidência do envolvimento de genes que codificam proteínas no controle da transmissão meiótica do cromossomo B.

**Tabela 6:** Interpretação da análise estatística sobre a diferença de expressão de genes presente no cromossomo B.

Gene	Efeito do sexo	Interação sexo e B
<i>sycp2</i>	Diminui a expressão na fêmea	
<i>mit</i>		Aumento da expressão na fêmea

		com B
<i>kif11</i>		Aumento da expressão na fêmea com B
<i>sep</i>	Aumento da expressão na fêmea	
<i>tub</i>		Aumenta da expressão na fêmea com B



**Figura 12:** Análise da diferença de expressões dos genes *synaptonemal complex protein 2-like*, *separin-like*, *kinesin-like KIF11-like*, *tubulin beta-1 chain-like* e *mitochondrial cardiolipin hydrolase-like*. Machos B positivo estão representados por mb+ (azul escuro); machos B negativo estão representados por mb- (azul claro); fêmeas B positivo estão representadas por fb+ (vermelho escuro) e fêmeas B negativo

estão representadas por fb- (rosa). A barra nos gráficos representam o desvio padrão e asteriscos indicam diferenças estatísticas.

## 7. Conclusão final

Em conclusão, o trabalho desenvolvido apresentou três evidências sobre o a hipótese do auto-pareamento do cromossomo B em *A. latifasciata*, consequentemente confirmando que ele seja um isocromossomo. Primeiro, todos os cromossomos do complemento apresentaram as estruturas proteicas necessárias para a progressão na meiose; segundo, o tamanho do B corresponde a metade do tamanho do primeiro cromossomo do complemento, indicando que ele esta dobrando-se sobre si; e terceiro, a confirmação da localização pela FISH. A partir dos dados de cruzamentos direcionados e análise estatística, podemos inferir que existe um *drive* meiótico atuando na espécie *A. latifasciata*, sendo este mais intenso nas fêmeas. Além disso, a expressão diferenciada de genes envolvidos na maquinaria da divisão celular presentes em cópia duplicada no cromossomo B de fêmeas evidencia o envolvimento desses genes no controle da transmissão meiótica do cromossomo B.

## 8. Referências:

ARAYA-JAIME, C.; SERRANO, E.A.; FORESTI, F. Meiotic surface-spread and immunodetection for synaptonemal complex proteins in teleost fish. In: Catherine OzoufCostaz, Eva Pisano, Fausto Foresti, Lurdes Foresti de Almeida Toledo. (Org.). **Fish Cytogenetic Techniques** - Ray-fin fishes and Chondrichthyans. 1ed. Boca Raton - London - New York: CRC Press - Taylor and Francis Group, 2015. v. 1, p. 82-87.

BANAEI-MOGHADDAM, A.M.; MEIER, K.; KARIMI-ASHTIYANI, R.; HOUBEN, A. Formation and Expression of Pseudogenes on the B Chromosome of Rye. **The Plant Cell**, Vol. 25: 2536–2544. 2013.

BEUKEBOOM, L.W. Bewildering Bs: an impression of the 1st B-Chromosome Conference. **Heredity**, 73 328—336. 1994.

BIRD, D.; GU, M. Compact two-photon fluorescence microscope based on a single-mode fiber coupler. **Opt Lett**, 27(12):1031-3. Jun 15, 2002.

BLANGY, A.; LANE, H.A.; HÉRIN P.D.; HARPER M.; KRESS, M. Phosphorylation by p34cdc2 regulates spindle association of human Eg5, a kinesin-related motor essential for bipolar spindle formation in vivo. **Cell** 83:1159–1169. 1995.

BOER, E.; LHUISSIER F.G.; HEYTING, C. Cytological analysis of interference in mouse meiosis. **Methods Mol Biol** 558:355–382. 2009.

BURT, A.; TRIVERS, R. Genes in conflict: the biology of selfish genetic elements. 1st ed. **Cambridge: Belknap Press**. 2008.

BURT, A.; TRIVERS, R. B chromosomes, Genes in Conflict: The Biology of Selfish Genetic Elements (Chapter 9), **Harvard University Press, Cambridge**. 2006.

BUSTIN, S. A., BENES, V., GARSON, J. A., HELLEMANS, J., HUGGETT, J., KUBISTA, M., MUELLER, R., NOLAN, T., PFALLM, W., SHIPLEY, L., VANDESOMPELE, J., WITTEWER, C. T., The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry** 55(4):611-622. 2009.

CABRAL-DE-MELLO, D.C.; MOURA R.C.; MARTINS, C. Chromosomal mapping of repetitive DNAs in the beetle *Dichotomius geminatus* provides the first evidence for an association of 5S rRNA and histone H3 genes in insects, and repetitive DNA similarity between the B chromosome and A complement. **Heredity**, 104, 393–400. 2010.

CAMACHO, J.P.M.; SHARBEL, T.F.; BEUKEBOOM, L.W. B–chromosome evolution. **Phil Trans R Soc Lond** 355:163–178. 2000.

