

Priscilla Cardim Scacchetti

**Mapeamento físico dos genes ribossomais 18S e 5S nos
cromossomos de espécies simpátricas do gênero *Gymnotus*
(Teleostei, Gymnotiformes, Gymnotidae)**

Mestrado

Botucatu

2011

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

**Mapeamento físico dos genes ribossomais 18S e 5S nos cromossomos
de espécies simpátricas do gênero *Gymnotus* (Teleostei,
Gymnotiformes, Gymnotidae)**

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

Priscilla Cardim Scacchetti

Orientador: Prof. Dr. Fausto Foresti

Co-orientador: Dr. José Carlos Pansonato Alves

Botucatu

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Scacchetti, Priscilla Cardim.

Mapeamento físico dos genes ribossomais 18S e 5S nos cromossomos de espécies simpátricas do gênero *Gymnotus* (Teleostei, Gymnotiformes, Gymnotidae) / Priscilla Cardim Scacchetti. - Botucatu, 2011

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2011

Orientador: Fausto Foresti

Co-orientador: José Carlos Pansonato Alves

Capes: 20204000

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

Palavras-chave: DNA ribossômico; *Gymnotus*; Heterocromatina; Marcadores moleculares; Rearranjos cromossômicos.

Quando penso em você, fecho os olhos de saudade...

Cecília Meireles

Dedico a você mãe, que não está mais entre nós, mas tenho certeza que está muito orgulhosa de mais uma etapa cumprida e que daí de cima acompanha e ilumina seus filhos que ficaram, dando força e coragem todos os dias!

Te amo...

“A ciência humana de maneira nenhuma nega a existência de Deus. Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável”.

(Galileu Galilei)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pela minha vida, minha família e meus amigos.

Agradeço a minha querida irmã Daniela, que está cuidando do meu sobrinho recém nascido, pela confiança e apoio incondicional em etapas importantíssimas da minha vida e pelo “eterno financiamento”, principalmente dos meus estudos. Muito obrigada! Amo você.

A toda minha família, em especial meu pai Sérgio Scacchetti e meu irmão Sérgio Scacchetti Filho pelo apoio, compreensão, amizade e confiança, sempre.

Ao meu orientador Prof. Dr. Fausto Foresti pela oportunidade, orientação, exemplo como pesquisador, apoio e incentivo para a realização deste trabalho. “Expresso os meus maiores agradecimentos e o meu profundo respeito, que sempre será pouco diante do muito que foi oferecido”.

Ao meu co-orientador Dr. José Carlos Pansonato Alves pela amizade, paciência, companheirismo e disponibilidade para todo o necessário para a realização deste trabalho. “Vocês que plantaram um dia a semente do conhecimento em nós, verão brotar e gerar, no futuro, cada vez mais plantios e proveitosas colheitas com frutos de reconhecimento e valorização pelos atos de amor e dedicação na arte de ensinar.”

Aos amigos Ricardo Paiva, Vanessa Paes, Jefferson, Kelly, Felipe Claro Lourenço e Patrícia Elda pela disponibilidade, paciência, discussões, conversas e orientações sempre que foi preciso e claro, pela amizade. “Agradecer é admitir que houve um minuto em que se precisou de alguém e vocês sempre estiveram presentes”. Obrigada!

As professoras Dr. Cleusa Nagamachi e a Dr. Susana Suely Rodrigues Milhomem Paixão da Universidade Federal do Pará pela disponibilidade e pelas hibridações realizadas.

Ao técnico Renato Devidé, pelo seu bom humor e por sempre estar disposto a ajudar.

Aos professores Cláudio de Oliveira e Edmir Carvalho pelo exemplo como pesquisadores e dedicação aos alunos.

A professora Lurdes Foresti de Almeida Toledo da Universidade de São Paulo pelo incentivo, colaboração e a disponibilização do laboratório para a realização de parte deste trabalho.

Aos companheiros e amigos do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes que estão sempre dispostos a ajudar e se tornaram especiais: Guilherme, Bruno Ferrete, Bruno Melo, Fábio Roxo, Luís Henrique, Maria Lígia, Millke, Amanda, Viviani, Érica, Duílio, Aline, Luciana, Bruno de Franco, Luz, Ricardo Britzki, Raquel, Mahmoud, Victor, Fernando Yuldi, Fernando Mendonça, Marlon, Gleisy, Tatiane e todos os demais alunos do laboratório.

A Universidade Estadual Paulista, ao Instituto de Biociências de Botucatu e ao Departamento de Morfologia e a seção de Pós-Graduação que junto aos seus funcionários proporcionaram todas as condições para a realização deste trabalho.

A CAPES pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste projeto.

As minhas amigas queridas: Anelise Azevedo Sciarini Barreto, Lisiane Azevedo Sciarini, Liliane Miranda e Andressa Ribeiro Miguel. Apesar da distância e das visitas menos frequentes, nossa amizade continua intacta e será pelo resto de nossas vidas, pois ao longo desses anos construímos uma linda amizade verdadeira.

Ao meu namorado Ricardo Utsunomia, pela paciência, aprendizado, dedicação e amor incondicional! “Mesmo que a palavra “obrigada” signifique tanto, não expressará por inteiro o quanto seu gesto atencioso e delicado foi importante para mim”. Te Amo.

Resumo

Foram analisadas citogeneticamente quatro espécies de peixes do gênero *Gymnotus*, *G. sylvius*, *G. pantherinus*, *G. inaequilabiatus* e *G. cf. carapo* de componentes de diferentes bacias hidrográficas brasileiras, com o uso de técnicas citogenéticas básicas (coloração com Giemsa, localização das RONS pela marcação com nitrato de Prata e bandamento C) e citomoleculares (coloração com os fluorocromos base-específicos CMA₃ e DAPI, hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com sondas de DNAr 18S e 5S, sonda teloméricas (TTAGGG)_n e sonda obtida do cromossomo portador das RONS de *G. carapo* da bacia Amazônica por *Fluorescence Activated Cell Sorting* (FACS) e caracterização e organização genômica do DNAr 5S). *G. sylvius* apresentou número diplóide de 40 cromossomos (22m+12sm+6st); *G. pantherinus* apresentou número diplóide de 52 cromossomos (32m+18sm+2st) e *G. inaequilabiatus* (42m+10sm+2a) e *G. cf. carapo* (38m+12sm+4st) apresentaram 54 cromossomos. O bandamento C evidenciou a marcação de pequenos blocos centroméricos em todos os cromossomos de todas as espécies, sendo, porém, detectadas algumas marcações intersticiais em *G. sylvius* e grandes blocos intersticiais nos cromossomos de *G. inaequilabiatus*, *G. cf. carapo* e *G. pantherinus*. As RONS foram identificadas em apenas um par cromossômico nas quatro espécies e foram coincidentes com a hibridação fluorescente *in situ* realizada com a sonda para DNAr 18S e a coloração com o fluorocromo CMA₃. A hibridação com a sonda para DNAr 5S revelou marcações em até dezessete pares de cromossomos em *G. inaequilabiatus* e em até quinze pares em *G. cf. carapo*; dois pares cromossômicos em *G. pantherinus* e um par em *G. sylvius*. A hibridação com a sonda para a sequência telomérica (TTAGGG)_n revelou marcações nos telômeros de todos os cromossomos dos representantes destas quatro espécies, além de blocos intersticiais no primeiro par metacêntrico de *G. sylvius* e junto às RONS de *G. inaequilabiatus* e *G. cf. carapo*. Foi realizada também a amplificação, clonagem, sequenciamento e hibridação *in situ* do DNAr 5S em espécies simpátricas de *G. sylvius* e *G. inaequilabiatus*, sendo detectada a existência de duas classes distintas dessa família gênica (classe I com cerca de 450pb e classe II com cerca de 650pb). A hibridação *in situ* usando como sonda cada classe deste sítio mostrou que em *G. sylvius* as duas classes apresentam-se co-localizadas no mesmo par cromossômico, enquanto em *G. inaequilabiatus* a classe II apareceu mais dispersa em relação à classe I. A pintura cromossômica total utilizando a sonda obtida do cromossomo total portador das RONS hibridou em apenas um par cromossômico em *G. sylvius*, *G. inaequilabiatus* e em *G. cf. carapo*. Os dados apresentados revelaram-se como significativos

marcadores citotaxonômicos para este grupo de peixes e contribuíram com informações de interesse para o conhecimento do processo de diferenciação entre as espécies de *Gymnotus*.

Abstract

Four fish species of the genus *Gymnotus* comprised by *G. sylvius*, *G. pantherinus*, *G. inaequilabiatus* and *G. cf. carapo* from different Brazilian hydrographic basins were analyzed using classic cytogenetic (coloration with Giemsa, localization of NORs for silver nitrate marking and C-banding) and molecular cytogenetic techniques with base-specific fluorochrome DAPI and CMA₃, fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with probes consisting of 18S and 5S rDNA, telomeric sequences (TTAGGG)_n and whole chromosome prepared by Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) of the NOR chromosome, obtained of *G. carapo* from Amazon basin, as well as a characterization and genomic organization of 5S rDNA. *G. sylvius* presented a diploid number of 40 chromosomes (22m+12sm+6st); *G. pantherinus* presented a karyotype with 52 chromosomes (32m+18sm+2st) and *G. inaequilabiatus* (42m+10sm+2a) and *G. cf. carapo* (38m+12sm+4st) presented 54 chromosomes. All the species presented the constitutive heterochromatin located in the centromeric region of all chromosomes. Besides that, some interstitial marks were detected in *G. sylvius* and large interstitial blocks were identified at the chromosomes of *G. inaequilabiatus*, *G. cf. carapo* and *G. pantherinus*. NORs were identified in only one chromosome pair in all species and were coincident with the *in situ* hybridization using probes of 18S rDNA and the fluorochrome CMA₃. FISH using the probes of 5S rDNA revealed marks up to seventeen chromosome pairs in *G. inaequilabiatus* and up to fifteen pairs in *G. cf. carapo*, two chromosome pairs in *G. pantherinus* and one pair in *G. sylvius*. The telomeric probes were localized at the telomeres of all chromosomes in the four species, as well as interstitial telomeric sequence in the first metacentric pair in *G. sylvius* and along the NORs in *G. inaequilabiatus* and *G. cf. carapo*. The amplification, cloning, sequencing and *in situ* hybridization of 5S rDNA in sympatric species of *G. sylvius* and *G. inaequilabiatus* revealed two distinct classes of this gene (Class I, with about 450 bp and Class II with about 650bp). *In situ* hybridization using both classes as probes showed that in *G. sylvius* the two classes are co-located on the same chromosome pair, while in *G. inaequilabiatus* the class II appeared more dispersed in relation to Class I. The whole chromosome painting using the NORs chromosome as probe in *G. sylvius*, *G. inaequilabiatus* and *G. cf. carapo* bears only one chromosome pair. The present data have proved to be significant cytotaxonomic markers for this group of fish and contributed with important information to understanding the process of differentiation between the species of *Gymnotus*.

Sumário

1 Introdução	1
1.1 Considerações sobre a citogenética de peixes	1
1.2 Considerações sobre os Gymnotiformes, sobre a família Gymnotidae e sobre o gênero <i>Gymnotus</i>	3
2 Objetivos	7
3 Materiais e métodos	8
3.1 Materiais	8
3.1.1 Espécies estudadas e locais de coleta.....	8
3.2 Métodos	10
3.2.1 Estimulação de Mitoses	10
3.2.2 Obtenção de Cromossomos Metafásicos.....	10
3.2.3 Detecção das Regiões Organizadoras de Nucléolos (RONs) através da Impregnação com Nitrato de Prata (AgNO ₃)	11
3.2.4 Identificação da Heterocromatina Constitutiva	12
3.2.5 Identificação de Regiões Cromossômicas ricas em GC, pelo fluorocromo Cromomicina A ₃	12
3.2.6 Identificação de Regiões Cromossômicas ricas em AT, pelo fluorocromo DAPI.....	13
3.2.7 Extração de DNA genômico.....	13
3.2.8 Preparação das sondas de DNA para hibridação fluorescente <i>in situ</i> (FISH)	14
3.2.8.1 Preparação das sondas de DNAr 18S e 5S	14
3.2.8.2 Preparação da sonda telomérica	15
3.2.9 Hibridação Fluorescente <i>in situ</i>	16
3.2.10 Preparação para sondas de cromossomos inteiros e hibridação fluorescente <i>in situ</i>	17
3.2.11 Caracterização do DNAr 5S	18
3.2.12 Isolamento do DNAr 5S por PCR	19
3.2.13 Eluição das bandas obtidas pela amplificação por PCR do DNAr 5S.....	19
3.2.14 PCR (pfx) para preparar o fragmento a ser clonado	20
3.2.15 Clonagem das bandas eluídas do DNAr 5S.....	20

3.2.16	Crescimento e estocagem dos clones recombinantes	21
3.2.17	PCR para confirmação da presença de insertos.....	21
3.2.18	Reação de sequenciamento para amostras clonadas do DNAr 5S.....	22
3.2.19	Limpeza da reação de sequenciamento	22
3.2.20	Sequenciamento.....	23
3.2.21	Preparação da sonda dos clones do DNAr 5S	23
3.2.3	Estudos Cariotípicos	25
4	Resultados e Discussão	26
4.1	Capítulo 1- Diversidade cariotípica em populações e espécies de <i>Gymnotus</i> (Teleostei, Gymnotiformes, Gymnotidae): mapeamento físico dos genes ribossomais e sequências teloméricas.....	27
4.2	Capítulo 2- Caracterização molecular e mapeamento físico de duas classes de DNAr 5S em <i>Gymnotus sylvius</i> e <i>Gymnotus inaequilabiatus</i> (Teleostei, Gymnotiformes, Gymnotidae)	43
4.3	Capítulo 3- Marcação cromossômica das regiões nucleolares por pintura cromossômica e por sonda de DNAr 18S em espécies de <i>Gymnotus</i>	58
5	Considerações finais	68
6	Referências Bibliográficas	71

1 Introdução

1.1 Considerações sobre a citogenética de peixes

Os estudos citogenéticos tiveram um grande desenvolvimento nos últimos anos, devido basicamente à utilização de novas técnicas de análise cromossômica, o que possibilitou à citogenética contribuir mais efetivamente não só para a resolução de problemas taxonômicos e filogenéticos, como também para uma maior compreensão da estrutura cromossômica nos vertebrados. Estes avanços técnicos refletiram, de modo acentuado, nos estudos citogenéticos em peixes, resultando numa expansão considerável do número de espécies estudadas nos últimos anos. Na região Neotropical já foram analisadas cerca de 1040 espécies de peixes de água doce, sendo 475 espécies da ordem Characiformes, 318 espécies de Siluriformes, 48 espécies de Gymnotiformes e 199 espécies que não pertencem a superordem Ostariophysi (revisão em Oliveira *et al.*, 2007). Este levantamento realça também outras características do genoma dos peixes, como a presença de cromossomos supranumerários, que foram descritos ocorrer em 38 espécies e de heteromorfismos cromossômicos ligados ao sexo, que resultaram na identificação de cromossomos sexuais em 62 espécies, entre as quais 40 com heterogametia feminina e 22 com heterogametia masculina. Estes resultados demonstram um aumento substancial das informações sobre o cariótipo das espécies deste grupo de organismos, se comparados ao levantamento realizado anteriormente por Oliveira *et al.* (1988a). No entanto, esses dados são ainda incipientes, se for considerado que podem existir cerca de 6.000 espécies de peixes distribuídas nesta região biogeográfica (Reis *et al.*, 2003).

