

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 28/03/2020.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Departamento de Morfologia

Laboratório de Biologia e Genética de Peixes

**DESENVOLVIMENTO DE CULTURA DE CÉLULAS ADERENTES EM
PEIXES NEOTROPICAIS E SUA APLICAÇÃO EM ESTUDOS CITOGENÉTICOS**

Fabilene Gomes Paim

Botucatu / SP

Março de 2018



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Departamento de Morfologia

Laboratório de Biologia e Genética de Peixes

**DESENVOLVIMENTO DE CULTURA DE CÉLULAS ADERENTES EM PEIXES
NEOTROPICAIS E SUA APLICAÇÃO EM ESTUDOS CITOGENÉTICOS**

Doutoranda: Fabilene Gomes Paim

Orientador: Prof. Dr. Claudio de Oliveira

Co-orientador: Dr. Leandro Maia

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética) do Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor.

Botucatu / SP

Março de 2018

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

Paim, Fabilene Gomes.

Desenvolvimento de cultura de células aderentes em peixes neotropicais e sua aplicação em estudos citogenéticos / Fabilene Gomes Paim. - Botucatu, 2018

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

Orientador: Claudio de Oliveira

Coorientador: Leandro Maia

Capes: 20200005

1. Peixe - Genética. 2. Linhagem celular. 3. Cromossomos. 4. Criopreservação. 5. Células - Cultura e meios de cultura. 6. Citogenética.

Palavras-chave: FISH; Peixes dulcícolas; criopreservação; cromossomos; linhagem celular.

Dedico a minha família, por apoiar meus sonhos
e conquistas, e ao meu pai (*in memoriam*) pela
admiração que tinha pela sua pequena cientista.

“A resposta que você der hoje talvez não valha mais amanhã. A resposta de hoje lhe parece certa, talvez amanhã seja contraditória. Melhor deixar espaço para a mudança, para a dúvida e diferentemente da sua casa feita de tijolos, o seu castelo nas nuvens pode estar sempre em construção”.

(Barbara S. Tammes, Livro Design interior, pg. 11).

Agradecimentos

Ao meu orientador Prof. Dr. Claudio de Oliveira, pelo exemplo de pesquisador e por todas as oportunidades oferecidas para o desenvolvimento deste trabalho. Obrigada pela confiança, incentivos, ensinamentos e amizade sempre.

Ao Prof. Dr. Fausto Foresti, pelo apoio e incentivo. Obrigada pelos conselhos e pelas conversas descontraídas. O senhor é um pesquisador por quem tenho muita admiração!

Ao Dr. Leandro Maia, pela ajuda no delineamento dos experimentos. Obrigada pelos ensinamentos e discussões na construção deste trabalho.

Ao técnico Renato Devidé, pela disposição em ajudar nas idas a campo e pela sua alegria e simpatia diariamente.

A Leticia Soares, por embarcar comigo nesse universo da citogenética. Obrigada pela paciência infinita, parceria e ajuda preciosa na construção deste trabalho.

A Najila Nolie e Maria Ligia, pela amizade e carinho sempre. Vocês são muito especiais para mim!

Aos colegas e grandes amigos do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes pelo ambiente saudável e descontraído. Cada um com jeito particular, sempre disposto e pronto a ajudar e ensinar naquilo que fosse possível. Obrigada pelos bons momentos durante o almoço e as risadas nas tardes do cafezinho!

Ao Prof. Dr. Diogo Teruo Hashimoto pela doação dos exemplares das espécies de peixes.

A Prof. Dr. Fernanda Landim por ter aberto as portas de seu laboratório para que pudesse iniciar meus primeiros experimentos e os seus alunos pela ajuda e paciência.

A Caroline Maia e Camila Dell'Aqua, pela ajuda nas análises, disponibilidade e discussão dos resultados da citometria de fluxo.

A Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu e ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas (Genética), pelo apoio e condições para a realização desta pesquisa.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade de tempo para avaliar e contribuir para este trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da Bolsa.

A minha família, por tornar tudo tão leve e alegre, em especial a minha mãe pelo amor incondicional as suas filhas. As minha irmãs, Fau e Noca, pelo carinho e amizade. Aos meus sobrinhos Júlia e Pedro, pelo carinho e alegria. E o mais novo, Henrique, que ainda nem chegou, mas já enche de amor o coração dessa tia. Vocês são minhas riquezas! Ao meu cunhado, Lucas e meu padrasto Aurélio por todo apoio e cuidado sempre.

As minhas amigas pela torcida constante, especialmente, Joara e Dinha que acreditaram em mim deste quando eu embarquei neste sonho. "Porque você é impossível de esquecer...".

A Deus pelo cuidado diário e por permitir que tudo isso seja possível! "Não fui eu que lhe ordenei? Seja forte e corajoso!"

A todas as pessoas que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

Resumo

Embora a ictiofauna Neotropical seja considerada a mais diversa do mundo, apenas 12,2% das espécies de peixes tiveram cariótipos descritos. A dificuldade de se obter preparações cromossômicas de boa qualidade para algumas espécies de peixes Neotropicais ainda é um dos grandes desafios na área de Citogenética, principalmente para peixes de pequeno e grande porte. Uma alternativa é uso de metodologias indiretas, tais como cultura de células, amplamente utilizada e estabelecida em mamíferos, entretanto para peixes ainda é pouco empregada pela dificuldade de padronização da técnica de isolamento e manutenção das culturas celulares. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo o desenvolvimento de uma metodologia de cultura de células aderentes para obtenção de cromossomos mitóticos em peixes neotropicais, estabelecendo linhagens celulares de diferentes espécies e a determinação de suas características citogenéticas. Seis espécies de peixes Neotropicais da ordem Characiformes foram utilizadas para obtenção das culturas primárias, desenvolvimento e criopreservação das linhagens celulares e análise citogeneticamente. Para obtenção das linhagens, células de tecido muscular foram isoladas usando enzimas proteolíticas. As células isoladas foram cultivadas em frascos ou placas tratadas com um filme à base de gelatina e mantidas à 27,5°C, 5% CO₂ em meio completo (DMEM+soro fetal bovino+antibióticos+antimicóticos). Quando as células cobriram toda a superfície do substrato, elas foram transferidas para novos frascos para obtenção das preparações cromossômicas e criopreservação. As preparações cromossômicas das linhagens celulares foram realizadas em diferentes passagens nas espécies e os cromossomos metafásicos obtidos apresentaram morfologia nítida e definida com grande número de metáfases por lâminas e, o número modal (2n) nas espécies foi mantido mesmo após o processo de criopreservação e sucessivos subcultivos. Além disso, o uso dessa tecnologia possibilitou a localização de sequências repetitiva de DNA em *Colossoma macropomum* e *Piaractus mesopotamicus*. No total, 28 linhagens celulares foram congeladas em diferentes passagens para as seis espécies com o número de células viáveis superiores 90% e depois de descongeladas a viabilidade celular foi superior a 50%. Esses resultados representam uma grande inovação para área de citogenética de peixes neotropicais e a aplicação desta metodologia poderá sanar algumas lacunas existentes de grupos de peixes ainda poucos explorados citogeneticamente pela dificuldade de obter preparações cromossômicas de boa qualidade que são cruciais para o sucesso de várias experiências. Além disso, essa técnica tornou possível a criação do primeiro banco de células de peixes neotropicais para América Latina.