CAMACHO, J.P.M.; B Chromosome. In: Gregory TR (ed) **The evolution of genome**. Elsevier, USA 223–286p, 2005.

CAMACHO, J.P.; SCHMID, M.; CABRERO, J. B chromosomes and sex in animals. **Sex Dev**. 5:155–166. 2011.

CARMELLO, B.O.; COAN, R.L.B.; CARDOSO, A.L.; RAMOS, E.; FANTINATTI B.E.A.; MARQUES, D.F.; MARTINS, C. The hnRNP Q-like gene is retroinserted into the B chromosomes of the cichlid fish *Astatotilapia latifasciata*. **Chromosome Res** DOI 10.1007/s10577-017-9561-0. 2017.

CHOWDHURY, S.; ELDRIDGE, W.J.; WAX, A.; IZATT, J.A. Structured illumination microscopy for dual modality 3D sub-diffraction resolution fluorescence and refractive-index reconstruction. **Biomedical Optics Express** 5776 Vol. 8, No.12. 2017.

CLARK, F.E.; CONTE, M.A.; FERREIRA-BRAVO, I.A.; POLETTO, A.B.; MARTINS, C.; KOCHER, T.D. Dynamic Sequence Evolution of a Sex-Associated B Chromosome in Lake Malawi Cichlid Fish. **Journal of Heredity**, 1–10 doi:10.1093. 2017.

COLE, F.; KEENEY, S.; JASIN, M. Evolutionary conservation of meiotic DSB proteins: More than just Spo11. **Genes Dev** 24:1201–1207. 2010.

COLEMAN, J.J.; ROUNSLEYS, D.; RODRIGUEZ-CARRESM, KUOA.; WASMANN, C.; GRIMWOOD, J.; SCHMUTZ, M.; TAGA, G.J.; WHITE, S.; ZHOU, D.C.; SCHWARTZ, M.; FREITAG, L.J.; MA, E.G.; DANCHIN, B.; HENRISSAT, P.M.; COUTINHO, D.R.; NELSON, D.; STRANEY, C.A.; NAPOLI, B.M.; BARKER, M.; GRIBSKOV, M.; REP, S.; KROKEN, I.; MOLNAR, C.; RENSING, J.C.; KENNEL, J.; ZAMORA, M.L.; FARMAN, E.U.; SELKER, A.; SALAMOV, H.; SHAPIRO, J.; PANGILINAN, E.; LINDQUIST, C.; LAMERS, I.V./GRIGORIEV, D.M.; GEISER, S.F.; COVERT, E.; TEMPORINI, H.D. VANETTEN. The genome of *Nectriahaematococca*: contribution of supernumerary chromosomes to gene expansion, **PLoS Genet.** 5 e1000618. 2009.

COSTA, Y. Two novel proteins recruited by synaptonemal complex protein 1 (SYCP1) are at the centre of meiosis. **J CellSci** 118(Pt 12):2755–2762. 2005.

DELOFFRE, L.A.; ANDRADE, A.; FILIPE, A.I.; CANARIO, A.V. Reference genes to quantify gene expression during oogenesis in a teleost fish. **Gene.** 506: 69–75. 2012.

DE VRIES F. A., DE BOER, E., VAN DEN BOSCH, M., BAARENDS, W. M., OOMS, M., *et al.* Mouse Sycp1 functions in synaptonemal complex assembly, meiotic recombination, and XY body formation. **Genes Dev** 19: 1376–1389. 2005.

DIAS, A.L. Estudo do complexo sinaptonêmico em peixes, “*Prochilodus lineatus*” (Prochilodontidae) e “*Astyanax scabripinnis*” (Characidae): análise da sinapse dos cromossomos supranumerários. Tese, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, Brasil. 102 pp, 1995.

DOUGLAS, R.N., BIRCHLER J.A. B Chromosomes. In: Bhat T., Wani A. (eds) *Chromosome Structure and Aberrations*. Springer, New Delhi. 2017.

EVANS, G.M.; REES, H.; SNELL, C.L.; SUN, S. The relationship between nuclear DNA amount and the duration of the mitotic cycle. **Chromosome** 3:24–31. 1972.

Em: <<http://www.geneious.com>> acesso em: 09 de julho de 2017.

Em: <<http://www.graphpad.com/scientific-software/prism>> em: 10 de julho de 2017.

Em: <<http://oligo-explorer.software.informer.com>> acesso em: 09 de julho de 2017.

Em: <<http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/superresolution/introduction>> acesso em 13 de dezembro de 2017.

FANTINATTI, B.E.A.; MAZZUCHELLI, J.; VALENTE, G.T.; CABRAL-DE-MELLO, D.C.; MARTINS, C.. Genomic content and new insights on the origin of the B chromosome of the cichlid fish *Astatotilapia latifasciata*. **Genetica** 139: 1273-1282. 2011.