Em peixes, a crescente aplicação de técnicas de bandamento cromossômico, notadamente as de bandas C e bandas de endonucleases de restrição e o emprego de fluorocromos base específicos, como a Cromomicina A₃ e o DAPI, para identificar segmentos específicos dos cromossomos, permitiram não só uma melhor caracterização da diversidade cariotípica, como também o entendimento das relações evolutivas existentes entre diferentes táxons (revisão em Almeida-Toledo *et al.*, 2000a). O desenvolvimento recente de diferentes metodologias, possibilitando a aplicação de sondas específicas como aquelas de genes ribossômicos e de histonas, constituídas por DNA de moderada repetitividade, ou as de DNA altamente repetitivo (DNA satélite) (Singer, 1982; Oliveira e Wright, 1998) e o advento da técnica de microdissecção cromossômica (Kao, 1990; Meltzer *et al.*, 1992), que possibilita o

isolamento direto de DNA de qualquer região citogeneticamente reconhecida, têm possibilitado a associação destes marcadores com as regiões correspondentes nos cromossomos metafásicos, através da técnica de hibridação fluorescente *in situ*, denominada FISH. Esse tipo de abordagem citogenética em nível molecular permite o acesso a informações mais precisas acerca da presença de seqüências específicas de DNA, a detecção de rearranjos cromossômicos, a proposição de hipóteses sobre os mecanismos envolvidos na diversificação cariotípica, a construção de mapas gênicos e até mesmo o estabelecimento de relações filogenéticas entre os componentes dos grupos biológicos (revisão em Phillips e Reed, 1996; Oliveira e Wright, 1998; Henning *et al.*, 2008).

O estudo citogenético contínuo e sistemático de determinados grupos de peixes tem levado ao esclarecimento de questões taxonômicas, à identificação de espécies crípticas, assim como a um melhor entendimento tanto da estrutura e variabilidade cromossômica quanto dos processos evolutivos que envolvem o cariótipo dos peixes Neotropicais (Oliveira *et al.*, 2007). Esse tipo de abordagem tem sido aplicado, por exemplo, em peixes da Ordem Gymnotiformes, notadamente em espécies do gênero *Eigenmannia*. Análises citogenéticas realizadas nesse grupo, a partir do final da década de setenta revelaram que, a despeito da ocorrência de uma única espécie denominada *E. virescens* para os rios de várias bacias brasileiras, na realidade trata-se de um complexo de espécies, com a ocorrência de cinco citótipos na bacia superior do rio Paraná, dois citótipos no rio São Francisco, três na região Amazônica, além de um extenso polimorfismo cromossômico na ilha de Marajó. Os estudos citogenéticos neste grupo evidenciaram, além de esclarecimentos citotaxonômicos, também a ocorrência de distintos sistemas de cromossomos sexuais morfologicamente diferenciados na maioria dos citótipos (revisão em Almeida-Toledo e Foresti, 2001). A aplicação de técnicas moleculares em alguns desses citótipos, como a marcação pelos fluorocromos Cromomicina A₃ e Mitramicina, permitiram caracterizar as regiões heterocromáticas ligadas aos cromossomos sexuais em duas das espécies desse complexo, como sendo regiões ricas em pares de bases GC. Do mesmo modo, a aplicação de técnicas utilizando fluorocromos e endonucleases de restrição, em associação com as técnicas de coloração convencional, trouxe esclarecimentos acerca dos mecanismos envolvidos na formação do cromossomo Y em *Eigenmannia* sp2, corroborando com uma hipótese de que nesta espécie a diferenciação sexual estaria realmente relacionada a presença de regiões cromossômicas GC positivas (Almeida-Toledo *et al.*, 2000b).

O estudo sistematizado de outros grupos de peixes como em *Hoplias* (síntese em Bertollo *et al.*, 2000; Born e Bertollo, 2002), *Astyanax* (síntese em Kavalco, 2008), *Corydoras*

(Oliveira *et al.*, 1988b; 1992), *Triportheus* (Artoni *et al.*, 2001; Artoni e Bertollo, 2002; Diniz *et al.*, 2008), *Characidium* (Pansonato-Alves *et al.*, 2010), dentre outros, também tem trazido importantes informações cariotípicas muitas vezes esclarecedoras de questões genético-evolutivas relacionadas aos peixes Neotropicais.

1.2 Considerações sobre os Gymnotiformes, sobre a família Gymnotidae e sobre o gênero *Gymnotus*.

Os peixes pertencentes à ordem dos Gymnotiformes, popularmente conhecidos como “tuviras”, “peixes elétricos” ou “peixes espada”, constituem um grupo endêmico das águas doces da região Neotropical (Albert e Crampton, 2003). Essa ordem possui mais de 100 espécies e 27 gêneros que estão agrupados em cinco famílias, Gymnotidae, Rhamphichthyidae, Hypopomidae, Sternopygidae e Aptenrotidae (Mago-Leccia, 1994). Nos Gymnotiformes, a diversidade cariotípica é mais bem conhecida nos gêneros *Gymnotus* e *Eigenmannia*, ricos em espécies.

A família Gymnotidae atualmente é constituída por dois gêneros, sendo que *Gymnotus* se apresenta com 33 espécies válidas e *Electrophorus* com apenas uma espécie válida (Crampton e Hopkins, 2005). Sabe-se que o gênero *Gymnotus* é o que apresenta a mais ampla distribuição geográfica, com espécies ocorrendo nas águas continentais das Américas do Sul e Central, sendo encontradas desde o Rio Salgado, nos pampas argentinos (36° S), até o Rio San Nicolás, México (18° N), com exceção do Chile e Belize (Albert *et al.*, 2005). Este gênero se apresenta muito diverso também na Bacia Amazônica, onde 19 espécies são conhecidas, incluindo formas ainda não descritas formalmente (Crampton *et al.*, 2005; Milhomem, 2010).

Os peixes do gênero *Gymnotus* são facilmente distinguidos de outros Gymnotiformes por possuírem a boca voltada para cima, os olhos dispostos na posição lateral da cabeça e uma cavidade do corpo longa, com um valor modal de 31-51 vértebras pré-caudais (Albert *et al.*, 2005). Uma característica marcante dos representantes deste gênero é a presença de faixas de pigmentos claros e escuros obliquamente orientadas ao longo de todo o comprimento do corpo, do qual se derivou o nome comum em inglês “banded knife-fish” (Albert *et al.*, 2005).

Existem dados citogenéticos disponíveis para espécies de *Gymnotus* encontradas em diversas localidades brasileiras que evidenciam a ocorrência de uma alta diversidade cariotípica. Essa ampla variabilidade cromossômica é caracterizada pelos diferentes números diplóides observados em algumas espécies, como em *G. carapo* e *G. inaequilabiatus* com 54

cromossomos, *G. sylvius* que apresenta 40 cromossomos, *G. pantherinus* com 52 cromossomos e *G. pantanal* com 40 cromossomos para fêmeas e 39 para machos, caracterizando um sistema múltiplo de cromossomos sexuais (revisão em Margarido *et al.*, 2007; Milhomem, 2010).

No gênero *Gymnotus*, *G. carapo* caracteriza-se como uma das espécies mais interessantes e diversificadas citogeneticamente. Estudos cariotípicos realizados em diferentes populações desta espécie, com ocorrência na bacia Amazônica, bacia do Paraná e bacias Costeiras, têm revelado uma expressiva variação nos valores de seu número diplóide, com populações apresentando 52, 48, 46, 42 e até 40 cromossomos em seu cariótipo (Foresti *et al.*, 1984; Nagamachi *et al.*, 2010). No entanto, uma revisão deste grupo de peixes realizada por Albert e Crampton (2003) indicou que, na verdade, diversas populações de *G. carapo* tratavam de novas espécies. De qualquer forma, espécies comprovadamente identificadas como *G. carapo* têm apresentado uma instigante diversidade cariotípica, com variações na morfologia dos cromossomos e na presença de diferentes cromossomos portadores de sítios ribossomais (Fernandes-Matioli *et al.*, 1997) e até casos de poliploidia (Fernandes-Matioli *et al.*, 1998a).

Em análises citogenéticas realizadas por Margarido *et al.*, (2007) em três espécies simpátricas de *Gymnotus* da bacia do Alto Rio Paraná, foi identificada a ocorrência de números diplóides de 54 cromossomos em *G. paraguensis*, de 40 cromossomos em *G. sylvius*, já caracterizadas citogeneticamente antes do alagamento da cachoeira Sete Quedas e de 40 cromossomos em fêmeas e 39 em machos de *G. pantanal*, caracterizando um sistema múltiplo sexual do tipo $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$, encontrado anteriormente apenas nos componentes hidrográficos do baixo rio Paraná e relatado pela primeira vez no Alto Rio Paraná em simpatria com *G. paraguensis* e *G. sylvius*. As análises citogenéticas realizadas nestas três espécies demonstraram diversidade interespecífica na macroestrutura cariotípica, indicando que as características citogenéticas podem ser utilizadas para diagnósticos taxonômicos nesse grupo de peixes. No entanto, o posicionamento das RONS mostrou-se conservado, sendo identificadas marcações em apenas um par cromossômico para as três espécies, indicando uma manutenção destes sítios ribossomais na evolução destas espécies. Já a ausência de híbridos interespecíficos poderia ser explicada possivelmente também pela diferença encontrada nos números cromossômicos destas espécies.

A partir de análises filogenéticas realizadas com base em dados moleculares, Fernandes-Matioli e Almeida-Toledo (2001) propuseram um caminho evolutivo para a diferenciação cromossômica em algumas espécies de *Gymnotus*. Neste estudo, realizado com

dados obtidos a partir de amostras provenientes da bacia do alto rio Paraná, foi proposto que o número diplóide de 52 cromossomos poderia ser considerado como uma característica basal para o grupo, sem ser necessariamente uma condição plesiomórfica. A variação na quantidade de heterocromatina constitutiva poderia ser uma característica sinapomórfica, evidenciando uma relação filogenética entre *G. carapo* e *G. inaequilabiatus*. Finalmente, o número diplóide de 54 cromossomos caracterizar-se-ia como um “último” evento, no qual uma fissão cromossômica poderia ser apresentada como uma condição autapomórfica para *G. carapo*. A ocorrência do número diplóide de 40 cromossomos provavelmente seria decorrente de eventos de fusão cêntrica associados a uma gradual perda de blocos heterocromáticos, características estas que poderiam ser consideradas autapomórficas para *G. sylvius*.

Na análise citogenética realizada em *G. sylvius* com $2n=40$ cromossomos e em *G. carapo* com $2n=54$ cromossomos, utilizando resultados obtidos pelo bandamento R, Claro e Almeida-Toledo (2010) mostraram evidências de ancestralidade comum entre estas duas espécies, devido à similaridade em três pares cromossômicos conservados em ambas. Aliando esses resultados à utilização de sondas teloméricas, foi identificado que rearranjos cromossômicos do tipo fusão cêntrica poderiam ter ocorrido, determinando modificações no cariótipo de *G. sylvius*.

A aplicação da técnica de hibridação fluorescente *in situ*, em associação com o uso de sondas teloméricas em preparações cromossômicas de exemplares de duas populações de *G. carapo* da bacia Amazônica, revelou a existência de diferentes números diplóides, de 40 e 42 cromossomos (Milhomem *et al.*, 2008). Evidenciou ainda a existência de sítios teloméricos intersticiais (ITS) no braço curto de um par metacêntrico no cariótipo dos representantes da população com 40 cromossomos, sugerindo que a diferença encontrada no número diplóide entre as populações seria resultado da ocorrência de uma fusão cromossômica. E devido à falta de diferenças morfológicas, os autores sugeriram que ambas as populações analisadas seriam componentes de um complexo de espécies com isolamento pós-zigótico, cujas alterações cromossômicas teriam ocorrido recentemente (Milhomem *et al.*, 2008).

Em outro estudo, Nagamachi *et al.* (2010) analisaram duas populações de *G. carapo*, uma com 40 e outra com 42 cromossomos. Neste trabalho foram realizadas hibridações *in situ* com a utilização de sondas produzidas a partir de cromossomos inteiros, isolados por citometria de fluxo de preparações cromossômicas do citótipo com 42 cromossomos. As sondas produzidas foram hibridadas sobre preparações metafásicas dos representantes do citótipo com 40 cromossomos e os resultados demonstraram que diferentes rearranjos cromossômicos ocorreram nestes dois citótipos, com uma frequência bem maior do que

geralmente descrita em trabalhos envolvendo apenas técnicas citogenéticas clássicas. Segundo os autores, os resultados parecem sugerir ainda que os dois citótipos estariam revelando a existência de duas espécies distintas (Nagamachi *et al.*, 2010).

Os dados citogenéticos disponíveis para o gênero *Gymnotus* reforçam a existência de ampla e interessante variação cariotípica neste grupo. Assim, o estudo citogenético sistemático destes peixes, com a utilização de abordagens variadas e por meio de técnicas citogenéticas básicas e moleculares, tem permitido a obtenção de informações de interesse para a melhor compreensão da estrutura cariotípica e esclarecimentos acerca de problemas genético-evolutivos envolvendo esse grupo de vertebrados.

Nesse sentido, o presente trabalho foi desenvolvido com objetivo de realizar estudos cito-moleculares em diferentes espécies e populações de peixes do gênero *Gymnotus* de diferentes bacias hidrográficas, buscando-se determinar a extensão da ocorrência das variações cromossômicas, observadas em alguns representantes deste grupo de peixes, bem como compreender os mecanismos envolvidos no seu processo de diversificação.

2 Objetivos

Os objetivos do presente trabalho consistiram em desenvolver a análise do cariótipo de espécies de peixes do gênero *Gymnotus*, enfocando aspectos citogenéticos e moleculares, com a finalidade de:

1 ampliar o conhecimento sobre este grupo de peixes, estabelecendo e comparando a constituição cariotípica destas espécies;

2 aplicar técnicas de bandamento para identificação estrutural dos cromossomos (bandas C, identificação das RONS, tratamentos com fluorocromos - CMA₃ e DAPI);

3 mapear a localização dos genes de DNA repetitivo (DNA ribossômico 5S e 18S) identificando sua posição cromossômica e relações entre as duas espécies, com a utilização da técnica de hibridação fluorescente *in situ* (FISH);

4 verificar a ocorrência de polimorfismos cromossômicos relacionados ao sexo nestas espécies;

5 isolar, clonar, sequenciar e hibridar o DNAr 5S de *Gymnotus sylvius* e *Gymnotus inaequilabiatus* para uma melhor compreensão da dispersão dessa família gênica nessas duas espécies;

6 gerar informações cariotípicas que possam contribuir para a taxonomia desse grupo, bem como para o conhecimento dos mecanismos envolvidos no seu processo de diversificação, no sentido de estabelecer possíveis relações evolutivas entre as espécies.