Palavras-chave: Peixes dulcícolas, linhagem celular, cromossomos, FISH, criopreservação.

Abstract

Although Neotropical ichthyofauna is considered the most diverse in the world, only 12.2% had karyotypes described. The difficulty of obtaining good quality chromosome preparations for some Neotropical fish species is still one of the major challenges in the area of cytogenetics, especially for small and large fish. An alternative is the use of indirect methodologies, such as cell culture, widely used and established in mammals, however for fish is still little used for the difficulty of standardization of the technique of isolation and maintenance of cell culture. Thus, the present study aimed to develop a methodology for adherent cell culture to obtain mitotic chromosomes in Neotropical fish, establishing cell lines of different species and the cytogenetic characteristics of these lines. Six species of Neotropical fish of the order Characiformes were used to obtain primary cell, development and cryopreservation of the cell lines and cytogenetic analysis. To obtain the cell lines, muscle tissue were isolated using proteolytic enzymes. The isolated cells were cultured in flasks or plates treated with a gelatin-based film and maintained at 27.5 °C, 5% CO₂ in complete medium (DMEM + fetal bovine serum + antibiotics + antimycotics). When the cells covered almost all surface of the substrate, they were transferred to new flasks to obtain chromosome preparations and cryopreservation. The chromosome preparations of the cell lines were performed in different passages in the species and the metaphase chromosomes obtained showed clear and defined morphology with a large number of metaphases per slide and the modal number (2n) in the species was maintained even after the cryopreservation process and successive subcultures. In addition, the use of this technology enabled the localization of repetitive DNA sequences in *Colossoma macropomum* and *Piaractus mesopotamicus*. In total, 28 cell lines were cryopreserved at different passage levels for the six species with viable cell numbers higher than 90% and after thawing the cell viability was greater than 50%. These results show a great innovation for the cytogenetic area of Neotropical fishes and the application of this methodology might correct some existing gaps in fish groups which have been a little explored cytogenetically due to the difficulty of obtaining good quality chromosome preparations that are crucial for the success of several experiments. In addition, this technique made possible the creation of the first Neotropical fish cell bank in Latin America.

Key words: Freshwater fish, cell lines, chromosomes, FISH, cryopreservation.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

- Figura 1: Morfologia fibroblastóide das células aderidas provenientes da digestão enzimática do tecido muscular de *Astyanax altiparanae* após 72 horas de cultivo (A). Essas células após 10 dias de cultivo apresentaram confluência celular superior a 80% (B) e quando subcultivadas apresentaram confluência em 48 e 72 horas de cultivo. Note as células fibroblastóides subcultivadas na terceira passagem após 72 horas (C). Em (D), colônias de células fibroblastóides na quarta passagem após seis dias pós- descongelamento. Essas células apresentaram confluência celular após 18 dias (E) e após subcultivadas essas células ocuparam a superfície do frasco em quatro dias. Note células pós-descongelamento na sexta passagem após 24 horas de subcultivadas (F). A barra em A, B e C 200µm e D, E e F 100µm em aumento de 10X.38
- Figura 2: Cromossomos metafásicos obtidos de células fibroblastóides de *Astyanax altiparanae* na quarta passagem antes do congelamento (A) e na sexta passagem pós-descongelamento (B). A barra equivale a 20 µm.....39

Capítulo 2

- Figura 1: Cultivo primário de células fibroblastóides do tecido muscular de *Astyanax altiparanae* após 72 horas de cultivo (A). Células subcultivadas na terceira passagem com confluência celular de 80% (B). Células fibroblastóides após 18 dias pós-descongelamento (D). Células de *A. altiparanae* subcultivadas depois do processo de criopreservação na sexta passagem (E). Cromossomos metafásicos obtidos de células fibroblastóides na quarta passagem (C) e na sexta passagem depois do processo de congelamento e descongelamento. A barra em A e B 200µm, D e E 100µm em aumento de 10X e C e F 100µm em aumento de 100X.....52
- Figura 2: Cultivo primário de células fibroblastóides do tecido muscular de *Astyanax bockmanni* após 72 horas de cultivo (A). Células subcultivadas na quarta passagem com confluência celular de 80% (B). Células fibroblastóides após 15 dias pós-descongelamento (D). Células de *A. altiparanae* subcultivadas depois do processo de

criopreservação na sexta passagem (E). Cromossomos metafásicos obtidos de células fibroblastóides na quinta passagem (C) e na sexta passagem depois do processo de congelamento e descongelamento. A barra em A e B 200µm, D e E 100µm em aumento de 10X e C e F 100µm em aumento de 100X.....53

Figura 3: Cultivo primário de células fibroblastóides do tecido muscular de *Astyanax paranae* após 48 horas de cultivo (A). Células subcultivadas na segunda passagem com confluência celular de 80% (B). Células fibroblastóides após 12 dias pós-descongelamento (D). Células de *A. paranae* subcultivadas depois do processo de criopreservação na quarta passagem (E). Cromossomos metafásicos obtidos de células fibroblastóides na terceira passagem (C) e na quarta passagem depois do processo de congelamento e descongelamento. A barra em A e B 200µm, D e E 100µm em aumento de 10X e C e F 100µm em aumento de 100X.....54

Figura 4: Cultivo primário de células fibroblastóides do tecido muscular de *Megaleporinus macrocephalus* após 72 horas de cultivo (A). Células subcultivadas na primeira passagem com confluência celular superior a 80% (B). Células fibroblastóides após cinco dias pós-descongelamento (D). Células de *M. macrocephalus* subcultivadas depois do processo de criopreservação na terceira passagem (E). Cromossomos metafásicos obtidos de células fibroblastóides na primeira passagem (C) e na terceira passagem depois do processo de congelamento e descongelamento. A barra em A e B 200µm, D e E 100µm em aumento de 10X e E e F 100µm em aumento de 100X.....55