- FANTINATTI, B.E.A.; MARTINS, C. Development of chromosomal markers based on next-generation sequencing: the B chromosome of the cichlid fish *Astatotilapia latifasciata* as a model. **BMC Genetics** 17:119 DOI 10.1186/s12863-016-0427-9. 2016.
- FELDBERG, E.; BERTOLLO, L.A.C.; Discordance in chromosome number among somatic and gonadal tissue cells of *Gymnogeophagus balzanii* (Pisces: Cichlidae). **Rev Brasil Genet.** 7:639–645. 1984.
- FELDBERG, E.; PORTO, J.I.R.; ALVES-BRINN, M.N.; MENDONCA, M,N,C.; BENZAQUEM, D.C. B chromosomes in Amazonian cichlid species. **Cytogenet Genome Res.** 106:195-198. 2004.
- FENG, J., FU, S., CAO, X., WU, H., LU, J., ZENG, M., LIU, L., YANG, X., SHEN, Y. Synaptonemal complex protein 2 (SYCP2) mediates the association of the centromere with the synaptonemal complex. **Protein Cell**, 8(7):538-543 DOI 10.1007/s13238-016-0354-6. 2017.
- FRAUNE; ALSHEIMER, M.; VOLFFB, J.N.; BUSCH, K.; FRAUNE, T.C.; BOSCH, G.; BENAVENTE, R. Hydra meiosis reveals unexpected conservation of structural synaptonemal complex proteins across metazoans. **PNAS** doi/10.10731206875109. 2012.
- GERTON, J.L.; HAWLEY, R.T. Homologous Chromosome Interactions In Meiosis: diversity amidst Conservation. **Nature Reviews | Genetics** Volume 6 | June. 2005.
- GRUNSTEIN, M. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. **Nature.** 389(6649):349-52. 1997.
- GUSTAFSSON, M.G.; Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. **J. Microsc.** 198(Pt 2), 82–87. 2000.
- HAMER, G. Characterization of a novel meiosis-specific protein within the central element of the synaptonemal complex. **J Cell Sci** 119(Pt 19):4025–4032. 2006.
- HANDEL, M.A.; SCHIMENTI, J.C. Genetics of mammalian meiosis: Regulation, dynamics and impact on fertility. **Nat Rev Genet.** 11:124–136. 2010.
- HECK, M.M.; PEREIRA, A.; PESAVENTO, P.; YANNONI, Y.; SPRADLING, A.C. The kinesin-like protein KLP61F is essential for mitosis in *Drosophila*. **J. Cell Biol.** 123: 665–679. 1993.
- HEYTING, C. Synaptonemal structure and function. **Cell Biol.** 8(3):389-96. 1996.
- HOUBEN, A.; BANAEI-MOGHADDAM, M.; KLEMME, S.; TIMMIS, J.N. Evolution and biology of supernumerary B chromosomes, **Cell. Mol. Life Sci.** 71 467–478. 2013.
- HOUBEN, A. B Chromosomes – A Matter of Chromosome Drive. **Plant Sci.** 8:210. 2017.



HUANG, H., 1 GAO, QUN., PENG, XIAOXUE., CHOI, SEOK-YONG., SARMA, KRISHNA., REN, HONGMEI., MORRIS, ANDREW J., FROHMAN, MICHAEL A. piRNA-Associated Germline Nuage Formation and Spermatogenesis Require MitoPLD Profusogenic Mitochondrial-Surface Lipid Signaling. **Developmental Cell** 20, 376–387. 2011.

HUNTER, N. Synaptonemal complexities and commonalities. **Mol Cell** 12:533–535. 2003.

INGARAMO. M.; YORK, A.G.; WAWRZUSIN, P. Two-photon excitation improves multifocal structured illumination microscopy in thick scattering tissue. **Proceedings of the National Academy of Sciences**;111(14):5254-5259. 2014.

IWAI, T. Structural components of the synaptonemal complex, SYCP1 and SYCP3, in the medaka fish *Oryzias latipes*.**ExpCell Res** 312:2528–2537. .2006.

JONES, R.H.; REES, H.B.; Chromosomes, **Academic Press, London**. (266 pp). 1982.

JONES, N. B-chromosome drive.**Am Nat**. 137:430–442. 1991.

JONES, N. New species with B chromosomes discovered since 1980. **Nucleus** DOI 10.1007/s13237-017-0215-6. 2017.

KOCHER, T.D.; MARTINS, C. Chromosome differentiation patterns during cichlid fish evolution. **BMC Genetics**. 11:50. 2010.

KOUZNETSOVA. A.; BENAVENTE, R.; PASTINK, A.; HÖÖG, C. Meiosis in mice without a synaptonemal complex. **PLoS One**. 6(12):e28255. 2011.

KAYANO, H. Cytogenetic studies in *Lilium callosum*. III. Preferential segregation of a supernumerary chromosome in EMCs. **Proc Jpn Acad** 33:553–558.1957.

KIRK. D.; JONES, R.N. Nuclear genetic activity in B chromosome rye, in terms of quantitative interrelationships between nuclear protein, nuclear RNA and histone. **Chromosoma** 31:241–254.1970.

LAGO, A.A. The development of genetically improved red tilapia lines through the backcross breeding of two *Oreochromis niloticus* strains. **Aquaculture**. 2017.