3 Materiais e Métodos

3.1 Materiais

3.1.1 Espécies estudadas e locais de coleta

No presente trabalho foram analisadas quatro espécies de peixes do gênero *Gymnotus*, *G. sylvius*, *G. inaequilabiatus*, *G. pantherinus* e *G. cf. carapo*, de ocorrência em componentes de diferentes bacias hidrográficas brasileiras. As espécies *G. sylvius* e *G. inaequilabiatus* tiveram quatro populações analisadas, enquanto *G. pantherinus* e *G. cf. carapo* tiveram uma única população analisada, com os locais de coleta indicados na Figura 1. De cada indivíduo foram retirados fragmentos de tecido renal para estudos citogenéticos e também fragmentos do fígado, que foram fixados em etanol 95% para estudos moleculares posteriores. Os exemplares utilizados na amostragem foram fixados em formol 10%, conservados em álcool 70% e após identificação foram depositados na coleção de Peixes do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes do Departamento de Morfologia, UNESP de Botucatu-SP.

Tabela 1. Exemplares de peixes do gênero *Gymnotus* analisados. LBP: Coleção de Peixes Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP. F: fêmeas; M: machos.

Espécies	LBP	Localidade	F	M	Coordenadas
<i>G. sylvius</i>	11160	Cachoeira Véu Noiva - Botucatu-SP	20	14	S 22° 59'25" W 48°25'40"
<i>G. sylvius</i>	11155	Rio Araquá - Botucatu - SP	02	-	S 22°47'13" W 48°28'89"
<i>G. sylvius</i>	11163	Rio Campo Novo- Bauru-SP	01	01	S 22°23'07" W 49°00'55"
<i>G. sylvius</i>	11161	Mogi Guaçu - Pirassununga-SP	-	01	S 21°55'50" W 47°22'29"
<i>G. inaequilabiatus</i>	11154	Cachoeira Véu Noiva - Botucatu-SP	02	07	S 22° 59'25" W 48°25'40"
<i>G. inaequilabiatus</i>	11158	Rio Araquá - Botucatu - SP	04	02	S 22°47'13" W 48°28'89"
<i>G. inaequilabiatus</i>	11152	Rio Campo Novo - Bauru-SP	06	13	S 22°23'07" W 49°00'55"
<i>G. inaequilabiatus</i>	11156	Mogi Guaçu - Pirassununga-SP	06	17	S 21°55'50" W 47°22'29"
<i>G. pantherinus</i>	11153	Rio Aguapeú - Mongaguá-SP	03	02	S 24°06'40" W 46°43'00"
<i>G. cf. carapo</i>	9836	Rio Miranda - Pantanal-MS	03	02	S 19°34'34" W 57°02'17"

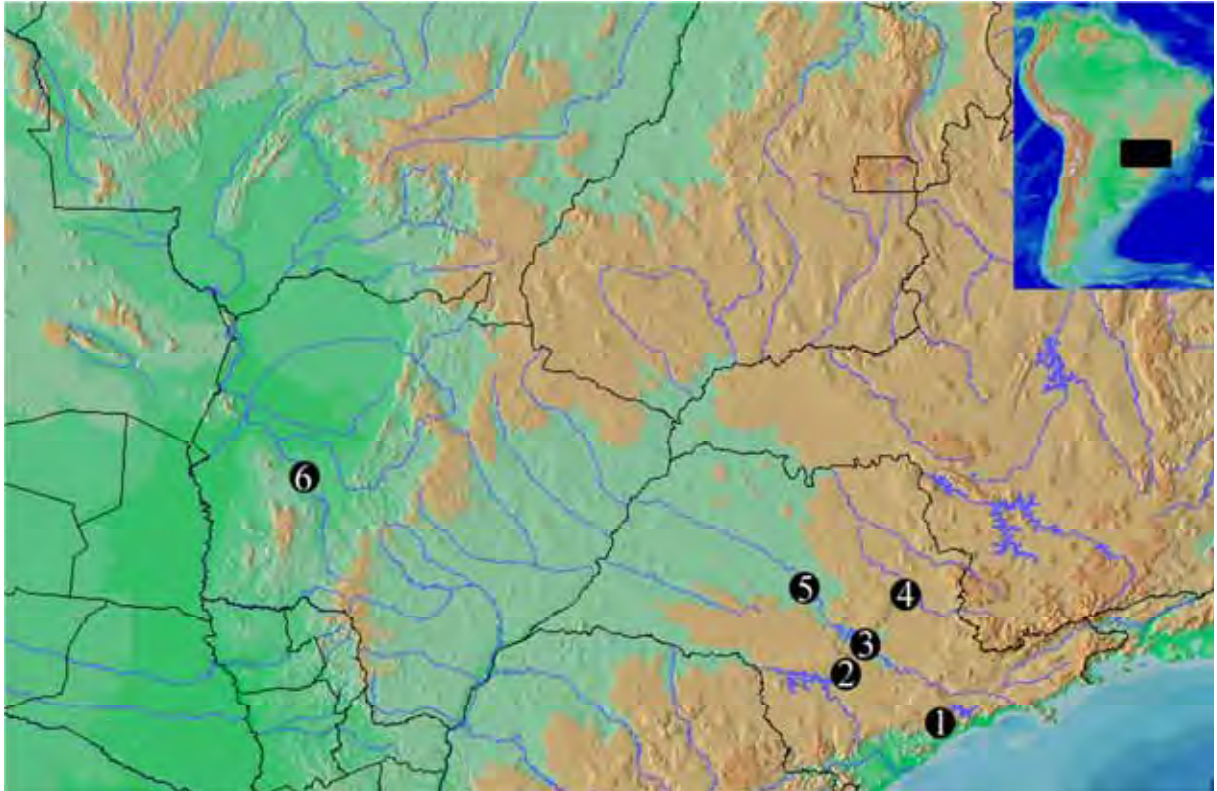


Figura 1. Mapa indicando os locais de coleta de espécies e populações de *Gymnotus*. 1 Rio Aguapeú, Mongaguá – SP, *G. pantherinus*; 2 Cachoeira Vêu da Noiva, Rio Pardo, Botucatu – SP, *G. sylvius* e *G. inaequilabiatus*; 3 Rio Araquá, Botucatu – SP, *G. sylvius* e *G. inaequilabiatus*; 4 Rio Mogi-Guaçu, Pirassununga – SP, *G. sylvius* e *G. inaequilabiatus*; 5 Rio Campo Novo, Bauru – SP, *G. sylvius* e *G. inaequilabiatus* e 6. Rio Miranda, Passo do Lontra – MS, *G. cf. carapo*.

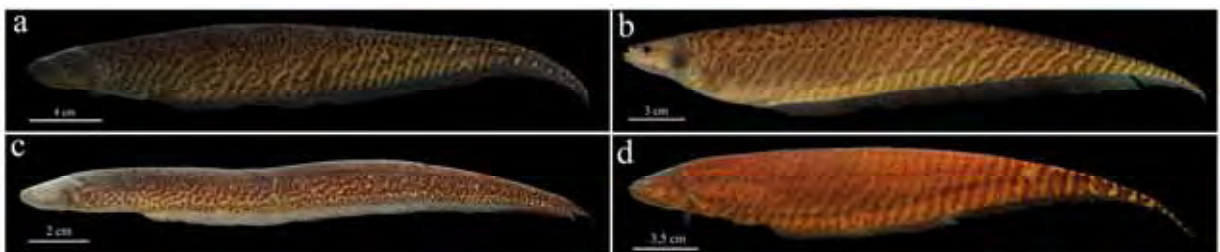


Figura 2. Fotos de exemplares das espécies estudadas. a) *G. inaequilabiatus*; b) *G. sylvius*; c) *G. pantherinus*; d) *G. cf. carapo*.

3.2 Métodos

Para a análise citogenética convencional foram utilizados os métodos de estimulação de mitoses (Cole e Levans, 1971), preparação direta de células renais (Foresti *et al.*, 1993), marcação das Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONs) com nitrato de Prata (Howell e Black, 1980) e identificação da heterocromatina constitutiva (Sumner, 1972).

Para a análise citogenética molecular foram utilizados os métodos de identificação de regiões cromossômicas ricas em GC com o uso do fluorocromo Cromomicina A₃ (Schweizer, 1976); identificação de regiões cromossômicas ricas em AT pelo fluorocromo DAPI (Schweizer *et al.*, 1978) e localização cromossômica do DNAr 18S, 5S e das sequências teloméricas (TTAGGG)_n com a técnica de hibridação fluorescente *in situ* (FISH).

3.2.1 Estimulação de Mitoses

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

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

Fragmentos de tecidos de rim e brânquias foram utilizados para a obtenção de preparações cromossômicas visando o estudo cariotípico das espécies.

3.2.2 Obtenção de Cromossomos Metafásicos

A técnica utilizada para obtenção de cromossomos metafásicos seguiu a descrição de Foresti *et al.* (1993), com algumas adaptações. Essa metodologia envolve basicamente, a inibição da polimerização dos microtúbulos pela colchicina e a hipotonização das células em

suspensão *in vitro*, seguindo-se a fixação celular pela mistura de metanol/ácido acético. O procedimento consiste em:

- 1) anestesiar o animal em solução de benzocaína a 0,01%;
- 2) sacrificar o animal, retirando o rim anterior. Transferir o material para uma pequena placa de vidro, contendo 10 ml meio de cultura RPMI previamente aquecido em estufa a 37 °C;
- 3) dissociar o material com o auxílio de pinças de dissecação, complementando esse processo com o auxílio de uma pipeta Pasteur, até obter uma solução aquosa homogênea;
- 4) adicionar 2 gotas, com uma seringa de 1ml, de colchicina a 0,01% e levar a estufa a 37 °C por 30 minutos;
- 5) centrifugar (1000 rpm) por 10 minutos e descartar o sobrenadante;
- 6) acrescentar 10 ml de solução hipotônica de KCl (0,075M) previamente aquecida a 37°C e levar a estufa 37C ° por 21 minutos;
- 7) retirar da estufa, colocando 10 gotas de fixador gelado (metanol e ácido acético na proporção de 3:1, respectivamente); agitar levemente a mistura com uma pipeta Pasteur e deixar repousar por 5 minutos a temperatura ambiente;
- 8) adicionar cerca de 10 ml de fixador e novamente agitar a mistura; levar à centrífuga (1000 rpm) por 10 minutos;
- 9) pingar o material em lâminas;
- 10) deixar secar ao ar.

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

3.2.3 Detecção das Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONs) através da Impregnação com Nitrato de Prata (AgNO₃)

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

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

- Solução B (solução de nitrato de Prata): 1g de AgNO_3 dissolvida em 2 ml de água destilada. Depois de preparadas, essas soluções devem ser mantidas em frascos escuros a 4°C .

O procedimento para a coloração das RONS é o seguinte:

- 1) hidrolisar o material por 3 minutos em HCl 1N a 60°C ;
- 2) secar as lâminas. Pingar uma gota da solução A e duas gotas da solução B sobre o material na lâmina e cobrir com lamínula;
- 3) deixar as lâminas sobre um suporte, no interior de um banho-maria a 60°C . Em alguns minutos, a mistura das soluções se torna marrom dourada. Lavar a lâmina em água destilada e deixar secar;
- 4) corar com Giemsa na proporção de 1:30 em tampão fosfato (pH = 6,7) por aproximadamente 10 segundos;
- 5) deixar secar ao ar.

3.2.4 Identificação da Heterocromatina Constitutiva

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

- 1) deixar a lâmina submersa em HCl 0,2 N por 25 minutos, a temperatura ambiente;
- 2) lavar com água destilada, a temperatura ambiente;
- 3) incubar a lâmina em solução de hidróxido de Bário 5%, a 60°C , por 5 a 15 segundos;
- 4) lavar rapidamente em HCl 1 N, a 60°C , por alguns segundos;
- 5) incubar a lâmina em 2XSSC, a 60°C , por 25 minutos;
- 6) lavar com água destilada à temperatura ambiente;
- 7) corar com Giemsa 5% por 10 minutos.

3.2.5 Identificação de Regiões Cromossômicas ricas em GC pelo fluorocromo Cromomicina A_3

Para a detecção das regiões cromossômicas ricas em pares de bases GC foi utilizada a técnica descrita por Schweizer (1976), com algumas modificações, empregando o fluorocromo CMA_3 . A técnica consiste em:

Materials e Métodos

- 1) incubar as lâminas em uma solução tampão McIlvaine + $MgCl_2$, por 10 minutos;
- 2) agitar a lâmina para retirar o excesso de tampão e pingar 2 ou 3 gotas de Cromomicina A₃ (0,5mg/ml). Cobrir com lamínula e deixar 15 minutos em câmara escura;
- 3) lavar em tampão McIlvaine sem $MgCl_2$ para retirar a lamínula;
- 4) incubar as lâminas em solução Metylgreen/Hepes-NaCl (12 mg/100ml), por 15 minutos;
- 5) lavar as lâminas em solução Hepes-NaCl e, posteriormente, em H₂O destilada;
- 6) secar as lâminas no escuro e deixá-las em geladeira *overnight*;
- 7) pingar uma gota de glicerol com 2,5% de propilgalato sobre cada gota de material;
- 8) colocar lamínula e vedar as laterais com esmalte de unha;
- 9) deixar as lâminas no escuro e em geladeira por 1 semana antes de analisar;
- 10) observar e fotografar em microscopia de fluorescência.

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

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

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

3.2.7 Extração de DNA genômico

O DNA genômico foi obtido a partir de amostras de fígado ou músculo preservadas em etanol, utilizando-se o Kit Wizard Genomic DNA Purification (PROMEGA) conforme instruções do fabricante.

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

3.2.8.1 Preparação das sondas de DNAr 18S e 5S

A sonda de DNAr 18S foi obtida por PCR (Polymerase Chain Reaction) a partir do DNA total de *Gymnotus carapo*, usando os primers 18S F (5'CCG CTT TGG TGA CTC TTG AT 3') e 18S R (5'CCG AGG ACC TCA CTA AAC CA 3'). Esta sonda foi marcada com Digoxigenina-11-dUTP (Roche Applied Science) por PCR e a detecção do sinal de hibridação foi realizada usando anti-digoxigenina-rodamina (Roche Applied Science). Os parâmetros para marcação foram: 31 µl de água Mili-Q, 5 µl de tampão da enzima Taq polimerase (10X), 5 µl de MgCl₂ (25mM), 1 µl de dATP, dCTP e dGTP e 0,7 µl de dTTP (2mM cada), 0,8 µl de Digoxigenina-11-dUTP, 1µl de cada primer (10mM), 0,5 µl de Taq polimerase (5U/µL) e 2 µl de DNA molde. Total da reação: 50 µl.