Figura 5: Cultivo primário de células fibroblastóides do tecido muscular de *Colossoma macropomum* e *Piaractus mesopotamicus* após 72 horas de cultivo (A e D). Células subcultivadas na primeira passagem com confluência celular superior a 80% (B e E). Cromossomos metafásicos obtidos de células fibroblastóides de *C. macropomum* e *P. mesopotamicus* na segunda passagem (C e F). A barra em A, B, C e D 200µm em aumento de 10X e C e F 100µm em aumento de 100X.....56

Capítulo 3

Figura 1: Metafases de *Colossoma macropomum* e *Piaractus mesopotamicus* após os experimentos de FISH com sondas de DNAr 18S, DNAr 5S, snRNA U1 e snRNA U2. A barra equivale 20 µm.....66

LISTA DE TABELAS

Material e Métodos

TABELA 1: Espécies de peixes Neotropicais analisadas neste estudo, número de indivíduos (N), sexo - ♀ para fêmeas, ♂ para machos, NI não identificado, local de coleta.....	21
---	----

Capítulo 2

TABELA 1: Sumário dos experimentos de cultivo primário e subcultivos das espécies analisadas nesse estudo.....	57
TABELA 2: Sumário dos experimentos de criopreservação das linhagens celulares das espécies analisadas nesse estudo utilizando o método de exclusão de Azul de trypan.....	58
TABELA 3: Sumário dos resultados das análises de viabilidade, apoptose e necrose das linhagens celulares analisadas nesse estudo por citometria de fluxo utilizando Anexina V e iodeto de propídeo.....	59

Capítulo 3

TABELA 1: Primers usados na amplificar os fragmentos dos genes DNAr 18S, DNAr 5S, RNAsn U1 e RNAsn U2.....	67
--	----

SUMÁRIO

1.	Introdução	15
1.1.	Estudos citogenéticos em Peixes Neotropicais	15
1.2.	Culturas de células aderentes e linhagens celulares	17
1.3.	Cultura de células para estudos cromossômicos em peixes	18
2.	Objetivos	19
2.1.	Objetivo principal	19
2.2.	Objetivos Específicos.....	20
3.	Material e Métodos.....	20
3.1	Material	20
3.1.1	Espécies estudadas e locais de coleta	20
3.2	Métodos	22
3.2.1	Obtenção da cultura primária e desenvolvimento das linhagens celulares.	22
3.2.2	Criopreservação e teste viabilidade celular	24
3.2.3	Análise de apoptose e necrose.....	25
3.2.4	Obtenção dos cromossomos mitóticos	25
3.2.5	Análise dos dados citogenéticos.....	26
3.3	Hibridação <i>in situ</i> fluorescente (FISH).....	26
4.	Resultados e Discussão.....	29
	Capítulo 1: Um novo protocolo de cultura de células para peixes neotropicais	30
	Capítulo 2: Banco de linhagens celulares de peixes neotropicais para estudos citogenéticos.....	40
	Capítulo 3: Mapeamento cromossômico de sequências de DNA repetitivos em linhagens celulares de espécies da família Serrasalminidae Bleeker, 1859 (Characiformes)	60
5.	Considerações finais.....	68

6.	Referências bibliográficas	69
----	----------------------------------	----

1. Introdução

1.1. Estudos citogenéticos em Peixes Neotropicais

A região Neotropical compreende desde a parte sul do México até a América do Sul e, abriga a mais rica e mais diversificada fauna de peixes do mundo. Estima-se que existam para essa região, 5160 espécies de peixes de água doce, alocadas em 739 gêneros, 69 famílias e 20 ordens, o que representa um terço de todos os peixes dulcícolas existentes no planeta (Reis et al. 2016). A maior parte dessa diversidade está agrupada dentre os Characiformes e Siluriformes, mas há ainda lacunas de informações em muitos grupos (Albert e Reis 2011).

Toda essa diversidade tem sido objeto de estudo em diferentes áreas, entre elas, na Citogenética. Essa área começou se destacar a partir do desenvolvimento de metodologias que permitiram a obtenção de preparações cromossômicas de qualidade (Bertollo et al. 1978; Foresti et al. 1981) tornando uma ferramenta para avaliação da biodiversidade não apenas na região Neotropical, mas em outras partes do mundo. De fato, o número de estudos citogenéticos cresceu após as publicações destas metodologias e tem resultado não apenas em descrição cariotípica, mas também em estudos com abordagens citotaxonômicas, aplicabilidade na aquicultura, filogenia e evolução cariotípica, bem como na identificação de híbridos de peixes cultivados (Porto-Foresti et al. 2008; Hashimoto et al. 2009; Vicari et al. 2010; Tenório et al. 2013; Ramirez et al. 2017).

Há vários motivos que tornam os peixes bons modelos para estudos citogenéticos, entre eles, a enorme variação cromossômica encontrada em alguns grupos, como por exemplo, nos Characiformes, onde é possível observar dois padrões de variações cromossômicas. Nas famílias Anostomidae, Crenuchidae, Chilodontidae, Hemiodontidae, Prochilodontidae e Parodontidae quase não há modificações quanto ao número e estrutura cromossômica, enquanto nas famílias Characidae, Curimatidae, Erythrinidae, e Lebiasinidae existem uma maior variação quanto ao número cromossômico, variando de $2n = 22$ a 102 cromossomos (Arai 2011). Outro grupo que também se destaca pela sua diversificação cromossômica são os Siluriformes, como na família Ariidae com variação pequena do número diploide, $2n = 54$ a 56 cromossomos, em contrapartida nos Callichthyidae e Loricariidae essas alterações são maiores com número diploide de $2n = 44$ a 120 cromossomos e $2n = 38$ a 80 cromossomos, respectivamente (Arai 2011).