LAMATSCH, D.K. TRIFONOV, V. SCHORIES, S. EPPLEN, J.T. SCHMID, M. SCHARTL, M. Isolation of a Cancer-Associated Microchromosome in the Sperm-Dependent Parthenogen *Poecilia formosa*. **Cytogenetic and Genome Research** 135:135–142. 2011.

LAMMERS, J.H. The gene encoding a major component of the lateral elements of synaptonemal complexes of the rat is related to X-linked lymphocyte-regulated genes. **Mol Cell Biol** 14(2):1137–1146. 1994.

MA, W.; GABRIEL, T.S.; MARTIS, M.M.; GURSINSKY, T.; SCHUBERT, V.; VRÁNA, J. Rye B chromosomes encode a functional Argonaute-like protein with in vitro slicer activities similar to its A chromosome paralog. **New Phytol.** 213, 916–928. 2016.

MARQUES, DIEGO. Análise funcional da presença de cromossomo B, utilizando o peixe ciclídeo *Astatotilapia latifasciata* como modelo. Tese de doutorado apresentada ao programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas (Genética). Unesp, Botucatu, São Paulo. 2015.

MARTIN, C.; ZHANG, Y. The diverse functions of histone lysine methylation, **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** 6 838–849. 2005.

MARTIS, M.M.; KLEMME, S.; BANAEI-MOGHADDAM, A.M.; BLATTNER, F. R.; MACAS, J.; SCHMUTZER, T. Selfish supernumerary chromosome reveals its origin as a mosaic of host genome and organellar sequences. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 109, 13343–13346. 2012.

MARTINS-SANTOS, I.C.; PORTELA-CASTRO, A.L.B.; JULIO, H.F.JR.: Chromosome analysis of 5 species of the Cichlidae family (Pisces, Perciformes) from the Paraná River. **Cytologia.** 60:223-231. 1995.

MERATAN, A.A.; GHAFARI, S.M.; NIKNAM, V.; SALAMI, M.: Antioxidative Responses in calli of two populations of *Acanthophyllum laxiusculum* with and without B-chromosomes under salt stress. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, 16: 1-11. 2013.

MENDELSON, D.; ZOHARY, D. Behavior and transmission of supernumerary chromosomes in *Aegilops speltoides*. **Heredity** 29:329–339. 1972.

MEUWISSEN, R. L., OFFENBERG, H. H., DIETRICH, A. J., RIESEWIJK, A., VAN IERSEL, M., HEYTING, C. A coiled-coil related protein specific for synapsed regions of meiotic prophase chromosomes. **EMBO J.** 11, 5091-5100. 1992.

MULLER, P.Y.; JANOVJAK, H.; MISEREZ, A.R.; DOBBIE, Z. Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR. **BioTechniques** 32:1372–1379. 2002.

MÜNTZING, A. Cytological studies of extra fragment chromosomes in rye. **Hereditas** 34:435–442. 1948

NELSON, J.S. Fishes of the world, 4<sup>th</sup>ed John Wiley and Sons, Inc. New York 2006.

NUR, U. A mitotically unstable supernumerary chromosome with an accumulation mechanism in a grasshopper. **Chromosoma** 14:407–422. 1963.

NUR, U.; WERREN, J.H.; EICKBUSH, D.G.; BURKE, W.D. A “selfish” B chromosome that enhances its transmission by eliminating the paternal genome. **Science** 240:512–514. 1988.

- OCALEWICZ, K.; MOTA-VELASCO, J.C.; CAMPOS-RAMOS, R, PENMAN, D.J.FISH and DAPI staining of the synaptonemal complex of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) allow orientation of the unpaired region of bivalent 1 observed during early pachytene. **Chromosome Research** 17:773–782. 2009.
- OFFENBERG, H.H. SCP2: A major protein component of the axial elements of synaptonemal complexes of the rat. **Nucleic Acids Res** 26(11):2572–2579. 1998.
- OHTA, S. Mechanisms of B–chromosome accumulation in *Aegilops mutica* boiss. **Genes Genet Syst** 71:23–29. 1996.
- OLIVEIRA, C., SABOYA, S. M. R., FORESTI, F, SENHORINI, J. A., BERNARDINO, G. increased b chromosome frequency and absence of drive in the fish *Prochilodus lineatus*. **Heredity**, v. 79, p. 473-476, 1997.
- ÖSTERGREN, G. Parasitic nature of extra fragment chromosomes. **Bot Notiser** 2:157–163, 1945.
- PAGE, S.L.;HAWLEY, R.S. Chromosome choreography: the meiotic ballet. **Science**. 301(5634):785-9. 2003.
- PAULA,G.Modelos de regressão com apoio computacional. Instituto de Matemática e Estatística Universidade de São Paulo, 2013.
- PAWLEY,J.B. Handbook of biological confocal microscopy, third edition. Springer. 2006.
- PERAZZO, G. X., NOLETO, R. B., VICARI, M. R., GAVA, A., CESTARI, M. M. B chromosome polymorphism in South American cichlid. **Neotropical Biodiversity**, 4:1, 3-9, DOI:10.1080/23766808.2018.1429164. 2018.
- PINKEL, D., STRAUME, T., GRAY, J.W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proc Natl Acad Sci** 83:2934-2938. 1986.
- PIRES, L.B.; SAMPAIO, T.R.; DIAS, A.L. Mitotic and meiotic behavior of B chromosomes in *Crenicichla lepidota*: new report in the family Cichlidae. **J Hered**. 106:289–295. 2015.
- POLETTTO, A.B.; FERREIRA, I.A.; MARTINS, C.. The B chromosomes of the African cichlid fish *Haplochromis obliquidens* harbour 18S rRNA gene copies. **BMC Genet**. 11:1. 2010.
- POLETTTO, A.B.; FERREIRA, I.A.; CABRAL-DE-MELLO, D.C.; NAKAJIMA, R.T.; MAZZUCHELLI, J.; RIBEIRO, H.B.; VENERE, P.C.; NIRCHIO, M.; RAMOS, E.; CARDOSO, A.L.; BROWN, J.; MARQUES, D.F.; FANTINATTI, B.E.A.; CABRAL-DE-MELLO, D.C.; MARTINS, C. The repetitive DNA element BncDNA, enriched in the B chromosome of the cichlid fish *Astatotilapia latifasciata*, transcribes a potentially noncoding RNA. **Chromosoma** 126:313–323. 2017.