O programa de PCR utilizado apresentou as seguintes condições:

	94°C ---- 2 min	
34 ciclos	{	95°C ---- 45 seg
		52,1°C ---- 45 seg
		72°C ---- 1 min e 30 seg
	72°C ---- 5 min	
	12°C ---- manutenção	

A sonda de DNAr 5S foi obtida por PCR (Polymerase Chain Reaction) a partir do DNA total de *Synbranchus marmoratus*, usando os primers 5S F (5'TAC GCC CGA TCT CGT CCG ATC 3') e 5S R (5'CAG GCT GGT ATG GCC GTA ACG 3'). Esta sonda foi marcada com Biotina-16-dUTP (Roche Applied Science) por PCR, a detecção do sinal de hibridação foi realizada usando Avidina-fluoresceína conjugada (FITC) e os parâmetros para marcação foram: 33 µl de água Mili-Q, 2 µl de tampão da enzima Taq polimerase (10X), 5 µl de MgCl₂ (25mM), 1 µl de dATP, dCTP e dGTP e 0,5 µl de dTTP (2mM cada), 2 µl de Biotina-16-dUTP, 1 µl de cada primer (10mM), 0,5µl de Taq polimerase (5U/µL) e 2 µl de DNA molde. Total da reação: 50 µl.

O programa de PCR utilizado apresentou as seguintes condições:

	95°C ---- 5 min
34 ciclos	{ 95°C ---- 1 min
	55°C ---- 45 seg
	72°C ---- 1 min
	72°C ---- 7 min
	12°C ---- manutenção

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

3.2.8.2 Preparação da sonda telomérica

A sonda utilizada para detecção de sequências teloméricas foi amplificada e marcada por PCR, usando digoxigenina 11-dUTP (Roche Applied Science). Na ausência de DNA molde, foram usados *primers* (TTAGGG)₅ e (CCCTAA)₅ e os parâmetros para marcação foram: 33,9 µl de água Mili-Q, 5 µl de tampão da enzima Taq polimerase (10X), 2 µl de MgCl₂ (25mM), 1 µl de dATP, dCTP e dGTP e 0,7 µl de dTTP (2mM cada), 1 µl Digoxigenina-11-dUTP, 1,5 µl de cada primer (10mM), 0,4 µl de Taq polimerase (5U/µL) e 1 µl de DNA molde. Total da reação: 50 µl.

O programa de PCR utilizado apresentou as seguintes condições:

	95°C ---- 10 min
34 ciclos	{ 94°C ---- 45 seg
	50°C ---- 1 min
	68°C ---- 1 min
	68°C ---- 7 min
	12°C ---- manutenção

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

3.2.9 Hibridação Fluorescente *in situ* (FISH)

O mapeamento das sondas teloméricas, de DNAr 5S e 18S em cromossomos metafásicos foi realizado por hibridação fluorescente *in situ* de acordo com o procedimento estabelecido por Pinkel *et al.* (1986), com modificações conforme descrito abaixo:

Etapa 1: Preparação das lâminas

As lâminas foram lavadas em PBS 1x por 5 minutos à temperatura ambiente e desidratadas em série de etanol a 70%, 85% e 100% a -20°C por 5 minutos em cada banho. Posteriormente, as lâminas foram tratadas com solução de RNase (100 µg/ml) por 1 hora em câmara úmida a 37°C, lavadas 2 vezes em 2xSSC por 10 minutos e uma vez em PBS 1x por 5 minutos. Em seguida, as lâminas foram tratadas com pepsina 0,005%/HCl 10mM por 10 minutos a 37°C, lavadas em PBS 1x à temperatura ambiente por 5 minutos e fixadas com formaldeído 1%/PBS 1x/MgCl₂ 50mM por 10 minutos a temperatura ambiente. Depois de fixadas, as lâminas foram lavadas em PBS 1x por 5 minutos e desidratadas em série de etanol a 70%, 85% e 100% a -20°C por 5 minutos em cada banho. Após a secagem, as lâminas foram desnaturadas em formamida 70% a 70°C por 5 minutos e desidratadas em série de etanol a 70%, 85% e 100% a -20°C por 5 minutos em cada banho. Simultaneamente à desnaturação das lâminas, desnaturou-se a solução de hibridação (10% sulfato dextrato, 50% formamida e 20xSSC e Água) contendo 3-6 µL de sonda marcada por 10 minutos a 100°C. Posteriormente, 15 µL de solução de hibridação foram colocados sobre a lâmina, que foi coberta com lamínula e mantida em câmara úmida a 37°C *overnight*.

Etapa 2: Detecção dos sinais correspondentes

Após a hibridação as lâminas foram lavadas 2 vezes em solução de formamida 15%/0,2xSSC a 42°C por 10 minutos cada. Em seguida, foram lavadas 3 vezes em solução de 0,1xSSC a 60°C por 5 minutos cada e uma vez em solução Tween 0,5%/4xSSC à temperatura ambiente por 5 minutos. Após as lavagens, as lâminas foram cobertas com 50 µL de solução de bloqueio (leite em pó, 20xSSC, e água) por 15 minutos e lavadas 2 vezes em Tween 0,5%/4xSSC a temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram incubadas com 30 µL de solução de bloqueio com anticorpo (24 µL de solução de bloqueio e 6 µL de antidigoxi-rodamina) por 1 hora em câmara úmida e escura a 37°C. Posteriormente, foram lavadas 3

vezes em Tween 0,5%/4xSSC por 5 minutos, desidratadas em série de etanol 70%, 85% e 100% a -20°C por 5 minutos em cada banho, secas e cobertas com 22 µL de Vectashield® Mounting Medium com DAPI (Vector). As lâminas foram analisadas em um fotomicroscópio óptico de fluorescência (Olympus BX61) e as imagens metafásicas foram capturadas usando o programa Image Pro Plus, 6.0 software (MediaCybernetics).

3.2.10 Preparação para sondas de cromossomos inteiros e hibridação fluorescente *in situ* (FISH)

Etapa 1: Preparo da sonda

As sondas de cromossomos inteiros foram preparadas a partir de cultura de fibroblasto de *G. cf. carapo*, citótipo de 2n=42 (Ilha do Marajó), no departamento de Medicina Veterinária na Universidade de Cambridge-UK (Nagamachi *et al.*, 2010). Os cromossomos foram isolados por FACS (Fluorescent Activated Chromosome Sorting), amplificados por DOP-PCR, seguindo a metodologia descrita por Telenius *et al.* (1992) e Yang *et al.* (1995). O cariógrama de fluxo mostrou quatro regiões, das quais a região um é constituída pelo par portador das RONS. Foram isolados 400 cromossomos de cada região do cariógrama de fluxo e submetidos à DOP-PCR utilizando um primer degenerado (6MW). Após, 1 µL do produto desta DOP-PCR foi utilizado para uma segunda DOP-PCR, agora utilizando nucleotídeo marcado direto com um fluorocromo (dUTP-Cy3 ou dUTP-FITC) ou indireto com um hapteno (dUTP-Biotina ou dUTP-Digoxigenina). A sonda do cromossomo portador das RONS assim produzida, foi utilizada para hibridizar em preparações cromossômicas das espécies em estudo na presente dissertação.

Etapa 2: Hibridação fluorescente *in situ* (FISH)

A realização da hibridação fluorescente *in situ* (FISH) da sonda de pintura foi realizada como descrito por Yang *et al.* 1995.

Preparo das lâminas: Lâminas recém preparadas foram desidratadas em uma bateria de álcool em temperatura ambiente (70%, 2X, 2 minutos cada; 90% ,2X, 2 minutos cada e 100%, 1X, 4 minutos), envelhecidas em estufa a 65°C por 2 horas, desnaturadas em formamida 70% (70 mL de formamida e 30 mL de 2XSSC) a 65°C por 1 minuto, desidratadas novamente na

bateria de álcool (70% gelado 1X 4 minutos; 70% 1X 2 minutos; 90% 2X 2 minutos cada e 100% 1X 4 minutos).

Preparo da sonda: 14µl do mix de hibridação (50% formamida, 1xSSC, 10% sulfato dextrano, 5mg de DNA de esperma de salmão) e 1µl de produto de PCR foi desnaturado a 70°C por 10 minuto. A sonda assim preparada é colocada sobre a lâmina já desnaturada. Coloca-se uma lamínula limpa sobre a lâmina para espalhar a sonda e sela-se com uma cola flexível. Após coloca-se a lâmina em câmara úmida e incuba-se em estufa a 37°C por 2 ou 3 dias.

Lavagem de estringência: Retira-se a lamínula e procede-se à lavagem da lâmina para retirar o excesso de sonda. Incuba-se a lâmina em formamida 50% (50 mL de formamida e 50 mL de 2XSSC) 2X por 5 minutos cada, 2XSSC 2X 5 minutos cada e 4T (500 mL de 4XSSC e 250 µL de Tween 20) 1X por 4 minutos. Este procedimento é feito em banho Maria a 40-42°C. Se a sonda utilizada for de marcação direta com um fluorocromo (Cy3 ou FITC, por exemplo), após passar pelo 4T, deve-se escorrer o excesso e colocar uma gota de anti-fade com DAPI, cobrir com lamínula, retirar o excesso de líquido e selar com esmalte.

Deteção do sinal: Se a sonda for de marcação indireta, deve-se proceder à deteção do sinal utilizando uma solução contendo anticorpo ligado a um fluorocromo, por exemplo, avidina-Cy3 ou avidina-FITC (para sondas marcadas com Biotina) ou anti-digoxigenina ligado a um fluorocromo. Em ambos os casos, a solução de deteção é constituído de 200 µL de 4T e 0,4 µL do anticorpo. Esta solução é colocada sobre a lâmina após passar pelo 4T, coloca-se uma lamínula de plástico sobre a solução e incuba-se a 37°C por 20 minutos. Após, a lâmina é passado pela bateria de lavagem de estringência. Após 4T, escorrer o excesso e colocar uma gota do anti-fade com DAPI, cobrir com lamínula, retirar o excesso de líquido e selar com esmalte.

3.2.11 Caracterização do DNAr 5S

Sequências de DNAr 5S foram isoladas do DNA genômico de exemplares de *Gymnotus sylvius* e *Gymnotus inaequilabiatus*, clonadas, sequenciadas e usadas como sondas para hibridação fluorescente *in situ*.

3.2.12 Isolamento do DNAr 5S por PCR

O DNAr 5S foi isolado por PCR com o uso dos *primers* 5S F (5'TAC GCC CGA TCT CGT CCG ATC 3') e 5S R (5'CAG GCT GGT ATG GCC GTA ACG 3'). Esses *primers* amplificaram os genes DNAr 5S e seus espaçadores não transcritos (NTS).

O mix de PCR utilizado apresentou os seguintes parâmetros: 16,5 µl de água Mili-Q, 1,5 µl de MgCl₂ (25mM), 1,25 µl de Tampão 1, 1,25 µl de Tampão 2, 1,0 µl dNTP mix (2mM), 1,0 µl de cada *primer* (10mM), 0,5 µl de Taq polimerase (5U/µL) e 1,0 µl de DNA molde. Total da reação: 25 µl.

O programa de PCR utilizado apresentou as seguintes condições:

	95°C ---- 5 min	
24 ciclos	{	95°C ---- 1 min
		60°C ---- 30 seg
		72°C ---- 1 min
		72°C ---- 10 min
	4°C ---- manutenção	

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

3.2.13 Eluição das bandas obtidas pela amplificação por PCR do DNAr 5S

Para eluição dos fragmentos de DNA 5S em gel de agarose foi realizado primeiramente um recorte preciso da banda no gel e a eluição foi realizada utilizando o Kit GE – PCR DNA and Gel Band Purification Kit, de acordo com o protocolo do fabricante. Em todos os casos, o DNA foi eluído em maior volume, garantindo uma melhor recuperação do DNA. O produto de eluição foi visualizado em gel de agarose 1% juntamente com marcador de peso molecular *Low DNA Mass Ladder*, o qual permite a quantificação do DNA e determina o tamanho do inserto.

3.2.14 PCR (Pfx) para preparar o fragmento a ser clonado

Para deixar o fragmento *blunt*, adequado para a clonagem, foi realizada a PCR-Pfx de cada banda isolada do produto de PCR através do kit *Pfx50™* DNA Polymerase da Invitrogen. O mix de PCR utilizado apresentou os seguintes parâmetros: 18,5 µl de água Mili-Q, 2,5 µl de Tampão, 1,0 µl dNTP mix (2mM), 1,0 µl de cada *primer* (10mM), 0,5 µl de Taq polimerase Pfx (5U/µL) e 0,5µl de produto de PCR. Total da reação: 25 µl.

O programa de PCR utilizado apresentou as seguintes condições:

	94°C ---- 5 min	
19 ciclos	{	94°C ---- 30 seg
		58°C ---- 30 seg
		72°C ---- 15 seg
	72°C ---- 5 min	
	4°C ---- manutenção	

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

3.2.15 Clonagem das bandas eluídas do DNAr 5S

Após a eluição das bandas desejadas, os fragmentos de DNA foram clonados com o Kit Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit *with One Shot® TOP10 Electrocomp™ E.coli* (Life Technologies - Invitrogen).

O protocolo consistiu em:

1) *Ligação com o vetor*: Para cada fragmento clonado preparar uma reação (solução disponibilizada no kit). Colocar em um Eppendorf 4 µl do produto a ser clonado, 1 µl de dilute salt solution (1:4) e 1 µl de pcrII-Blunt-TOPO, incubar a 22°C por 30 minutos e colocar no gelo por 2 minutos.

2) *Transformação*: Adicionar 2 µl da ligação às células competentes e misturar cuidadosamente; transferir às células competentes para uma cubeta própria para efetuar a eletroporação, eletroporar a 2000 V. Adicionar imediatamente 250 µl de SOC na cubeta a temperatura ambiente, transferir pra outro tubo e agitar por 1 hora a 37°C para recuperação;

enquanto isso, adicionar 30 µl de X-Gal 2% para cada placa que será usada, incubar a 37°C *overnight* e estocar a 4°C em saco plástico fechado.

3.2.16 Crescimento e estocagem dos clones recombinantes

Bactérias transformadas foram transferidas para placas de Petri em meio LB/Agar contendo ampicilina e X-gal. A placa foi deixada na estufa a 37°C *overnight*. As colônias recombinantes foram retiradas com ponteiros estéreis e inoculadas em 5 ml de meio LB líquido contendo ampicilina, conforme descrito abaixo

Crescimento e estocagem:

Fazer 200 ml de meio LB (1 g Select Peptone 140; 0,5 g Select Yeast extract; 1 g de NaCl; 96 ml H₂O), colocar 5 ml de meio nos tubos de ensaio autoclavados e quando o meio estiver morno, adicionar ampicilina (200 µl H₂O/0,010 ng de ampicilina), selecionar as bactérias transformadas (colônias brancas) e, com ponteira estéril, raspá-las e colocá-las no tubo de ensaio, colocar os tubos de ensaio no shaker a 37°C *overnight* com 225 rpm.