Além disso, a presença de diferentes sistemas de determinação de sexo encontrada em alguns grupos de peixes é outro aspecto que chama bastante atenção na área da pesquisa citogenética. São encontrados vários tipos de sistemas sexuais em peixes: sistemas simples com heterogametia masculina (XX/XY), como em *Hoplias malabaricus* (Born e Bertollo 2006) e no gênero *Eigenmannia* (Sene et al. 2014; Silva et al. 2015) e com heterogametia feminina (ZZ/ZW) como no gênero de *Megaleporinus* (Ramirez et al. 2017), *Characidium* (Scacchetti et al. 2015), *Hypostomus ancistroides* (Kanei et al. 2017), *Triportheus* (Yano et al. 2014; Yano et al. 2016), entre outros; e sistemas múltiplos do tipo $X_1X_1 X_2X_2 / X_1Y_1 X_2Y_2$ como em *Bunocephalus coracoideus* (Ferreira et al. 2016), tipo XX/ $XY_1 Y_2$ em *Gymnotus bahianus* (Almeida et al. 2015), tipo $X_1X_1 X_2X_2 / X_1X_2Y$ em *Harttia punctata* (Blanco et al. 2014) e no gênero *Eigenmannia* (Sene et al. 2014). E ainda sistemas sexuais derivados, como por exemplo, ZZ/Z0 descrito para *Eigenmannia trilineata* (Araya-Jaime 2017).

Outro aspecto também investigado dentro da citogenética de peixes é a ocorrência de cromossomos supranumerários. Esses cromossomos são elementos genômicos extras ao conjunto cromossômico padrão A e já foram descritos em fungos, plantas e animais (Camacho 2005). Em peixes, já foram descritos em mais de 60 espécies de peixes neotropicais (Carvalho et al. 2008), sendo os gêneros *Astyanax*, *Moenkhausia*, *Prochilodus* e *Characidium* estão entre os mais estudados, especialmente quanto à origem, composição, distribuição, comportamento e função desses cromossomos (Silva et al. 2014, 2016; Utsunomia et al. 2016; Melo et al. 2017; Serrano et al. 2017).

Embora a região Neotropical apresente toda essa diversidade de peixes e um cenário que proporciona estudos citogenéticos e evolutivos, o conhecimento citogenético dessa rica ictiofauna ainda é deficiente. Estima-se que apenas 12,2% das espécies de peixes tiveram o cariótipo descrito, sendo 344 espécies de Characiformes, 440 espécies de Siluriformes, 354 espécies de Cyprinodontiformes e 139 espécies de Cichlidae (Perciformes), enquanto dados para a maioria das outras ordens ainda são considerados escassos (Arai 2011).

5. Considerações finais

- A metodologia apresentada de isolamento e cultivo de células nas diferentes espécies peixes neotropicais representa uma grande inovação para área de citogenética de peixes neotropicais;
- A aplicação desta metodologia poderá sanar algumas lacunas existentes de grupos de peixes ainda poucos explorados citogeneticamente pela dificuldade de obter preparações cromossômicas de boa qualidade que são cruciais para o sucesso de várias experiências;
- É primeira vez que é proposta o estabelecimento de linhagens celulares para peixes neotropicais com o intuito da criação do primeiro banco de células de peixes neotropicais para pesquisas na área da citogenética;
- O desenvolvimento das linhagens poderá abrir novas oportunidades para estudos em outras áreas, como por exemplo, nas interações entre hospedeiro patógeno;
- As linhagens celulares obtidas neste estudo mantiveram os números diplóides das espécies, mesmo após o processo de criopreservação e sucessivas passagens;
- O uso de tecnologia de culturas possibilitou a localização de sequências de DNA repetitivos exclusivo em *P. mesopotamicus* e *C. macropomum* que poderão ser utilizadas em estudos futuros de biotecnologia aplicáveis a aquicultura.

6. Referências bibliográficas

- Albert JS, Reis RE. 2011. Historical biogeography of neotropical freshwater fishes. Berkeley, University of California Press.
- Alexander MS, Kawahara G, KHO AT, Howell MH, et al. 2010. Isolation and transcriptome analysis of adult zebrafish cells enriched for skeletal muscle progenitors. *Muscle & Nerve*. DOI 10.1002/mus.21972.
- Almeida JS, Miguez VH, Diniz D, Affonso PRAM. 2015. A unique sex chromosome system in the knifefish *Gymnotus bahianus* with inferences about chromosomal evolution of Gymnotidae. *Journal of Heredity*, 106, 2, 177–183. DOI:10.1093/jhered/esu087.
- Amemiya CT, John WB, John R G. 1984. A Cell Culture Technique for Chromosome Preparation in Cyprinid Fishes. *Copeia*, 1984(1): 232–235.
- Arai R. 2011. *Fish Karyotypes: A Check List*. Springer, Japan.
- Araya-Jaime C, Mateussi NTB, Utsunomia R, Costa-Silva GJ, Oliveira C, Foresti F. 2017. ZZ/Z0: The new system of sex chromosomes in *Eigenmannia aff. trilineata* (Teleostei: Gymnotiformes: Sternopygidae) characterized by molecular cytogenetics and DNA Barcoding. *Zebrafish*. DOI: 10.1089/zeb.2017.1422
- Baust JM, Buskirk RV, Baust JG. 2000. Cell viability improves following inhibition of cryopreservation-induced apoptosis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, 36(4):262-270. [https://doi.org/10.1290/1071-2690\(2000\)036<0262:CVIFIO>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1290/1071-2690(2000)036<0262:CVIFIO>2.0.CO;2).
- Bertollo LAC, Takahashi CS, Moreira-Filho O. 1978. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Brazilian Journal of Genetics*, 2, 103–120.
- Bejar J, Borrego JJ, Alvarez MC. 1997. A continuous cell line from the cultured marine fish fillet-head seabream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture*, 150, 143–153.
- Blanco DR, Vicari MR, Lui RL, Artoni RF, Almeida MC, Traldi JB, Margarido VP, Moreira-Filho O. 2014. Origin of the X1X1X2X2/X1X2Y sex chromosome system of *Harttia punctata* (Siluriformes, Loricariidae) inferred from chromosome painting and FISH with ribosomal DNA markers. *Genetica*, 142, 119–126. DOI 10.1007/s10709-014-9759-4.
- Born GG, Bertollo LAC. 2006. A new sympatric region for distinct karyotypic forms of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae). *Braz. J. Biol.*, 66, 1B, 205-210.