POUGH, F.H., JANIS, C.M., HEISER, J.B. A vida dos vertebrados. Terceira Edição. Coord. Editorial: Ana Maria de Souza. São Paulo: Atheneu Editora. 2003.

RANDOLPH, L.F. Chromosome number in *Zea Mays* L. **Cornell Agric. Exp. Sta. Memoir** 177:44p. 1928.

ROEDER, G. S. Meiotic chromosomes: it takes two to tango. **Genes Devel.** 15;11(20):2600-21. 1997.

ROOSTALU, J.; SURREY T. Microtubule nucleation: beyond the template. *Nature Reviews* | **Molecular Cell Biology**. 2017.

SILVA, D.M.; PANSONATO-ALVES, J.C.; UTSUNOMIA, R.; ARAYA-JAIME, C.; RUIZ-RUANO, F.J.; DANIEL, S.N. Delimiting the origin of a B chromosome by FISH mapping, chromosome painting and DNA sequence analysis in *Astyanax paranae* (Teleostei, Characiformes). **PLoS ONE** 9:e94896. 2014.

SAMBROOK, E.; FRITSCH F.; MANIATIS T. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1626 pp. Molecular cloning: A laboratory manual. Second edition. Volumes 1, 2, and 3. Current protocols in molecular biology. Volumes 1 and 2. 1989.

SAWIN, K. E.; LEGUELLEC, K. PHILIPPE, M.; MITCHISON, T. J. Mitotic spindle organization by a plus-end-directed microtubule motor. **Nature** 359: 540–543. 1992.

SCHRAMM, S. A novel mouse synaptonemal complex protein is essential for loading of central element proteins, recombination, and fertility. **PLoS Genet** 7(5):e1002088. 2011.

SERRANO, E.A.; ARAYA-JAIME, C.; SUÁREZ-VILLOTA, E.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Meiotic behavior and H3K4m distribution in B chromosomes of *Characidium gomesi* (Characiformes, Crenuchidae). **Comparative Cytogenetics** v. 10, p. 255-268. 2016.

SIEGELJ, J.; AMON, A..New insights into the troubles of aneuploidy, **Annu. Rev. CellDev. Biol.** 28 189–214. 2012.

SIMON, P. Q-gene: processing quantitative real-time RT-PCR data. **Bioinformatics** 19:1439–1440. 2003.

STEEVES, G.; HANSEN, D.; LAMBOJ, A.. Cichlids of Africa. Vol. I: Haplochromines. **Grand Publishing**. 2010.

STOTHARD, P. The Sequence Manipulation Suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. **Biotechniques** 28:1102-1104. 2000.

TERRENOIRE, E.; MCRONALD, F.;HALSALL ,J.A.;PAGE, P.;ILLINGWORTH, R.S.;TAYLOR, A.M.;DAVISON, V.;O'NEILL, L.P.;TURNER, B.M.

Immunostaining of modified histones defines high-level features of the human metaphase epigenome. **Genome Biol.**;11/11.2010.

UNTERGASSER, A.; CUTCUTACHE, I.; KORESSAAR, T.; YE, J.; FAIRCLOTH B.C.; REMM, M. Primer3—new capabilities and interfaces. **Nucleic Acids Res.**40:e115. 10.1093. 2012.

VALENTE, G.T.; CONTE, M.A.; FANTINATTI, B.E.; CABRAL-DE-MELLO, D.C.; CARVALHO, R.F.; VICARI, M.R.; KOCHER, T.D.; MARTINS, C. Origin and evolution of B chromosomes in the cichlid fish *Astatotilapia latifasciata* based on integrated genomic analyses. **MolBiolEvol.** 31:2061–2072. 2014.