3.2.17 PCR para confirmação da presença de insertos

Para verificar a presença de insertos de interesse nos clones obtidos, algumas colônias (potencialmente portadoras do inserto de interesse) foram repicadas em meio sólido LB e submetidas a reações de amplificação (PCR) com o uso dos *primers* M13 F (5' TGT AAA ACG ACG GCC AGT 3') e M13 R (5' CAG GAA ACA GCT ATG ACC 3'). O mix de PCR utilizado apresentou a seguinte composição: 15 µl de água Mili-Q, 1,5 µl de MgCl₂ (25mM), 2,5 µl de Tampão (50mM), 1,0 µl dNTP mix (2mM), 1,0 µl de cada *primer* (10mM), 0,5 µl de Taq polimerase (5U/µL) e fração de DNA obtido diretamente da colônia com auxílio de uma ponteira (*toothpick*). Total da reação: 25 µl. O programa de PCR utilizado apresentou as seguintes condições:

	96°C ---- 5 min
24 ciclos	{
	96°C ---- 45 seg
	51°C ---- 45 seg
	72°C ---- 1 min e 40 seg
	72°C ---- 10 min
	4°C ---- manutenção

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

3.2.18 Reação de sequenciamento para amostras clonadas do DNAr 5S

Para a realização da reação de seqüenciamento foi utilizado o Kit BigDye Terminosator v1.1 Cycle Sequencing Kit e uma quantidade de DNA correspondente a 10 ng para os fragmentos com tamanho de até 500 pb e 15 ng para os fragmentos entre 500-1000 pb conforme instruções dos próprio Kit. O programa de PCR utilizado apresentou a seguinte composição: 2 µl de Tampão de reação (5X), 0,5 µl de um dos *primer* (0,1mM), 1 µl do mix de reação, 0,7 µl de DyeSeq e o suficiente para completar 10 µl de água. Total da reação: 10 µl.

O programa de PCR utilizado apresentou as seguintes condições:

	96°C ---- 30 seg	
24 ciclos	{	50°C ---- 30 seg
		60°C ---- 4 min
		72°C ---- 1min e 40 seg
		72°C ---- 10 min
	4°C ---- manutenção	

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

3.2.19 Limpeza da reação de sequenciamento

Para a limpeza: Foram adicionados 0,7 µl de EDTA (125mM) e 0,7 µl de acetato de sódio (3M), homogeneizados e centrifugados brevemente. Depois, foram acrescentados 17,5 µl etanol 100% gelado, o produto foi homogeneizado e centrifugado brevemente, incubado no escuro por 15 minutos em temperatura ambiente, centrifugado por 15 minutos a 13000 rpm em temperatura ambiente, sendo descartado o sobrenadante em papel toalha. Após batê-lo levemente algumas vezes, foram adicionados 24,5 µl de etanol 70% gelado e o produto foi centrifugado por 10 minutos a 13000 rpm em temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado em papel toalha e, após batê-lo levemente algumas vezes, foram repetidos os passos de lavagem com etanol 70% novamente. Após secagem em termociclador por 2

minutos a 96°C, tubos e termo aberto, o conteúdo foi guardado em geladeira coberto por papel alumínio.

3.2.20 Sequenciamento

A sequência nucleotídica dos clones recombinantes foi determinada através do BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing de acordo com instruções do fabricante, em sequenciador automático ABI PRISM® 3100GeneticAnalyzer/HITACHI com 96 capilares. As sequências obtidas foram alinhadas utilizando o programa ATGC (Genetix Inc.), BIOEDIT (Hall, 1999) e DAMBE (Xia e Xie, 2001). Para identificação de possíveis homologias, as sequências nucleotídicas obtidas foram submetidas à busca online BLAST (“Basic Local Alignment Search Tool”) (Altschul *et al.*, 1990) através do National Center for Biotechnology Information - NCBI website <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>. O alinhamento das sequências nucleotídicas foi realizado com o programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1997). Análises de distância genética foram realizadas pelo parâmetro Kimura-2 (Kimura, 1980).

3.2.21 Preparação da sonda dos clones do DNAr 5S

A sonda de DNAr 5S foi obtida por PCR (Polymerase Chain Reaction) a partir dos clones das bandas maior e menor de material proveniente de *Gymnotus sylvius* e *Gymnotus inaequilabiatus*, que foram isoladas para a produção de sonda individual dessas duas bandas, usando os primers M13 F (5´ TGT AAA ACG ACG GCC AGT 3´) e M13S R (5´ CAG GAA ACA GCT ATG ACC 3´). A sonda do DNAr 5S da banda maior e menor de *G. inaequilabatus* e da banda menor de *G. sylvius* foram marcadas com Biotina-16-dUTP (Roche Applied Science), sendo a detecção do sinal de hibridação realizada usando Avidina-fluoresceína conjugada (FITC). Os parâmetros utilizados para marcação foram: 31,5 µl de água Mili-Q, 5 µl de tampão da enzima Taq polimerase (10X), 3 µl de MgCl₂ (25mM), 1 µl de dATP, dCTP e dGTP e 0,7 µl de dTTP (2mM cada), 2,5 µl de Biotina-16-dUTP, 2 µl de cada primer (10mM), 0,7 µl de Taq polimerase (5U/µL) e 2 µl de DNA molde. Total da reação: 50 µl.

	96°C ---- 5 min	
24 ciclos	{	96°C ---- 45 seg
		51°C ---- 45 seg
		72°C ---- 1min e 40 seg
	72°C ---- 10 min	
	12°C ---- manutenção	

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

A sonda de DNAr 5S foi obtida a partir dos clones da banda maior de *G. sylvius* também usando os primers M13 F (5´ TGT AAA ACG ACG GCC AGT 3´) e M13 R (5´ CAG GAA ACA GCT ATG ACC 3´) foi marcada com Digoxigenina-11-dUTP (Roche Applied Science), sendo a detecção do sinal de hibridação realizada usando anti-digoxigenina-rodamina (Roche Applied Science). Os parâmetros utilizados para marcação foram: 5,6 µl de água Mili-Q, 2 µl de tampão da enzima Taq polimerase (10X), 0,8 µl de MgCl₂ (50mM), 2 µl de dATP, dCTP e dGTP e 1,4 µl de dTTP (2mM cada), 1,2 µl de Digoxigenina-11-dUTP, 0,4 µl de cada primer (10mM), 0,2 µl de Taq polimerase (5U/µL) e 2 µl de DNA molde. Total da reação: 20 µl.

O programa de PCR utilizado apresentou as seguintes condições:

	94°C ---- 1 min	
3 ciclos	{	94°C ---- 30 seg
		61°C ---- 30 seg
		72°C ---- 45 seg
32 ciclos	{	94°C ---- 30 seg
		58°C ---- 30 seg
		72°C ---- 45 seg
	72°C ---- 10 min	
	12°C ---- manutenção	

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

3.3 Estudos Cariotípicos

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

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

4 Resultados e Discussão

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

Capítulo 1

Diversidade cariotípica em populações e espécies de *Gymnotus* (Teleostei, Gymnotiformes, Gymnotidae): mapeamento físico dos genes ribossomais e sequências teloméricas

Resumo

No presente trabalho foram analisadas citogeneticamente quatorze populações de peixes do gênero *Gymnotus*, sendo seis populações de *G. sylvius*, seis populações de *G. inaequilabiatus*, uma população de *G. pantherinus* e uma população de *G. cf. carapo* provenientes de componentes de diferentes bacias hidrográficas brasileiras. Nesta análise foram utilizadas técnicas citogenéticas clássicas (Giemsa, Ag-RONs e Bandamento C) e cito-moleculares (CMA₃, DAPI, DNAr 5S, DNAr 18S e DNA telomérico). *Gymnotus sylvius* apresentou número diplóide de 40 cromossomos (22m+12sm+6st); *G. pantherinus* apresentou número diplóide de 52 cromossomos (32m+18sm+2st) e *G. inaequilabiatus* (42m+10sm+2a) e *G. cf. carapo* (38m+12sm+4st) apresentaram 54 cromossomos. O bandamento C evidenciou marcações centroméricas em todos os cromossomos de todas as populações das quatro espécies, porém, também foram detectadas algumas marcações intersticiais em representantes de *G. sylvius* e grandes blocos intersticiais nos cromossomos dos exemplares representantes das populações de *G. inaequilabiatus*, *G. cf. carapo* e *G. pantherinus*. As RONS foram identificadas em apenas um par cromossômico nos representantes das quatro espécies e foram coincidentes com a hibridação fluorescente *in situ* (FISH) realizada com a sonda para DNAr 18S e a coloração com o fluorocromo CMA₃. No entanto, enquanto as RONS foram observadas intersticialmente no braço curto os cromossomos do par número 1 em representantes de *G. inaequilabiatus*, *G. cf. carapo* e *G. pantherinus*, estes cístrons ribossomais foram visualizados nos cromossomos do par 17 nas amostras de *G. sylvius*. A hibridação com a sonda para DNAr 5S revelou marcações em até dezessete pares de cromossomos nos representantes de todas as populações de *G. inaequilabiatus* e até quinze pares em *G. cf. carapo*; em um par nas populações de *G. sylvius* e marcações em dois pares cromossômicos na população de *G. pantherinus*. A hibridação com a sonda para a sequência telomérica (TTAGGG)_n revelou marcações nos telômeros de todos os cromossomos dos representantes destas quatro espécies, além de blocos intersticiais no primeiro par metacêntrico de *G. sylvius* e junto às RONS de *G. inaequilabiatus* e *G. cf. carapo*. Os dados apresentados revelaram significativos marcadores citotaxonômicos para este grupo de peixes, permitindo uma avaliação mais definida dos processos envolvidos na diferenciação cariotípica deste grupo de peixes e das inter-relações existentes entre as espécies de *Gymnotus*.

Introdução

Os peixes pertencentes à ordem dos Gymnotiformes, popularmente conhecidos como “túviras”, “peixes elétricos” ou “peixes espada”, constituem um grupo endêmico das águas doces da região Neotropical (Albert e Crampton, 2003). Essa ordem possui mais de 100 espécies e 27 gêneros que estão agrupados em cinco famílias: Gymnotidae, Rhamphichthyidae, Hypopomidae, Sternopygidae e Aptenrotidae (Mago-Leccia, 1994). Entre os Gymnotiformes, a diversidade cariotípica é mais bem conhecida nos gêneros *Gymnotus* e *Eigenmannia*, ricos em espécies.

A família Gymnotidae atualmente é constituída pelos gêneros *Gymnotus*, com 33 espécies válidas e *Electrophorus*, com apenas uma espécie válida (Crampton e Hopkins, 2005). O gênero *Gymnotus* é o que apresenta a mais ampla distribuição geográfica, ocorrendo nas águas continentais das Américas do Sul e Central, sendo encontrado desde o Rio Salgado, nos pampas argentinos (36° S), até o Rio San Nicolás, México (18° N), com exceção do Chile e Belize (Albert *et al.*, 2005). *Gymnotus* é muito diverso também na Bacia Amazônica, onde 19 espécies são conhecidas, incluindo três formas não descritas formalmente (Crampton *et al.*, 2005; Milhomem, 2010).

Existem dados citogenéticos disponíveis para espécies de *Gymnotus* encontradas em diversas localidades brasileiras, que evidenciam a ocorrência de uma alta diversidade cariotípica. Essa ampla variabilidade cromossômica é caracterizada pelos diferentes números diplóides observados em algumas espécies, como em *G. carapo* e *G. inaequilabiatus* com 54 cromossomos, *G. sylvius* que apresenta 40 cromossomos, *G. pantherinus* com 52 cromossomos e *G. pantanal* com 40 cromossomos nas fêmeas e 39 nos machos, evidenciando a ocorrência de um sistema múltiplo de cromossomos sexuais e *G. capanema* com 34 cromossomos, o menor número cromossômico observado para o gênero até o momento (revisão em Margarido *et al.*, 2007; Milhomem, 2010).

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de ampliar os dados citogenéticos disponíveis para o gênero *Gymnotus*, mapeando e comparando a distribuição de sequências de DNA ribossômico e telomérico junto aos cromossomos de diferentes espécies deste gênero. Os dados obtidos poderão ser usados para o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos no processo de diferenciação cariotípica e de diversificação deste grupo de peixes.

Materiais e Métodos

Foram analisados citogeneticamente representantes de quatro espécies de peixes do gênero *Gymnotus* coletados em diferentes componentes das bacias hidrográficas brasileiras, indicados na Figura 1 e na Tabela 1. Os exemplares analisados foram fixados em formol a 10% e conservados em álcool 70% e, após identificação, foram depositados no Museu do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (LBP) da UNESP de Botucatu, São Paulo, Brasil.

As preparações de cromossomos mitóticos foram realizadas de acordo com o protocolo utilizado por Foresti *et al.* (1993), com algumas adaptações. A marcação das RONS pelo nitrato de Prata seguiu a técnica proposta por Howell e Black (1980) e o bandamento C foi realizado seguindo o protocolo descrito por Sumner (1972).

Na análise citogenética molecular foram utilizados os métodos de identificação de regiões cromossômicas ricas em GC, com o uso do fluorocromo Cromomicina A₃ (Schweizer, 1976) e identificação de regiões cromossômicas ricas em AT, com o uso do fluorocromo DAPI (Schweizer *et al.*, 1978). O mapeamento dos sítios de DNAr 18S e 5S nos cromossomos metafásicos foi realizado com a aplicação da técnica de hibridação fluorescente *in situ* (FISH), de acordo com o procedimento estabelecido por Pinkel *et al.* (1986), com modificações. A sonda de DNAr 18S foi obtida por PCR (Polymerase Chain Reaction) a partir do DNA total de *Gymnotus carapo* e a sonda de DNAr 5S também foi obtida por PCR a partir de DNA total de *Synbranchus marmoratus*. A sonda 18S foi marcada com Digoxigenina-11-dUTP (Roche Applied Science) por PCR e a detecção do sinal de hibridação foi realizada usando anti-Digoxigenina-Rodamina (Roche Applied Science). A sonda 5S foi marcada com Biotina-16-dUTP (Roche Applied Science) por PCR e a detecção do sinal de hibridação foi realizada usando Avidina-Fluoresceína conjugada (FITC).

A sonda utilizada para detecção das sequências teloméricas foi amplificada por PCR usando *primers* (TTAGGG)₅ e (CCCTAA)₅. Ela foi marcada com Digoxigenina 11-dUTP (Roche Applied Science) por PCR e os sinais de hibridação foram detectados usando anti-Digoxigenina-Rodamina. A morfologia cromossômica foi determinada de acordo com a relação de braços estabelecida por Levan *et al.* (1964), sendo os cromossomos classificados como metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a) e arranjados no cariótipo em ordem decrescente de tamanho.

Resultados

A análise citogenética dos representantes das quatro espécies de *Gymnotus* evidenciou a manutenção das características cariotípicas entre os representantes das populações nas espécies analisadas, bem como uma variação do número diplóide entre as espécies, sendo de 40 cromossomos em *G. sylvius* (Figura 2a), de 54 cromossomos em *G. inaequilabiatus* (Figura 3a) e *G. cf. carapo* (Figura 5a) e de 52 cromossomos em *G. pantherinus* (Figura 4a) (dados sumarizados na Tabela 2).