- Bueno D, Palacios-Gimenez OM, Cabral-de-Mello DC (2013) Chromosomal Mapping of Repetitive DNAs in the Grasshopper *Abracris flavolineata* Reveal Possible Ancestry of the B Chromosome and H3 Histone Spreading. In: Wutz A (Ed.) PLoS ONE 8: e66532. [https:// doi.org/10.1371/journal.pone.0066532](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066532).
- Bydlowski SP, Debes AA, Maselli LMF, Janz FL. 2009. Biological characteristics of mesenchymal stem cells. Rev. Bras. Hematol. Hemoter., 31, (Supl. 1), 25-35.
- Camacho JPM. 2005. B chromosomes. In: Gregory TR editor. The Evolution of the Genome. Elsevier, San Diego. p 223-286.
- Carvalho RA, Martins-Santos IC, Dias AL. 2008. B chromosomes: an update about their occurrence in freshwater Neotropical fishes (Teleostei). Journal of Fish Biology, 72, 1907–1932.
- Chen SL, Qin QW. 2011. Theory and Technology of Fishes Cell Culture. Beijing: Science Press.
- Chi SC, Hu WW, Lo BJ. 1999. Establishment and characterization of a continuous cell line (GF-1) derived from grouper , *Epinephelus coioides* (Hamilton): a cell line susceptible to grouper nervous necrosis virus (GNNV). Journal of Fish Diseases, 22, 173–182.
- Cioffi MB, Bertollo LAC. 2012. Chromosomal Distribution and Evolution of Repetitive DNAs in Fish. Garrido- Ramos MA (ed): Repetitive DNA. Genome Dyn. Basel, Karger, vol 7, pp 197–221.
- Doke SK, Dhawale SC. 2015. Alternatives to animal testing: A review. Saudi Pharmaceutical Journal, 23, 223–229.
- Domingues MS, Vicari MR, Abilhoa V, Wamser JP, Cestari MM, Bertollo LAC, Almeida MC, Arton RF. 2007. Cytogenetic and comparative morphology of two allopatric populations of *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Teleostei: Characidae) from upper rio Paraná basin. Neotropical Ichthyology, 5(1):37-44.
- Dubey A, Goswami M, Yadav K, Mishra A, Kumar A. 2015. Establishment of a Novel Muscle Cell Line From *Wallago attu* for In Vitro Study of Pesticide Toxicity. Gene Cell Tissue, 2, 1, e25568.
- Eschmeyer WN, Fong, JD. 2018. Catalog of fishes. Disponível em <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>. Acessado em 20 de fevereiro de 2018.

- Fent K. 2001. Fish cell lines as versatile tools in ecotoxicology: assessment of cytotoxicity, cytochrome P4501A induction potential and estrogenic activity of chemicals and environmental samples. *Toxicology in vitro*, 15, (4-5), 477–488.
- Fernandes CA, Martins-Santos IC. 2004. Cytogenetic studies in two populations of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes). *Hereditas*, 141, 328-332.
- Ferreira M, Garcia C, Matoso DA, Jesus IS, Feldberg E. 2016. A new multiple sex chromosome system X1X1X2X2/X1Y1X2Y2 in Siluriformes: cytogenetic characterization of *Bunocephalus coracoideus* (Aspredinidae). *Genetica*, 144, 591–599. DOI 10.1007/s10709-016-9927-9.
- Foresti F, Toledo-Filho AS, Almeida-Toledo, LF. 1981. Polymorphic nature of the nucleolus organizer regions in fishes. *Cytogenet Cell Genet*, 31: 134–141.
- Foresti F, Oliveira C, Almeida-Toledo LF. 1993. A method for chromosome preparations from large fish specimens using in vitro short-term treatment with colchicine. *Experientia*, 49, 810-813.
- Freshney RI. 2005. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, 5rd ed. New York: John Wiley and Son.
- Freshney RI. 2010. *Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications*. 6th ed. New Jersey: John Wiley and Sons.
- Fryer JL, Lannan CN. 1994. Three decades of fish cell culture: A current listing of cell lines derived from fishes. *Journal of Tissue Culture Methods*, 16, 87-94.
- Fu X, Li N, Lai Y, Luo X, Wang Y, et al. 2015. A novel fish cell line derived from the brain of Chinese perch *Siniperca chuatsi*: development and characterization. *Journal of Fish Biology*, 86, 32–45. doi:10.1111/jfb.12540.
- Graf M, Hartmann N, Reichwald K, Englert C. 2013. Absence of replicative senescence in cultured cells from the short-lived killifish *Nothobranchius furzeri*. *Experimental Gerontology*, 48: 17–28.
- Gignac SJ, Vo NTK, Mikhaeil MS, Alexander AN et al. 2014. Derivation of a continuous myogenic cell culture from an embryo of common killifish, *Fundulus heteroclitus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 175, 15–27.
- Hashimoto DT, Laudicina A, Bortolozzi J, Foresti F, Porto-Foresti F. 2009. Chromosomal features of nucleolar dominance in hybrids between the Neotropical fish *Leporinus*

- macrocephalus* and *Leporinus elongatus* (Characiformes, Anostomidae). *Genetica*, 137: 135–140. DOI: 10.1007/s10709-009-9366-y.
- Hashimoto DT, Parise-Maltempi PP, Laudicina A, Bortolozzi J, Senhorini JA, Foresti F, Porto-Foresti F. 2009. Repetitive DNA probe linked to sex chromosomes in hybrids between Neotropical fish *Leporinus macrocephalus* and *Leporinus elongatus* (Characiformes, Anostomidae). *Cytogenet Genome Res*, 124:151–157. DOI:10.1159/000207523.
- Helgason CD e Miller CL. 2013. *Basic Cell Culture Protocols*. 4^o ed. Humana Press. doi: 10.1007/978-1-62703-128-8.
- Henry CM, Hollville E, Martin SJ. 2013. Measuring apoptosis by microscopy and flow cytometry. *Methods*, 61, 90–97.
- Hernandez N. 2001. Small nuclear RNA genes: a model system to study fundamental mechanisms of transcription. *J Biol Chem* 276:26733–26736.
- Kamei MCSL, Baumgärtner L, Paiva S, Zawadzki CH, Martins-Santos IC, Portela-Castro ALB. 2017. Chromosomal Diversity of Three Species of *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes, Loricariidae), from the Paraná River Basin, Brazil: A Species Complex in *Hypostomus ancistroides* Reinforced by a ZZ/ZW Sex Chromosome System. *Zebrafish*, Volume 14, Number 4. DOI: 10.1089/zeb.2017.1429.
- Khalili AA, Ahmad MR. 2015. A Review of Cell Adhesion Studies for Biomedical and Biological Applications. *Int. J. Mol. Sci.*, 16, 18149-18184; doi:10.3390/ijms160818149.
- Keijing A, Haiying L, Shidong G, Kumar DNT, Qingqing W. 2010. Preparation of fish gelatin and fish gelatin/poly(l-lactide) nanofibers by Electrospinning. *International Journal of Biological Macromolecules*, 47, 380–388. doi:10.1016/j.ijbiomac.2010.06.002.
- Kim MS, Nam YK, Park C et al. 2014. Establishment condition and characterization of heart-derived cell culture in Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*). *In Vitro Cell.Dev.Biol. - Animal* 50: 909–917. DOI 10.1007/s11626-014-9793-7.
- Kumar A, Singh N, Goswami M, Srivastava JK, Mishra AK, & Lakra WS. 2016. Establishment and Characterization of a New Muscle Cell Line of Zebrafish (*Danio rerio*) as an *In Vitro* Model for Gene Expression Studies. *Animal Biotechnology*, 27:3, 166-173, DOI: 10.1080/10495398.2016.1147455.