VALENTE, G. T.; NAKAJIMA, R. T.; FANTINATTI, B. E. A.; MARQUES, D. F.; ALMEIDA, R. O.; SIMÕES, R. P.; MARTINS, C. B chromosomes: from cytogenetics to systems biology. **Chromosoma**, v. 126, p. 73-81, 2017.

VILLENEUVE, A.M.; HILLERS, K.J. Whence meiosis? **Cell** 106:647–650. 2001.

VUJOŠEVIĆ, M.; BLAGOJEVIĆ, J. B chromosomes in populations of mammals. **Cytogenet Genome Res** 106:247–256. 2004.

WILKINS, A.S.; HOLLIDAY, R. The evolution of meiosis from mitosis. **Genetics** 181: 3–12. 2009.

WILSON, E. The supernumerary chromosome of Hemiptera. **Science.** 26:870-871. 1907.

YANG, Y.; FOULQUIÉ-MORENO, M.R.; CLEMENT, L.; ERDEI, E.; TANGHE, A.; SCHAERLAEKENS, K.; DUMORTIER, F.; THEVELEIN, J.M. QTL analysis of high thermotolerance with superior and downgraded parental yeast strains reveals new minor QTLs and converges on novel causative alleles involved in RNA processing. **PLoS Genet** 9(8):e1003693. 2013.

YOSHIDA, K.; TERAJ, Y.; MIZOIRI, S.; AIBARA, A.; NISHIHARA, H.; WATANABE, M.; KUROIWA, A.; HIRAI, H.; HIRAI, Y.; MATSUDA, Y.; OKADA, N. B Chromosomes Have a Functional Effect on Female Sex Determination in Lake Victoria Cichlid Fishes. **Plos Genetics** 7(8): e1002203. 2011.

## 9. Material suplementar

The SAS System

Obs	id	sex	b_pres	sycp2	mit	sep	kif11	tub1	interacao
1	1	0	1	0.037343	.	.	0.44427	.	0
2	2	0	1	0.027306	11.7208	3.2886	0.26616	0.26616	0
3	3	0	1	0.029231	15.0261	2.8787	0.41604	0.41604	0
4	4	0	1	0.029280	13.4425	3.5590	0.33918	0.33918	0
5	5	1	1	0.000076	9.1753	7.4772	1.22372	1.22372	1
6	6	1	1	.	13.4210	12.7886	0.03666	0.03666	1
7	7	1	1	0.000132	8.6249	10.4426	0.10655	0.10655	1
8	8	1	1	.	12.8260	10.0633	0.09569	0.09569	1
9	9	1	0	.	3.1394	10.3630	0.00895	0.00895	0
10	10	1	0	.	3.3053	9.8843	0.00129	0.00129	0
11	11	1	0	.	4.4162	16.8630	0.01008	.	0
12	13	1	0	0.000051	4.6868	8.9991	0.01141	0.01141	0
13	12	0	0	0.019803	11.7244	4.1780	0.10617	0.10617	0
14	14	0	0	0.015652	8.0839	3.0151	0.11124	0.11124	0
15	16	0	0	0.016608	7.5890	2.9588	0.11376	0.11376	0
16	17	0	0	0.083266	37.1662	9.1510	0.42978	0.42978	0

The GENMOD Procedure

**Model Information**

<b>Data Set</b>	WORK.NATALIA
<b>Distribution</b>	Gamma
<b>Link Function</b>	Log
<b>Dependent Variable</b>	sycp2

<b>Number of Observations Read</b>	16
<b>Number of Observations Used</b>	11
<b>Missing Values</b>	5

**Class Level Information**

<b>Class</b>	<b>Levels</b>	<b>Values</b>
sex	2	1 0
b_pres	2	1 0
interacao	2	1 0

**Criteria For Assessing Goodness Of Fit**

<b>Criterion</b>	<b>DF</b>	<b>Value</b>	<b>Value/DF</b>
<b>Deviance</b>	7	2.4394	0.3485
<b>Scaled Deviance</b>	7	11.3909	1.6273
<b>Pearson Chi-Square</b>	7	3.0588	0.4370
<b>Scaled Pearson X2</b>	7	14.2830	2.0404
<b>Log Likelihood</b>		49.3826	
<b>Full Log Likelihood</b>		49.3826	
<b>AIC (smaller is better)</b>		-88.7651	
<b>AICC (smaller is better)</b>		-76.7651	
<b>BIC (smaller is better)</b>		-86.7756	

Algorithm converged.

Analysis Of Maximum Likelihood Parameter Estimates							
Parameter	DF	Estimate	Standard Error	Wald 95% Confidence Limits		Wald Chi-Square	Pr > ChiSq
Intercept	1	-3.3863	0.2314	-3.8398	-2.9328	214.19	<.0001
Sex	1	-6.4927	0.5174	-7.5067	-5.4786	157.47	<.0001
Sex	0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	.	.
b_pres	1	-0.0942	0.3272	-0.7356	0.5471	0.08	0.7734
b_pres	0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	.	.
interacao	1	0.8031	0.6545	-0.4796	2.0858	1.51	0.2198
interacao	0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	.	.
Scale	1	4.6695	1.9242	2.0822	10.4720		

Note: The scale parameter was estimated by maximum likelihood.