O bandamento C revelou significativas diferenças nos padrões de distribuição da heterocromatina entre as espécies analisadas. As populações de *G. sylvius* apresentaram pequena quantidade de heterocromatina constitutiva restrita às regiões centroméricas de todos os cromossomos, além de blocos coincidentes com as RONS (Figura 2b). Já nas populações de *G. inaequilabiatus* (Figura 3b), *G. pantherinus* (Figura 4b) e em *G. cf. carapo* (Figura 5b), foi possível observar, além de marcações centroméricas e pericentroméricas, grandes blocos heterocromáticos intersticiais em alguns cromossomos. Não foram observados polimorfismos numéricos ou estruturais relacionados à presença de cromossomos supranumerários ou relacionados ao sexo dos exemplares em nenhuma das espécies e/ou populações analisadas.

A impregnação pelo nitrato de Prata evidenciou que todas as espécies e populações de *Gymnotus* analisadas possuem RONS simples. As populações de *G. sylvius* apresentaram duas marcações na região terminal dos braços curtos dos cromossomos do par 17 (destaque na Figura 2a). Os representantes das demais espécies apresentaram seus sítios ribossomais localizados nos braços curtos dos cromossomos do par número 1 (destaque nas Figuras 3a, 4a e 5a). A aplicação da técnica de FISH usando a sonda de DNAr 18S confirmou os resultados obtidos com o nitrato de Prata (Figuras 2d, 3d, e 5d-verde, 4d-vermelho) e a hibridação com a sonda de DNAr 5S evidenciou a localização deste gene em posição pericentromérica de até 17 pares cromossômicos nos representantes de *G. inaequilabiatus* e de até 15 pares em *G. cf. carapo* (Figuras 3d e 5d – vermelho), em dois pares cromossômicos (números 3 e 5) em *G. pantherinus* (Figura 4d – verde) e apenas no par número 5 nos representantes das populações de *G. sylvius* (Figura 2d – vermelho). A coloração com o fluorocromo CMA₃ em *G. inaequilabiatus* e *G. cf. carapo* marcou somente o par da RONS (Figuras 3c e 5c) enquanto *G. sylvius* e *G. pantherinus* apresentaram dois pares cromossômicos marcados, além do par portador da RONS (Figuras 2c e 4c).

A aplicação da técnica de FISH com a sonda telomérica (TTAGGG)_n evidenciou sinais de hibridação em posição terminal de todos os cromossomos, em todas as populações

analisadas (Figura 6). No entanto, foram observadas marcações conspícuas junto às RONS nas preparações cromossômicas dos representantes de *G. inaequilabiatus* (Figura 6b) e de *G. cf. carapo* (Figura 6c), além da marcação de sítios teloméricos intersticiais (ITS) no par cromossômico número 1 em *G. sylvius* (Figura 6a). Os dados estão sumarizados na Tabela 2 e representados em um idiograma na Figura 7.

Discussão

Os estudos citogenéticos no gênero *Gymnotus* têm evidenciado a existência de uma alta diversidade cariotípica entre as espécies, notadamente em relação ao número diplóide, com espécies que possuem desde 34 cromossomos (*G. capanema*) até espécies com 54 cromossomos (*G. inaequilabiatus*) (Fernandes-Matioli *et al.*, 1998b, Milhomem, 2010). No presente trabalho, a análise de diferentes populações de quatro espécies de *Gymnotus* confirmou esta variabilidade cromossômica, evidenciando a ocorrência de diferenças marcantes entre os cariótipos de diferentes espécies. No entanto, a ocorrência de acentuada manutenção da estrutura cariotípica entre as diferentes populações analisadas nas espécies *G. sylvius* e *G. inaequilabiatus* também pode ser constatada. A diversidade cariotípica encontrada entre as espécies pode estar relacionada ao fato dos representantes do gênero *Gymnotus* serem organismos endêmicos e não migradores de longas distâncias. Dessa forma, também esperava-se encontrar diferenças cariotípicas entre as populações de uma mesma espécie, fato que estaria relacionado à falta de fluxo gênico e isolamento reprodutivo desses indivíduos, como postulado para amostras de *Characidium cf. gomesi* (Pansonato-Alves *et al.*, 2011). Entretanto, foi observada uma constância numérica e identidade entre as populações de uma mesma espécie no gênero *Gymnotus*, não sendo detectada qualquer variabilidade cariotípica até o presente momento. Considerando estas características dos representantes do gênero *Gymnotus*, a citogenética poderia ser utilizada como uma ferramenta importante para diagnóstico taxonômico neste grupo de peixes (Margarido *et al.*, 2007).

As diferenças encontradas no número e na morfologia dos cromossomos entre as espécies sugerem a ocorrência de rearranjos estruturais e numéricos para o estabelecimento do processo de diferenciação. Milhomem *et al.* (2008) detectaram possíveis alterações na estrutura cariotípica em representantes de *G. carapo* com $2n=40$ e $2n=42$ da bacia Amazônica e Claro e Almeida-Toledo (2010) em *G. sylvius* ($2n=40$) e *G. cf. carapo* ($2n=54$) da bacia do rio Paraná. Estes autores sugeriram que as diferenças encontradas no número diplóide destas espécies teriam surgido em decorrência de rearranjos cromossômicos do tipo fusão cêntrica.

No entanto, Nagamachi *et al.* (2010), em análise realizada com base em sondas produzidas a partir de cromossomos inteiros nas mesmas amostras estudadas por Milhomem *et al.* (2008), sugeriram que as modificações estruturais encontradas nos cariótipos dos indivíduos seriam muito mais complexas do que simples fusões ou fissões cêntricas, que os representantes do gênero *Gymnotus* apresentam uma alta plasticidade genômica e que as amostras amazônicas analisadas, até então denominadas crípticas, tratar-se-iam, na verdade, de espécies distintas.

No presente trabalho, a aplicação da técnica de hibridação fluorescente *in situ* com a sonda para a conservada sequência telomérica (TTAGGG)_n revelou sinais de hibridação nas extremidades de todos os cromossomos em todas as populações analisadas (Figuras 6). No entanto, os representantes de *G. sylvius* foram os únicos a apresentarem ITS em seus cromossomos. A presença destes sítios teloméricos intersticiais em alguns cromossomos poderiam ser indicativos da ocorrência de eventos de fusão cêntrica recente nos representantes desta espécie, como já discutido por Claro e Almeida-Toledo (2010) em *G. sylvius* e *G. cf. carapo* e Milhomem *et al.* (2008) em amostras de *G. carapo*. Estes autores propõem que eventos de fusão cromossômica atuariam como os mais importantes mecanismos de evolução cariotípica neste grupo de peixes. Ainda, Claro e Almeida-Toledo (2010), trabalhando com a incorporação de 5-BrdU em preparações citogenéticas de *G. sylvius* e *G. cf. carapo*, detectaram homologias entre vários cromossomos destas duas espécies, sendo que três pares cromossômicos de cada espécie apresentaram correspondência completa entre suas bandas, indicando que esses cromossomos provavelmente foram herdados de um ancestral comum.

A ocorrência de ITS em alguns cromossomos do cariótipo de *G. sylvius*, bem como sua inexistência no cariótipo de *G. pantherinus* poderia ser atribuída a diferentes fatores, como a ocorrência de outros rearranjos cromossômicos, à plasticidade destas sequências teloméricas ou ainda ao tempo de divergência entre estas espécies, determinando alterações nas sequências e, possivelmente, tornando-as não detectáveis pela sonda. Numa reconstrução filogenética com base em dados citogenéticos e moleculares, Fernandes-Matioli e Almeida-Toledo (2001) sugeriram que *G. sylvius* constitui uma espécie derivada dentre os representantes do gênero *Gymnotus*, enquanto *G. pantherinus* aparentemente se diferenciou há muito mais tempo. Assim, a presença e a ausência destes sítios teloméricos intersticiais em *G. sylvius* e *G. pantherinus* poderia ser justificada pelo tempo de divergência entre estas espécies. Por outro lado, se for considerado que o cariótipo com 52 cromossomos caracterizaria o conjunto genômico basal para o gênero *Gymnotus* (Fernandes-Matioli e Almeida-Toledo, 2001), seria plausível esperar a presença de ITS em mais pares de cromossomos no cariótipo de *G. sylvius*. No entanto, a ocorrência de apenas um par de

cromossomos com ITS identificado nesta espécie poderia estar relacionada com modificações de bases ocorridas nessas sequências teloméricas intersticiais, impossibilitando sua detecção por FISH convencional. Tal situação é também proposta para *G. Capanema* ($2n=34$ cromossomos), espécie que possui o menor número cromossômico dentro do gênero *Gymnotus* e ausência de ITS (Milhomem, 2010).

A identificação das regiões organizadoras de nucléolo nas quatro espécies analisadas pela impregnação por nitrato de Prata e pela sonda de DNAr 18S revelou apenas um par cromossômico contendo essas regiões, caracterizando-se como um sistema simples de RONS e corroborando dados obtidos anteriormente (Fernandes-Matioli *et al.*, 1997). Além disso, é possível observar a existência de polimorfismo no tamanho dos sítios das RONS entre os cromossomos homólogos, comum em peixes e já detectado no gênero *Gymnotus* (Foresti *et al.*, 1981; Fernandes-Matioli *et al.*, 1997; Claro, 2008).

Em *G. inaequilabiatus*, *G. pantherinus* e *G. cf. carapo* as RONS foram localizadas no par número 1, enquanto em *G. sylvius* foram localizadas no par número 17. Esta constatação permite confirmar o caráter conservado das RONS nos representantes deste grupo, tanto pela marcação nos cromossomos do primeiro par em três das espécies estudadas, quanto pelo sistema simples de RONS, situação também encontrada em outros grupos de peixes, como os ciclídeos (Feldberg *et al.*, 2003). Por outro lado, Lacerda e Maistro (2007), analisando três espécies simpátricas de *Gymnotus*, encontraram marcações de RONS espécie-específicas, dando indicações do seu caráter móvel e dinâmico, o que levou os autores a considerarem que esta característica também poderia ser utilizada como uma ferramenta citotaxonômica. Em estudos ainda mais recentes, Milhomem (2010) detectou em *G. jonasii* a ocorrência de RONS múltiplas, até então identificada apenas em *G. pantanal* (Fernandes-Matioli *et al.*, 2005).

Quando tratamentos com o fluorocromo CMA₃ foram utilizados em preparações cromossômicas de representantes de *Gymnotus* foi possível observar marcações adicionais àquelas dos sítios ribossomais em *G. sylvius* e *G. pantherinus*, indicando a presença de regiões ricas em GC também em sítios de outros pares de cromossomos. Gold e Amemiya (1986) afirmaram que o tratamento com CMA₃ marcaria sítios ribossomais ativos e inativos. Entretanto, estudos com peixes Neotropicais mostraram que a CMA₃ pode marcar também regiões heterocromáticas não relacionadas com as RONS (Artoni *et al.*, 1999).

A aplicação da técnica de hibridação utilizando sonda de DNAr 5S evidenciou uma dispersão diferencial dessa classe gênica para as espécies analisadas. *G. sylvius* apresentou apenas um par cromossômico com marcação para este sítio ribossômico; *G. pantherinus* apresentou dois pares marcados, enquanto *G. inaequilabiatus* apresentou marcas em até

dezessete pares e *G. cf. carapo* apresentou até quinze pares marcados, aparentemente coincidentes com regiões de heterocromatina constitutiva.

O bandamento C revelou que os representantes das quatro espécies analisadas possuem regiões heterocromáticas em posição centromérica na maioria dos cromossomos, confirmando dados já descritos anteriormente (Fernandes-Matioli *et al.*, 1998b; Silva e Margarido, 2005; Margarido *et al.*, 2007). A ocorrência destes sítios de DNAr 5S dispersos tem sido detectada em diversas espécies de peixes (Martins e Galetti, 1999; Mantovani *et al.*, 2005; Hatanaka e Galetti, 2004). A localização das regiões heterocromáticas e as variações no padrão de distribuição dos sítios do DNAr 5S em *G. inaequilabiatus*, *G. cf. carapo* e até mesmo em *G. pantherinus* podem ter favorecido a ocorrência de rearranjos estruturais no cariótipo dessas espécies, já que regiões heterocromáticas são mais propícias a quebras, facilitando assim, a dispersão dessa sequência gênica em uma ou mais classes diferentes de DNA. Em *G. sylvius*, a presença de apenas um par cromossômico com DNAr 5S poderia estar associada à ausência de grandes blocos heterocromáticos, em comparação às outras espécies. Martins e Galetti (2001) relataram a existência de duas classes do DNAr 5S em diferentes cromossomos de peixes do gênero *Leporinus*. Considerando o alto grau de dispersão do DNAr 5S nas espécies *G. inaequilabiatus* e *G. cf. carapo*, é possível que diferentes classes deste gene ribossomal estejam distribuídas diferencialmente nos cromossomos destas espécies. Por outro lado, em *G. pantherinus* e *G. sylvius*, as distintas classes de DNAr 5S poderiam estar co-localizadas nos cromossomos, como já observado na raia de água doce *Potamotrygon motoro* (Cruz, 2009).

Estudos recentes realizados por Cioffi *et al.* (2010) sugerem que elementos transponíveis do tipo retrotransposon REX₃ podem estar associados à distribuição e dispersão do DNAr 5S no cariótipo de representantes do gênero *Erythrinus*. Entretanto, a possibilidade da existência de pseudogenes não pode ser descartada na constatação da dispersão desse gene, uma vez que a heterocromatina poderia apresentar sequências semelhantes às do DNAr 5S, como foi sugerido ocorrer em peixes do gênero *Centropyge* (Affonso e Galetti, 2005).

Apesar da marcada conservação cariotípica existente entre as populações das espécies de *Gymnotus* estudadas, os resultados obtidos no presente trabalho revelaram também grandes diferenças tanto na macro quanto na microestrutura cromossômica entre as espécies do gênero *Gymnotus*, dando indícios sobre possíveis caminhos evolutivos percorridos nos seus processos de diferenciação.

Referências

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

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

Espécies	LBP	Localidade	F	M	Coordenadas
<i>G. sylvius</i>	11160	Cachoeira Véu Noiva - Botucatu-SP	20	14	S 22° 59'25" W 48°25'40"
<i>G. sylvius</i>	11155	Rio Araquá - Botucatu – SP	02	-	S 22°47'13" W 48°28'89"
<i>G. sylvius</i>	11163	Rio Campo Novo- Bauru-SP	01	01	S 22°23'07" W 49°00'55"
<i>G. sylvius</i>	11161	Mogi Guaçu - Pirassununga-SP	-	01	S 21°55'50" W 47°22'29"
<i>G. inaequilabiatus</i>	11154	Cachoeira Véu Noiva - Botucatu-SP	02	07	S 22° 59'25" W 48°25'40"
<i>G. inaequilabiatus</i>	11158	Rio Araquá - Botucatu – SP	04	02	S 22°47'13" W 48°28'89"
<i>G. inaequilabiatus</i>	11152	Rio Campo Novo - Bauru-SP	06	13	S 22°23'07" W 49°00'55"
<i>G. inaequilabiatus</i>	11156	Mogi Guaçu - Pirassununga-SP	06	17	S 21°55'50" W 47°22'29"
<i>G. pantherinus</i>	11153	Rio Aguapeú - Mongaguá-SP	03	02	S 24°06'40" W 46°43'00"
<i>G. cf. carapo</i>	9836	Rio Miranda - Pantanal-MS	03	02	S 19°34'34" W 57°02'17"

Tabela 2: Dado citogenéticos encontrados nas quatro espécies do gênero *Gymnotus*. ITS: Sítios Teloméricos Intersticiais. (T) Marcação terminal; (I) Marcação intersticial.