- Lakra WS, Goswami M, Rajaswaminathan T, Rathore G. 2010. Development and characterization of two new cell lines from common carp, *Cyprinus carpio* (Linn). *Biol Res*, 43: 385-392.
- Lakra WS, Swaminathan TR, Joy KP. 2011. Development, characterization, conservation and storage of fish cell lines: a review. *Fish Physiol Biochem*, 37:1–20. DOI 10.1007/s10695-010-9411-x.
- Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, Thompsons EW. 2006. The epithelial–mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *The Journal of Cell Biology*, Vol. 172, No. 7, 2006 973–981. <http://www.jcb.org/cgi/doi/10.1083/jcb.200601018>.
- Liao D.1999. Concerted Evolution: Molecular Mechanism and Biological Implications. *Am. J. Hum. Genet.* 64:24–30.
- Lorenzini A, Maier AB. 2016. Influence of Donor Age and Species Longevity on Replicative Cellular Senescence. In: S.I.S. Rattan, L. Hayflick (eds.), *Cellular Ageing and Replicative Senescence, Healthy Ageing and Longevity 4*, DOI 10.1007/978-3-319-26239-0_4. p. 49-70.
- Jégu M. 2003. Subfamily Serrasalminae (pacus and piranhas). In: Reis RE, Kullander SO and Ferraris Jr CJ (eds) Check list of Freshwater Fishes of South and Central America. Edipucrs, Porto Alegre, pp 182-196.
- Jensen I, Steiro K, Sommer AI, Mennen S, Johansen A, Sandaker EK, Seppola. 2013. Establishing a cell line from Atlantic cod as a novel tool for in vitro studies. *Fish & Shellfish Immunology*, 34, 199-208. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2012.10.022>.
- Jing H, Lin X, Xu L, Gao L, Zhang M, Wang N, Wu S. 2017. Establishment and characterization of a heart-derived cell line from goldfish (*Carassius auratus*). *Fish Physiol Biochem*. DOI 10.1007/s10695-017-0345-4.
- Junqueira LC, Carneiro J. 2013. *Histologia básica*. 12^o ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Majeed AS, Nambi KSN, Taju G, Hameed S. 2013. Development, characterization and application of a new fibroblast-like cell line from kidney of a freshwater air breathing fish *Channa striatus* (Bloch, 1793). *Acta Tropica*, 127, 25-32.
- Maneechot N, Yano CF, Bertollo LAC, Getlekha N, Molina WF, Ditcharoen S, Tengjaroenkul B, Supiwong W, Alongklod T, Cioffi MB. 2016. Genomic organization of

- repetitive DNAs highlights chromosomal evolution in the genus *Clarias* (Clariidae, Siluriformes). *Molecular Cytogenetics*, 9, 4. DOI 10.1186/s13039-016-0215-2.
- Martinez ERM, Alves AL, Silveira SM, Foresti F, Oliveira C. 2012. Cytogenetic analysis in the *incertae sedis* species *Astyanax altiparanae* Garutti and Britzki, 2000 and *Hyphessobrycon eques* Steindachner, 1882 (Characiformes, Characidae) from the upper Paraná river basin. *Comparative Cytogenetics* 6 (1): 41–51. DOI: 10.3897/CompCytogen.v6i1.1873.
- Masters JR. 2002. HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly. *Nature Reviews – Cancer*, v.2, 315-319.
- Melo S, Utsunomia R, Penitente M, Sobrinho-Scudeler PE, Porto-Foresti F, Oliveira C, Foresti F, Dergam JA. 2017. B chromosome dynamics in *Prochilodus costatus* (Teleostei, Characiformes) and comparisons with supernumerary chromosome system in other *Prochilodus* species. *Comparative Cytogenetics* 11(2): 393–403. DOI: <https://doi.org/10.3897/CompCytogen.v11i2.12784>.
- Mello F, Streit Jr DP, Sabin N, Gabillard JC. 2015. Dynamic expression of *tgf-β2*, *tgf-β3* and inhibin βA during muscle growth resumption and satellite cell differentiation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *General and Comparative Endocrinology*, 210, 23–29. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.10.011>.
- Merten O-W. 2015 Advances in cell culture: anchorage dependence. *Phil. Trans. R. Soc. B* 370: 20140040. DOI: <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2014.0040>.
- Moraes AM, Augusto EFP, Castilho LR. 2014. Tecnologia do cultivo de células animais: do biofármacos a terapia gênica. Roca, São Paulo.
- Morcillo P, Chaves-Pozo E, Meseguer J, Esteban MA, Cuesta A. 2017. Establishment of a new teleost brain cell line (DLB-1) from the European sea bass and its use to study metal toxicology. *Toxicology in Vitro*, 38, 91–100.
- Nakayama CM, Feldberg E, Bertollo LAC. 2012. Karyotype differentiation and cytotaxonomic considerations in species of Serrasalminidae (Characiformes) from the Amazon basin. *Neotropical Ichthyology*, 10, 1, 53-58.
- Nakayama CM, Feldberg E, Bertollo Lac. 2008. Mapping of ribosomal genes and chromosomal markers in three species of the genus *Serrasalmus* (Characidae, Serrasalminae) from the Amazon basin. *Genetics and Molecular Biology*, 31, 4, 868-873.