LR Statistics For Type 3 Analysis			
Source	DF	Chi-Square	Pr > ChiSq
sex	1	20.14	<.0001
b_pres	1	0.08	0.7738
interacao	1	1.34	0.2474



The GENMOD Procedure

**Model Information**

<b>Data Set</b>	WORK.NATALIA
<b>Distribution</b>	Gamma
<b>Link Function</b>	Log
<b>Dependent Variable</b>	mit

<b>Number of Observations Read</b>	16
<b>Number of Observations Used</b>	15
<b>Missing Values</b>	1

**Class Level Information**

<b>Class</b>	<b>Levels</b>	<b>Values</b>
sex	2	1 0
b_pres	2	1 0
interacao	2	1 0

**Criteria For Assessing Goodness Of Fit**

<b>Criterion</b>	<b>DF</b>	<b>Value</b>	<b>Value/DF</b>
<b>Deviance</b>	11	2.1689	0.1972
<b>Scaled Deviance</b>	11	15.3525	1.3957
<b>Pearson Chi-Square</b>	11	2.6021	0.2366
<b>Scaled Pearson X2</b>	11	18.4186	1.6744
<b>Log Likelihood</b>		-39.8112	
<b>Full Log Likelihood</b>		-39.8112	
<b>AIC (smaller is better)</b>		89.6224	
<b>AICC (smaller is better)</b>		96.2891	
<b>BIC (smaller is better)</b>		93.1627	

Algorithm converged.

Analysis Of Maximum Likelihood Parameter Estimates							
Parameter	DF	Estimate	Standard Error	Wald 95% Confidence Limits		Wald Chi-Square	Pr > ChiSq
Intercept	1	2.7814	0.1879	2.4130	3.1497	219.03	<.0001
Sex	1	-1.4237	0.2658	-1.9446	-0.9028	28.70	<.0001
Sex	0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	.	.
b_pres	1	-0.1864	0.2871	-0.7490	0.3763	0.42	0.5162
b_pres	0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	.	.
interacao	1	1.2277	0.3912	0.4609	1.9945	9.85	0.0017
interacao	0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	.	.
Scale	1	7.0784	2.5261	3.5169	14.2465		

Note: The scale parameter was estimated by maximum likelihood.

LR Statistics For Type 3 Analysis			
Source	DF	Chi-Square	Pr > ChiSq
sex	1	15.66	<.0001
b_pres	1	0.41	0.5211
interacao	1	7.46	0.0063

The GENMOD Procedure

**Model Information**

<b>Data Set</b>	WORK.NATALIA
<b>Distribution</b>	Gamma
<b>Link Function</b>	Log
<b>Dependent Variable</b>	kif11

<b>Number of Observations Read</b>	16
<b>Number of Observations Used</b>	16

**Class Level Information**

<b>Class</b>	<b>Levels</b>	<b>Values</b>
<b>sex</b>	2	1 0
<b>b_pres</b>	2	1 0
<b>interacao</b>	2	1 0

**Criteria For Assessing Goodness Of Fit**

<b>Criterion</b>	<b>DF</b>	<b>Value</b>	<b>Value/DF</b>
<b>Deviance</b>	12	11.3059	0.9422
<b>Scaled Deviance</b>	12	17.6483	1.4707
<b>Pearson Chi-Square</b>	12	10.6047	0.8837
<b>Scaled Pearson X2</b>	12	16.5536	1.3795
<b>Log Likelihood</b>		18.8685	
<b>Full Log Likelihood</b>		18.8685	
<b>AIC (smaller is better)</b>		-27.7370	
<b>AICC (smaller is better)</b>		-21.7370	
<b>BIC (smaller is better)</b>		-23.8741	

Algorithm converged.

Analysis Of Maximum Likelihood Parameter Estimates							
Parameter	DF	Estimate	Standard Error	Wald 95% Confidence Limits		Wald Chi-Square	Pr > ChiSq
Intercept	1	-1.6595	0.4002	-2.4438	-0.8751	17.19	<.0001
<b>Sex</b>	<b>1</b>	<b>-3.1769</b>	<b>0.5660</b>	<b>-4.2862</b>	<b>-2.0677</b>	<b>31.51</b>	<b>&lt;.0001</b>
Sex	0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	.	.
b_pres	1	0.6555	0.5660	-0.4538	1.7647	1.34	0.2468
b_pres	0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	.	.
<b>interacao</b>	<b>1</b>	<b>3.1749</b>	<b>0.8004</b>	<b>1.6061</b>	<b>4.7436</b>	<b>15.73</b>	<b>&lt;.0001</b>
interacao	0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	.	.
Scale	1	1.5610	0.5039	0.8291	2.9389		

Note: The scale parameter was estimated by maximum likelihood.