Espécie	DNAr 5S	DNAr 18S	ITS	CMA ₃	Fórmula Cariotípica
<i>G. sylvius</i>	Par 4	17 (T)	Par 1	Pares 7, 1 e 17	22m+12sm+6st
<i>G. inaequilabiatus</i>	Em até 17 pares	01 (I)	--	Par 1	42m+10sm+2a
<i>G. pantherinus</i>	Pares 3 e 5	01 (I)	--	Pares 1, 4 e 12	32m+18sm+2st
<i>G. cf. carapo</i>	Em até 15 pares	01 (I)	--	Par 1	38m+12sm+4st

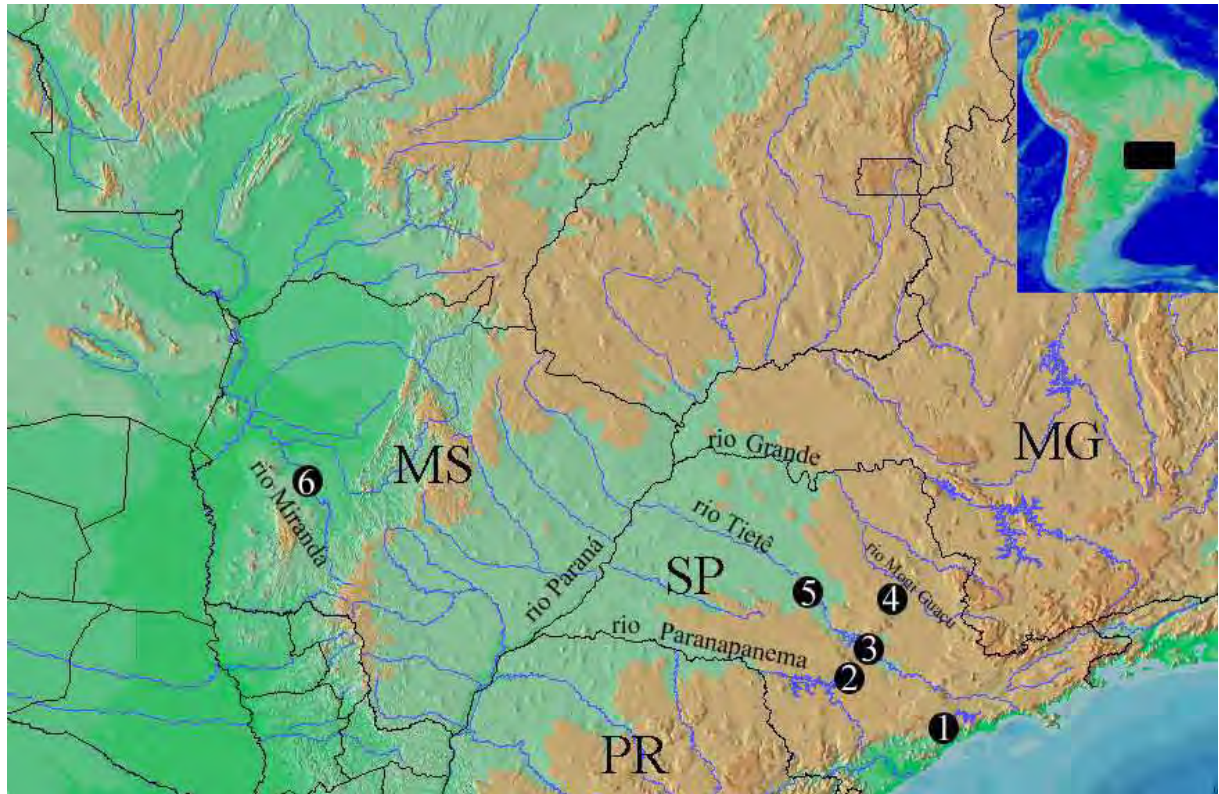


Figura 1: Mapa indicando os locais de coleta das espécies e populações analisadas de *Gymnotus*. 1. Rio Aguapeú, Mongaguá – SP, *G. pantherinus*; 2. Cachoeira Veu de Noiva, Rio Pardo, Botucatu – SP, *G. sylvius* e *G. inaequilabiatus*; 3. Rio Araquá, Botucatu – SP, *G. sylvius* e *G. inaequilabiatus*; 4. Rio Mogi-Guaçu, Pirassununga – SP, *G. sylvius* e *G. inaequilabiatus*; 5. Rio Campo Novo, Bauru – SP, *G. sylvius* e *G. inaequilabiatus* e 6. Rio Miranda, Passo do Lontra – MT, *G. cf. carapo*.

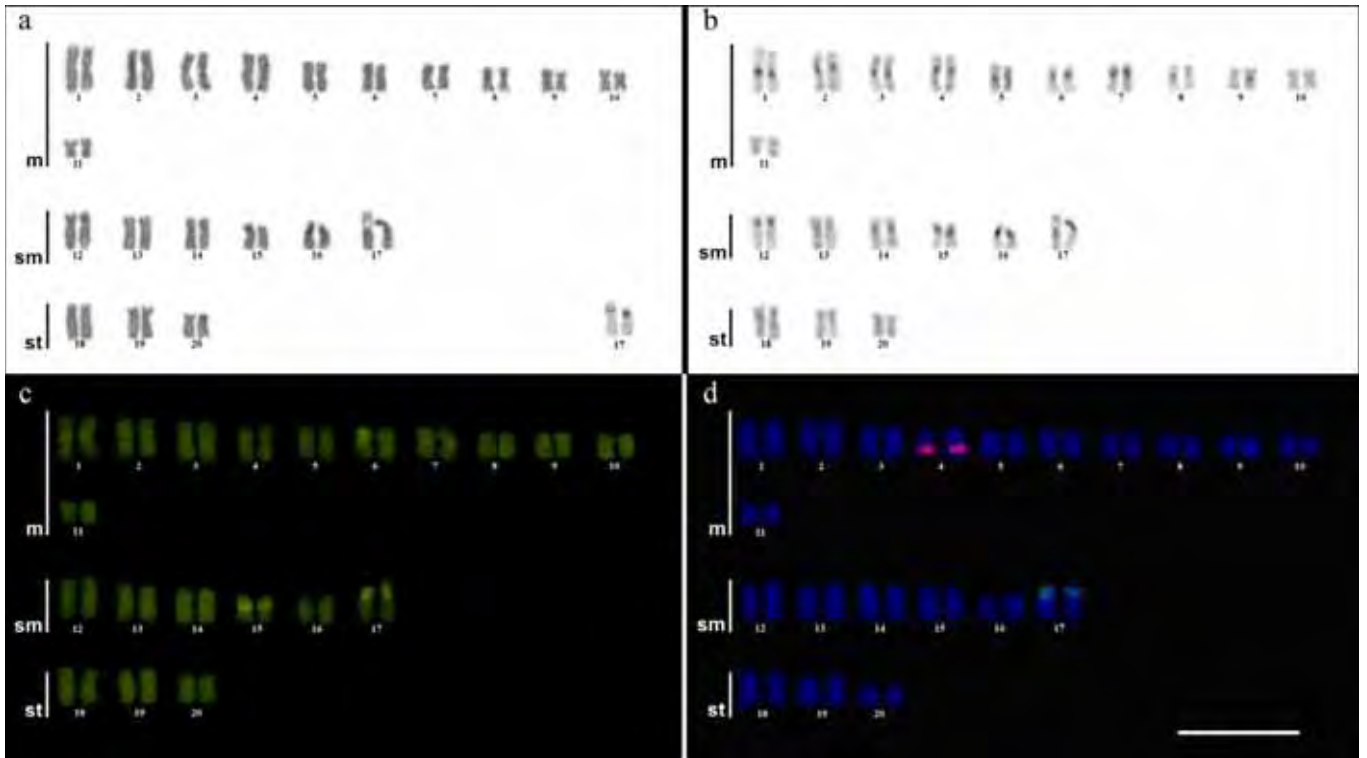


Figura 2: Cariótipos de *G. sylvius* após coloração convencional com Giemsa (a), o posicionamento do par 17 é recorrente da presença da RON, de tamanho variável, bandamento C (b), coloração com o fluorocromo CMA₃ (c) e *double FISH* com sondas de DNAr 5S em vermelho e DNAr 18S em verde (d). A barra equivale a 10µm.

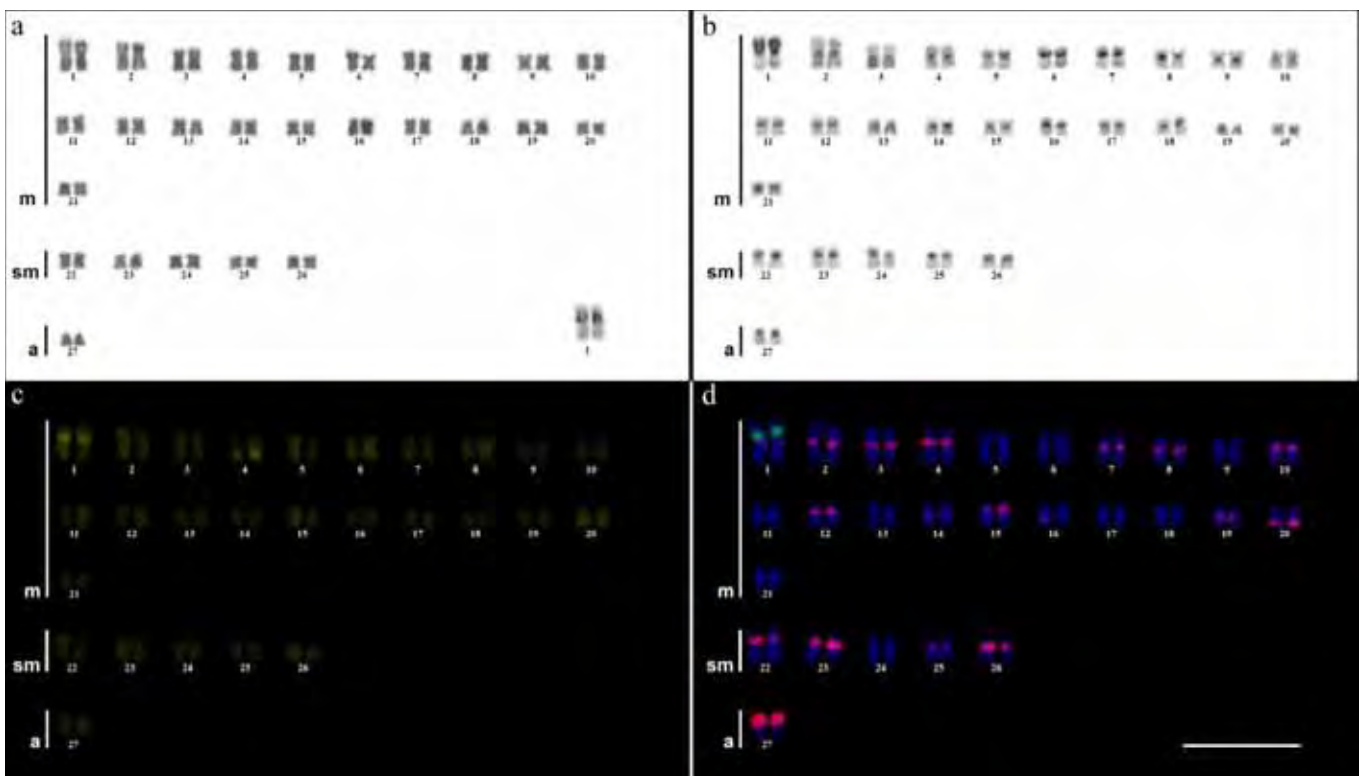


Figura 3: Cariótipos de *G. inaequilabiatus* após coloração convencional com Giemsa (a), bandamento C (b), coloração com o fluorocromo CMA₃ (c) e *double FISH* com sondas de DNAr 5S em vermelho e DNAr 18S em verde (d). A barra equivale a 10 µm.

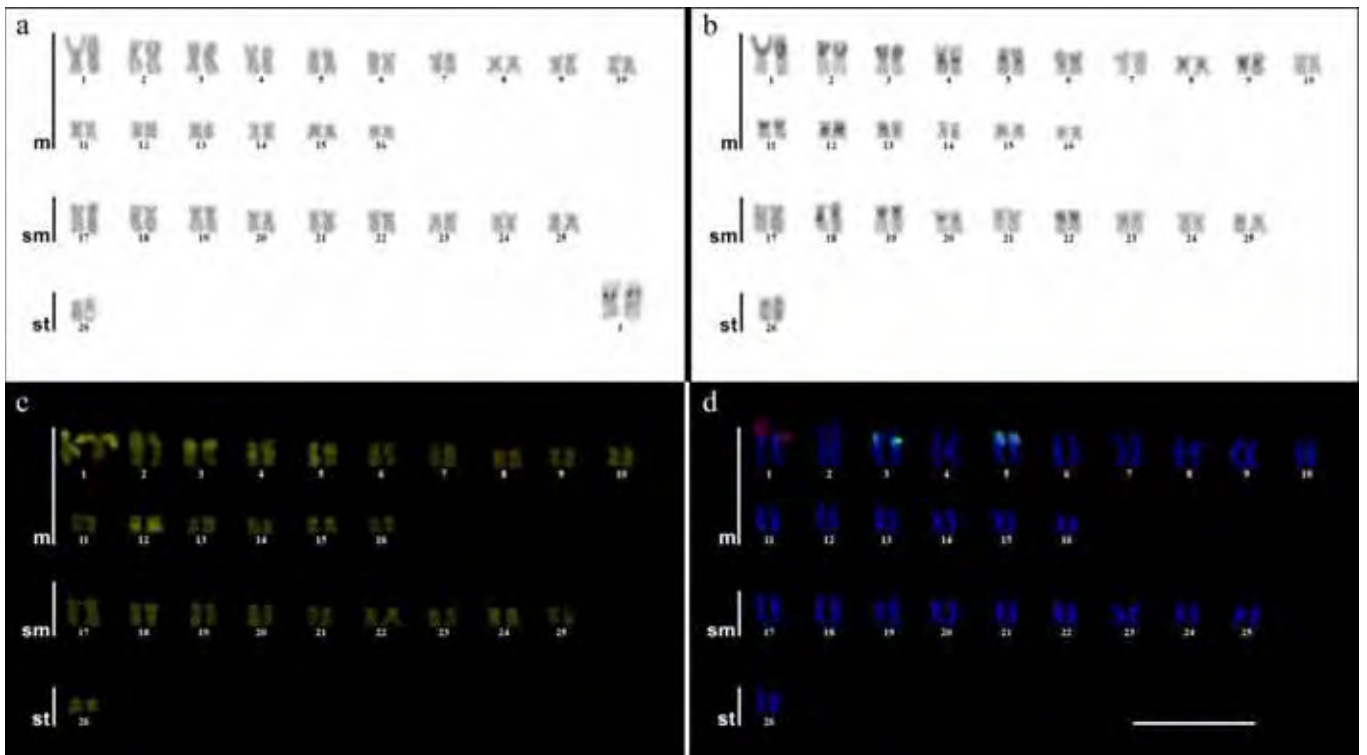


Figura 4: Cariótipos de *G. pantherinus* após coloração convencional com Giemsa (a), bandamento C (b), coloração com o fluorocromo CMA₃ (c) e *double FISH* com sondas de DNAr 5S em verde e DNAr 18S em vermelho (d). A barra equivale a 10 µm.