- Nelson JS. 2006. Fishes of the World. 4th ed. John Wiley and Sons, New York, 601 pp.
- Neto MF, Vicari MR, Camargo EF, Artoni RF, Moreira-Filho O. 2009. Comparative cytogenetics among populations of *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae, *Incertae sedis*). Genetics and Molecular Biology, 32, 4, 792-796.
- Oliveira MLM, Utsunomia R, Pansonato-Alves JC, Scacchetti PC, Primo CC, Vicari MR, Artoni RF, Centofante L, Moreira-Filho O, Oliveira O, Foresti F. 2016. Microstructural chromosome reorganization in the genus *Trichomycterus* (Siluriformes: Trichomycteridae). Neotropical Ichthyology, 14(2): e150084, 2016 DOI: 10.1590/1982-0224-20150084.
- Oliveira IA, Argolo LA, Bitencourt JA, Diniz D, Vicari MR, Affonso PRAM. 2015. Cryptic Chromosomal Diversity in the Complex “*Geophagus*” *brasiliensis* (Perciformes, Cichlidae). ZEBRAFISH, Volume 00, Number 00, 1-12.
- Oyeleye OO, Ogundeji ST, Ola SI, Omitogun OG. 2016. Basics of animal cell culture: Foundation for modern science. Biotechnology and molecular biology reviews, 11, 2, 6-16. DOI: 10.5897/BMBR2016.0261.
- Parise-Maltempi PP, Silva EL, Rens W, Dearden F, Brien PCMO, Trifonov V, Ferguson-Smith MA. 2013. Comparative analysis of sex chromosomes in *Leporinus* species (Teleostei, Characiformes) using chromosome painting. BMC Genetics, 14, 60. <http://www.biomedcentral.com/1471-2156/14/60>.
- Pendas A, Moran P, Freije J, Garcia-Vazquez E (1994) Chromosomal mapping and nucleotide sequence of two tandem repeats of Atlantic salmon 5S rDNA. Cytogenetic and Genome Research 67, 31–36. <https://doi.org/10.1159/000133792>
- Peres CM, Curi R. 2005. Como cultivar células. 1ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 283p.
- Pham PH, Vo NTK, Tan EJH, Russell S, Jones G, Lumsden JS, Bols NC. 2016. Development of an Atlantic salmon heart endothelial cell line (ASHe) that responds to lysophosphatidic acid (LPA). In Vitro Cell.Dev.Biol. — Animal. DOI 10.1007/s11626-016-0077-2.
- Pinkel D, Straume T, Gray JW. 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 83, 2934–2938.
- Pisano E, Ghigliotti L. 2009. Ribosomal genes in notothenioid fishes: Focus on the chromosomal organization. Marine Genomics, 2, 75–80.

- Porto-Foresti F, Hashimoto DT, Alves AL, Almeida RBC, Senhorini JA, Bortolozzi J, Foresti F. 2008. Cytogenetic markers as diagnoses in the identification of the hybrid between piauçu (*Leporinus macrocephalus*) and piapara (*Leporinus elongatus*). *Genetics and Molecular Biology*: 31, 1, 195-202.
- Rabova M, Monteiro R, Collares-Pereira MJ, Ráb P. Rapid Fibroblast Culture for Teleost Fish Karyotyping. In: Ozouf-Costaz C, Pisano E, Foresti F, Toledo L FA, editors. *Fish Cytogenetic Techniques: Ray-Fin Fishes and Chondrichthyans*. CRC press: 2015, p. 66-73.
- Ramirez JL, Birindelli JLO, Galetti, PM. 2017. A new genus of Anostomidae (Ostariophysi: Characiformes): diversity, phylogeny and biogeography based on cytogenetic, molecular and morphological data. *Mol. Phylogenet. Evol.* 107, 308–323. DOI: 10.1016/j.ympev.2016.11.012.
- Ranera B, Ordovás L, Lyahyai J, Bernal ML, Fernandes F, Remacha AR, Romero A, Vázquez FJ, Osta R, Cons C, Varona L, Zaragoza P, Martín-Burriel I, Rodellar C. 2012. Comparative study of equine bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells. *Equine Vet J*;44:33–42.
- Reddy R, Busch H. 1988. Small Nuclear RNAs: RNA Sequences, Structure, and Modifications. In: Max L. Birnstiel (Ed.) *Structure and Function of Major and Minor Small Nuclear Ribonucleoprotein Particles*. DOI: 10.1007/978-3-642-73020-7, p. 1-37.
- Reis RE, Albert JS, Dario FD, Mincarone MM, Petry P, Rocha LA. 2016. Fish biodiversity and conservation in South America. *Journal of Fish Biology*. DOI:10.1111/jfb.13016.
- Ribeiro LB, Neto AM, Artoni RF, Matoso DA, Feldberg E. 2017. Chromosomal mapping of repetitive sequences (Rex3, Rex6, and rDNA Genes) in hybrids between *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) and *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). *ZEBRAFISH*: 00, 00, 1-6.
- Ribeiro LB, Matoso DA, Feldberg E. 2014. Chromosome mapping of repetitive sequences in four Serrasalminidae species (Characiformes). *Genetics and Molecular Biology*, 37, 1, 46-53.
- Romanenko SA, Biltueva LS, Serdyukova NA, Kulemzina AI et al. 2015. Segmental paleotetraploidy revealed in starlet (*Acipenser ruthenus*) genome by chromosome painting. *Molecular Cytogenetics*, 8, 90. DOI 10.1186/s13039-015-0194-8.