LR Statistics For Type 3 Analysis			
Source	DF	Chi-Square	Pr > ChiSq
sex	1	15.50	<.0001
b_pres	1	1.27	0.2589
interacao	1	10.77	0.0010

The GENMOD Procedure

**Model Information**

<b>Data Set</b>	WORK.NATALIA
<b>Distribution</b>	Gamma
<b>Link Function</b>	Log
<b>Dependent Variable</b>	sep

<b>Number of Observations Read</b>	16
<b>Number of Observations Used</b>	15
<b>Missing Values</b>	1

**Class Level Information**

<b>Class</b>	<b>Levels</b>	<b>Values</b>
sex	2	1 0
b_pres	2	1 0
interacao	2	1 0

**Criteria For Assessing Goodness Of Fit**

<b>Criterion</b>	<b>DF</b>	<b>Value</b>	<b>Value/DF</b>
<b>Deviance</b>	11	1.3483	0.1226
<b>Scaled Deviance</b>	11	15.2213	1.3838
<b>Pearson Chi-Square</b>	11	1.5636	0.1421
<b>Scaled Pearson X2</b>	11	17.6520	1.6047
<b>Log Likelihood</b>		-31.5426	
<b>Full Log Likelihood</b>		-31.5426	
<b>AIC (smaller is better)</b>		73.0851	
<b>AICC (smaller is better)</b>		79.7518	
<b>BIC (smaller is better)</b>		76.6254	

Algorithm converged.

Analysis Of Maximum Likelihood Parameter Estimates							
Parameter	DF	Estimate	Standard Error	Wald 95% Confidence Limits		Wald Chi-Square	Pr > ChiSq
Intercept	1	1.5740	0.1488	1.2823	1.8656	111.87	<.0001
<b>Sex</b>	<b>1</b>	<b>0.8708</b>	<b>0.2105</b>	<b>0.4583</b>	<b>1.2833</b>	<b>17.12</b>	<b>&lt;.0001</b>
Sex	0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	.	.
<b>b_pres</b>	<b>1</b>	<b>-0.3977</b>	<b>0.2273</b>	<b>-0.8433</b>	<b>0.0478</b>	<b>3.06</b>	<b>0.0802</b>
b_pres	0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	.	.
<b>interacao</b>	<b>1</b>	<b>0.2747</b>	<b>0.3098</b>	<b>-0.3325</b>	<b>0.8819</b>	<b>0.79</b>	<b>0.3752</b>
interacao	0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	.	.
Scale	1	11.2892	4.0628	5.5761	22.8557		

Note: The scale parameter was estimated by maximum likelihood.

LR Statistics For Type 3 Analysis			
Source	DF	Chi-Square	Pr > ChiSq
sex	1	11.30	0.0008
b_pres	1	2.73	0.0985
interacao	1	0.76	0.3822

The GENMOD Procedure

**Model Information**

<b>Data Set</b>	WORK.NATALIA
<b>Distribution</b>	Gamma
<b>Link Function</b>	Log
<b>Dependent Variable</b>	tub1

<b>Number of Observations Read</b>	16
<b>Number of Observations Used</b>	14
<b>Missing Values</b>	2

**Class Level Information**

<b>Class</b>	<b>Levels</b>	<b>Values</b>
sex	2	1 0
b_pres	2	1 0
interacao	2	1 0

**Criteria For Assessing Goodness Of Fit**

<b>Criterion</b>	<b>DF</b>	<b>Value</b>	<b>Value/DF</b>
<b>Deviance</b>	10	11.1621	1.1162
<b>Scaled Deviance</b>	10	15.5987	1.5599
<b>Pearson Chi-Square</b>	10	10.6442	1.0644
<b>Scaled Pearson X2</b>	10	14.8749	1.4875
<b>Log Likelihood</b>		15.1247	
<b>Full Log Likelihood</b>		15.1247	
<b>AIC (smaller is better)</b>		-20.2493	
<b>AICC (smaller is better)</b>		-12.7493	
<b>BIC (smaller is better)</b>		-17.0540	

Algorithm converged.

Analysis Of Maximum Likelihood Parameter Estimates							
Parameter	DF	Estimate	Standard Error	Wald 95% Confidence Limits		Wald Chi-Square	Pr > ChiSq
Intercept	1	-1.6595	0.4230	-2.4885	-0.8305	15.39	<.0001
<b>Sex</b>	<b>1</b>	<b>-3.2715</b>	<b>0.6461</b>	<b>-4.5378</b>	<b>-2.0052</b>	<b>25.64</b>	<b>&lt;.0001</b>
Sex	0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	.	.
<b>b_pres</b>	<b>1</b>	<b>0.5820</b>	<b>0.6461</b>	<b>-0.6843</b>	<b>1.8483</b>	<b>0.81</b>	<b>0.3677</b>
b_pres	0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	.	.
<b>interacao</b>	<b>1</b>	<b>3.3429</b>	<b>0.9137</b>	<b>1.5521</b>	<b>5.1338</b>	<b>13.39</b>	<b>0.0003</b>
interacao	0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	.	.
Scale	1	1.3975	0.4783	0.7146	2.7330		

Note: The scale parameter was estimated by maximum likelihood.

LR Statistics For Type 3 Analysis			
Source	DF	Chi-Square	Pr > ChiSq
Sex	1	11.94	0.0005
b_pres	1	0.80	0.3700
Interacao	1	8.72	0.0031