- Scacchetti PC, Utsunomia R, Pansonato- Alves JC, da Costa Silva GJ, Vicari MR, Artoni RF. 2015. Repetitive DNA sequences and evolution of ZZ/ZW sex chromosomes in *Characidium* (Teleostei: Characiformes). PLoS ONE, 10, 9, e0137231. DOI:10.1371/journal.pone.0137231.
- Sene VF, Pansonato-Alves JC, Utsunomia R, Oliveira C, Foresti F. 2014. Karyotype diversity and patterns of chromosomal evolution in *Eigenmannia* (Teleostei, Gymnotiformes, Sternopygidae). Comparative Cytogenetics, 8, 4, 301–311. DOI: 10.3897/CompCytogen.v8i4.8396.
- Serrano EA, Utsunomia R, Scudeller PS, Oliveira C, Foresti F. 2017. Origin of B chromosomes in *Characidium alipioi* (Characiformes, Crenuchidae) and its relationship with supernumerary chromosomes in other *Characidium* species. Comparative Cytogenetics, 11, 1, 81–95. DOI: <https://doi.org/10.3897/CompCytogen.v11i1.10886>.
- Silva DMZ, Daniel SN, Camacho JPM et al. 2016. Origin of B chromosomes in the genus *Astyanax* (Characiformes, Characidae) and the limits of chromosome painting. Mol Genet Genomics, 291, 1407. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00438-016-1195-y>.
- Silva DMZ, Utsunomia R, Pansonato-Alves JC, Oliveira C, Foresti F. 2015. Chromosomal Mapping of repetitive DNA sequences in five species of *Astyanax* (Characiformes, Characidae) reveals independent location of U1 and U2 snRNA sites and association of U1 snRNA and 5S rDNA. Cytogenet Genome Res. DOI: 10.1159/000438813.
- Silva DMZ, Pansonato-Alves JC, Utsunomia R, Araya-Jaime C, Ruiz-Ruano FJ, et al. 2014. Delimiting the origin of a B chromosome by FISH mapping, chromosome painting and DNA sequence analysis in *Astyanax paranae* (Teleostei, Characiformes). PLoS ONE, 9, 4, e94896. DOI:10.1371/journal.pone.0094896.
- Silva DS, Peixoto LAW, Pieczarka JC, Wosiacki WB, Ready JS, Nagamachi CY. 2015. Karyotypic and morphological divergence between two cryptic species of *Eigenmannia* in the Amazon basin with a new occurrence of XX/XY sex chromosomes (Gymnotiformes: Sternopygidae). Neotropical Ichthyology, 13, 2, 297-308. DOI: 10.1590/1982-0224-20140160.
- Sobhana KS, George KC, Venkat Ravi G, Ittoop G, Paulraj R. 2009. Development of a cell culture system from gill explants of the grouper , *Epinephelus malabaricus* (Bloch and Shneider). Asian Fisheries Science, 22, 1–6.

- Swaminathan TR, Basheer VS, Gopalakrishnan A, Sood N, Pradhan PK. 2016. A new epithelial cell line, HBF from caudal fin of endangered yellow catfish, *Horabagrus brachysoma* (Gunther, 1864). *Cytotechnology*, 68, 515–523. DOI 10.1007/s10616-014-9804-2.
- Taju G, Majeed A, Nambi KSN, Hameed S. 2013. Development and characterization of cell line from the gill tissue of *Catla catla* (Hamilton, 1822) for toxicological studies. *Chemosphere*, 90, 2172–2180.
- Tenório RCCO, Vitorino CA, Souza IL, Oliveira C, Venere PC. 2013. Comparative cytogenetics in *Astyanax* (Characiformes: Characidae) with focus on the cytotaxonomy of the group. *Neotropical Ichthyology*, 11, 3, 553-564.
- Utsunomia R, Silva DMZ, Ruiz-Ruano FJ, Araya-Jaime C, Pansonato-Alves JC, Scacchetti PC, et al. 2016. Uncovering the ancestry of B Chromosomes in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Teleostei, Characidae). *PLoS ONE*, 11, 3, e0150573. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150573>.
- Utsunomia R, Scacchetti PC, Pansonato-Alves JC, Oliveira C, Foresti F. 2014. Comparative chromosome mapping of U2 snRNA and 5S rRNA genes in *Gymnotus* species (Gymnotiformes, Gymnotidae): Evolutionary dynamics and sex chromosome linkage in *G. pantanal*. *Cytogenet Genome Res*, 142, 286–292.
- Vicari MR, Nogaroto V, Noleto RB, Cestari MM, Cioffi MB, Almeida MC, Moreira-Filho O, Bertollo LAC, Artoni RF. 2010. Satellite DNA and chromosomes in Neotropical fishes: methods, applications and perspectives. *Journal of Fish Biology*, 76, 1094–1116. DOI: 10.1111/j.1095-8649.2010.02564.x.
- Voltolin TA, Laudicina A, Senhorini JA, Bortolozzi J, Oliveira C, Foresti F, Porto-Foresti F. 2010. Origin and molecular organization of supernumerary chromosomes of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae) obtained by DNA probes. *Genetica* 138:1133-1139.
- Wang X, Yang J, Chen X, Pan X. 2012. Establishment and characterization of a fibroblast-like cell line from *Anabarilius grahmi* (Cypriniformes: Cyprinidae). *Zoological Research*, 33, (E5-6), E89–97.
- Wei YB, Fan TJ, Jiang GJ, Xu XH, Sun A. 2010. A novel heart-cell line from brown-marbled grouper *Epinephelus fuscoguttatus* and its susceptibility to iridovirus. *Journal of Fish Biology*, 76, 1149 –1158. doi:10.1111/j.1095-8649.2010.02562.x.

- Wei J, Qi WC, Zhou Y et al. 2014. Establishment and characterization of an ovarian cell line from Southern catfish (*Silurus meridionalis*). *Fish Physiol Biochem*, 40, 1383–1391. DOI 10.1007/s10695-014-99329.
- Wolf K, Quimby C, 1976. Primary Monolayer Culture of Fish Cells Initiated from Trypsinized Tissues. *TCA Manual*, 2, 453–456.
- Yano CF, Bertollo LAC, Liehr T, Troy WP, Coiffi MB. 2016. W chromosome dynamics in *Triportheus* species (Characiformes, Triporthidae) - an ongoing process narrated by repetitive sequences. *Journal of Heredity*, 107, 342-348.
- Yano CF, Poltronieri J, Bertollo LAC, Artoni RF, Liehr T, Cioffi MB. 2014. Chromosomal mapping of repetitive DNAs in *Triportheus trifurcatus* (Characidae, Characiformes): insights into the differentiation of the Z and W chromosomes. *Plos One*, 9, 3, e90946.
- Yano CF, Moreira Filho O, Margarido VP. 2014. Interpopulational comparative cytogenetics analysis among three *Astyanax* (Characiformes: *Incertae Sedis*) species of two streams of upper Paraná River basin, Brazil. *Biologia*, 69, 6, 790—798. DOI: 10.2478/s11756-014-0366-8.
- Yadav K, Lakra WS, Sharma J, Goswami M, Singh A. 2012. Development and characterization of a cell line TTCF from endangered mahseer *Tor tor* (Ham.). *Fish physiol. Biochem.*, 38, 1035 – 1045.
- Yu YT, Shu MD, Narayanan A, Terns RM, Terns MP, Steitz JA. 2001. Internal modification of U2 small nuclear (sn)RNA occurs in nucleoli of *Xenopus* oocytes. *J Cell Biol* 152(6):1279–1288.
- Zhang Q, Cooper RK, Wolters WR, Tiersch TR. 1998. Isolation, culture and characterization of a primary fibroblast cell line from channel catfish. *Cytotechnology*, 26(2): 83–90.