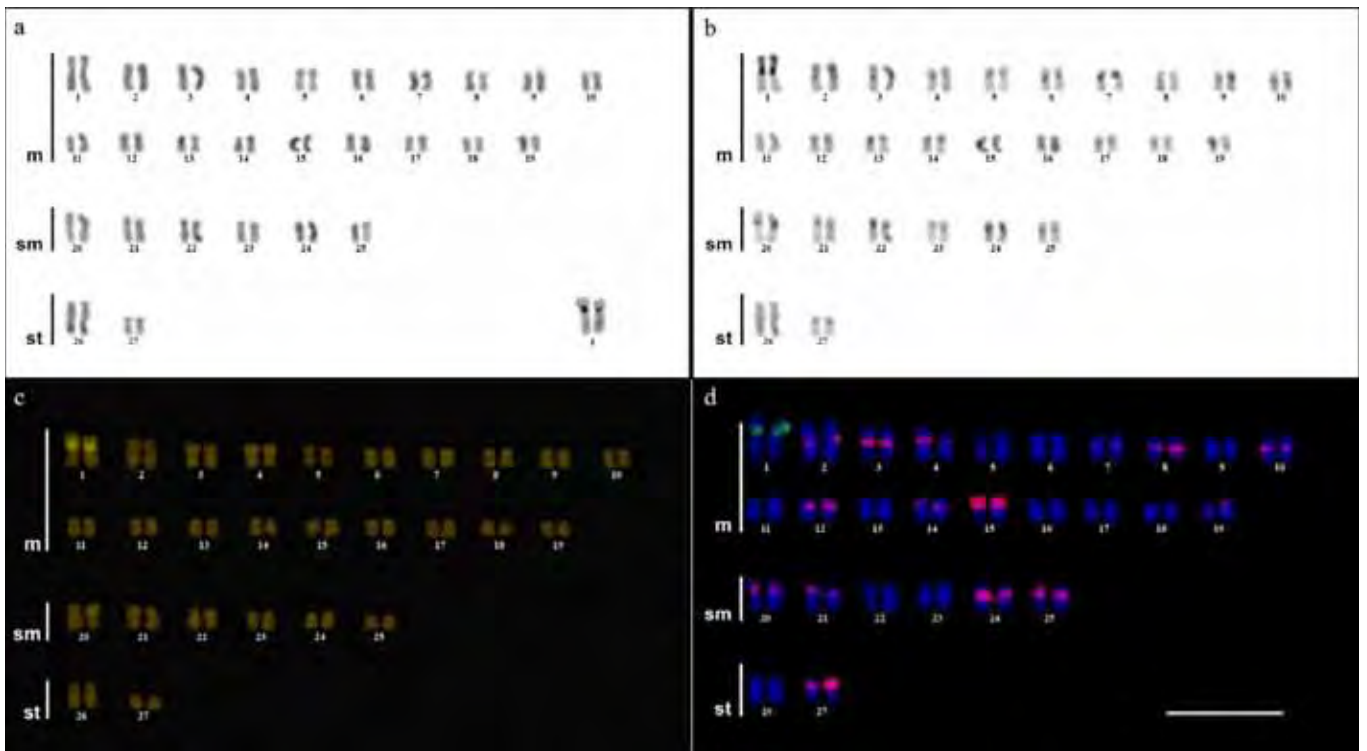


Figura 5: Cariótipos de *G. cf. carapo* após coloração convencional com Giemsa (a), bandamento C (b), coloração com o fluorocromo CMA₃ (c) e *double FISH* com sondas de DNAr 5S em vermelho e DNAr 18S em verde (d). A barra equivale a 10 µm.

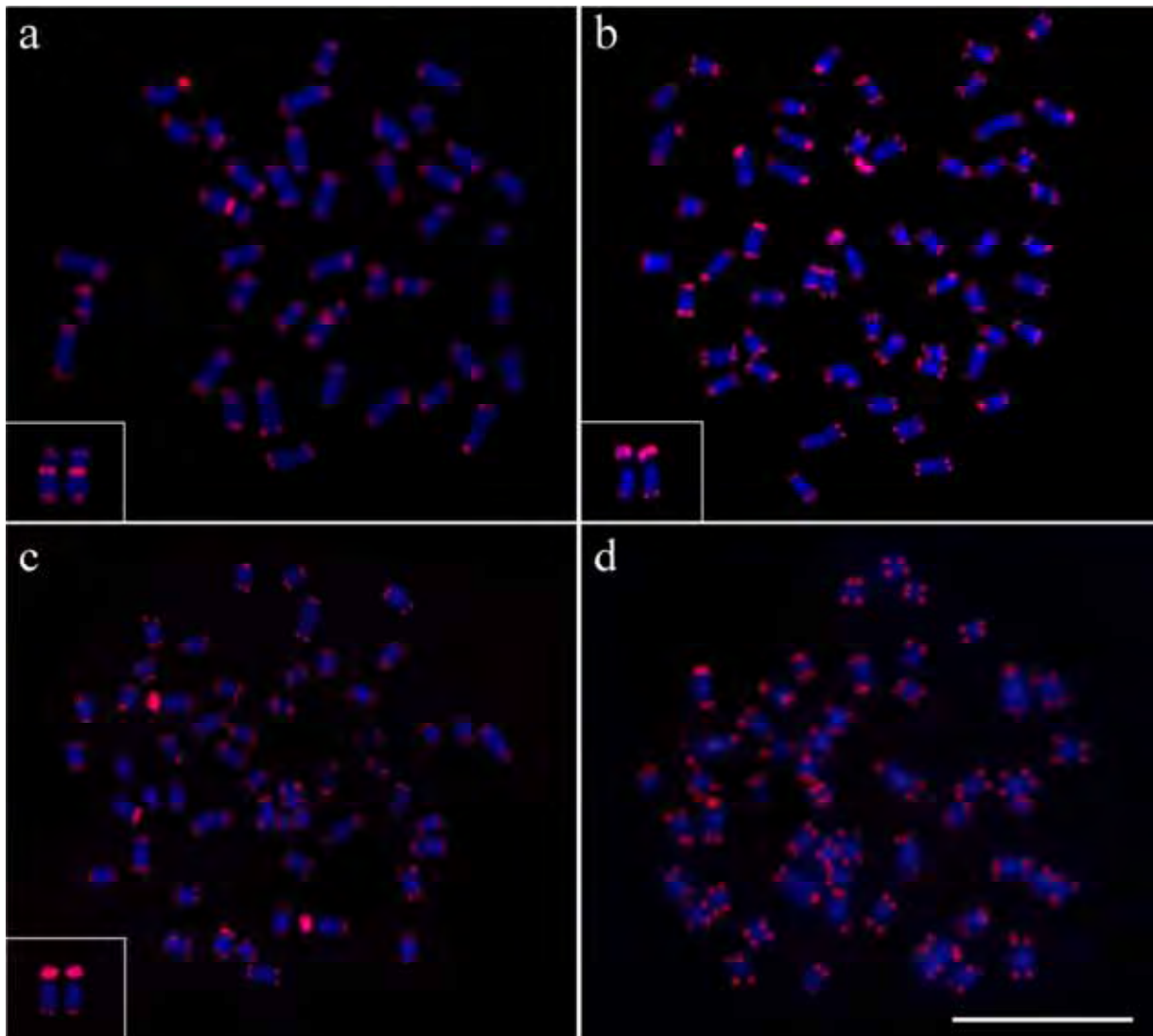


Figura 6: Padrão de distribuição dos sítios teloméricos em metáfases dos representantes das quatro espécies de *Gymnotus* analisadas. Em a, *G. sylvius* (em destaque sítios teloméricos intersticiais - ITS), em b, *G. inaequilabiatus*, em c, *G. cf. carapo* e em d, *G. pantherinus*. A barra equivale a 10 µm.

Capítulo 2

Caracterização molecular e mapeamento físico de duas classes de DNAr 5S em *Gymnotus sylvius* e *Gymnotus inaequilabiatus* (Teleostei, Gymnotiformes, Gymnotidae).

Resumo

O gene ribossomal 5S tem se caracterizado como uma importante ferramenta para estudos genéticos e evolutivos em peixes, pois apesar de apresentar-se de forma estruturada, sendo uma sequência codificante, é seguido por um espaçador não transcrito (NTS) que é comumente variável. Estas variações parecem ser regidas por um intenso mecanismo evolutivo, o que faz desta região uma importante fonte de estudos sobre a origem e organização de famílias multigênicas, sendo útil como marcador genético mesmo para espécies intimamente relacionadas. Desta forma, o presente trabalho teve o objetivo de ampliar os dados genéticos sobre as espécies do gênero *Gymnotus* (*G. sylvius* e *G. inaequilabiatus*), com a caracterização de sua organização genômica e a localização cromossômica do DNAr 5S. Foram utilizadas as técnicas de amplificação do DNA, clonagem, sequenciamento e hibridação fluorescente *in situ* (FISH) que evidenciaram a existência de duas classes distintas de DNAr 5S (Classe I e Classe II) em ambas as espécies em estudo. Estes segmentos genômicos se apresentaram com diferentes tamanhos, sendo a Classe I com aproximadamente 450 pb e a Classe II com cerca de 650 pb. Através do isolamento e clonagem dos segmentos de DNAr 5S de cada espécie, foi observada uma alta conservação com relação à região codificadora e alterações em maior número foram identificadas nas regiões dos NTS, que normalmente apresentam-se variáveis. Sequências do tipo TATA-like foram encontradas ao longo dos NTS, provavelmente com papel importante na regulação de sua expressão. A aplicação da técnica de hibridação fluorescente *in situ* utilizando sondas específicas de cada classe de DNAr 5S, revelou que em *G. sylvius* as duas classes apresentam-se co-localizadas no mesmo par cromossômico, enquanto em *G. inaequilabiatus* a classe II apareceu mais dispersa em relação à classe I. Os dados obtidos, além de revelarem aspectos citomoleculares destas espécies, com a caracterização de sua organização genômica e a localização cromossômica dos sítios de DNAr 5S, também forneceram informações para o entendimento dos padrões de diversificação, especiação e evolução deste grupo de peixes.

Introdução

Os genes ribossomais nos eucariotos superiores são organizados em duas famílias multigênicas, sendo a primeira representada pelo DNA ribossômico 45S, unidade transcricional que codifica os RNAr 18S, 5.8S e 28S e está associada à formação do nucléolo. A segunda família é representada pelo DNAr 5S que codifica o RNAr 5S encontrado na maior subunidade dos ribossomos, estando comumente separada em relação à primeira e não tendo associação com a formação do nucléolo. Contudo, pode encontrar-se intercalada com outras famílias gênicas, como os genes de histonas e o próprio DNAr 45S (Pendás *et al.*, 1994; Drouin e Moniz de Sá, 1995).

O DNAr 5S apresenta repetições que consistem em cópias altamente conservadas de 120 pares de base (pb), separadas por um espaçador não-transcrito (NTS) que é comumente variável (Long e David, 1980). Os NTS parecem estar envolvidos em um intenso processo evolutivo, o que faz desta região uma importante fonte de estudos sobre a organização e evolução dessa família multigênica nos genomas, tornando possível rastrear eventos recentes de evolução (Martins e Wasko, 2004).

A sequência de DNAr 5S junto ao seu NTS tem sido investigada em várias espécies de peixes teleósteos e tem se caracterizado como um bom marcador cromossômico, de valor considerável para a compreensão da dinâmica evolutiva dessa família multigênica (Martins e Wasko, 2004). Porém, informações sobre sua localização nos cromossomos de peixes são ainda restritas, uma vez que os sítios de DNAr 5S só podem ser observados através da hibridação fluorescente *in situ*, diferentemente do DNAr 18S que pode ser observado também pela impregnação por nitrato de Prata (Pendás *et al.*, 1994; Ferro *et al.*, 2001). Além disso, a existência de diferentes unidades de DNAr 5S, especialmente aquelas que caracterizam dois tipos de classes identificadas pelas diferenças no tamanho dos NTS, também tem sido documentadas em várias espécies de peixes (Pendás *et al.*, 1995; Martins e Galetti, 2001; Morescalchi *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2010).

Os peixes representantes do gênero *Gymnotus* são constituído por espécies que apresentam grande variabilidade cromossômica, com números diplóides que variam desde 34 cromossomos em *Gymnotus capanema*, até 54 cromossomos em *Gymnotus carapo* e *Gymnotus inaequilabiatus* (revisão em Milhomem, 2010; Fernandes-Matioli *et al.*, 1998). Embora existam dados citogenéticos disponíveis para diferentes espécies de *Gymnotus* capturadas em diversas localidades brasileiras (Foresti *et al.*, 1984; Fernandes-Matioli *et al.*, 1998; Sánchez *et al.*, 2004; Fernandes-Matioli *et al.*, 2005; Silva e Margarido, 2005;

Milhomem *et al.*, 2007; Milhomem *et al.*, 2008) são escassos os dados sobre a localização e organização molecular do DNAr 5S nas espécies deste gênero. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo a realização de análises cito-moleculares em espécies do gênero *Gymnotus* para uma melhor compreensão da evolução dessa família gênica nesse grupo de peixes.

Materiais e Métodos

Foram analisados trinta e quatro exemplares de *Gymnotus sylvius* e nove exemplares de *Gymnotus inaequilabiatus*, provenientes da cachoeira Véu da Noiva, bacia do rio Paranapanema, município de Botucatu-SP.

A técnica utilizada para obtenção de cromossomos metafásicos seguiu a descrição de Foresti *et al.* (1993), com algumas adaptações. Para amplificação do DNAr 5S e seus espaçadores não transcritos, foi utilizado o conjunto de *primers* 5S F (5'TAC GCC CGA TCT CGT CCG ATC 3') e 5S R (5'CAG GCT GGT ATG GCC GTA ACG 3') (Pendás *et al.*, 1994).

Amostras de DNA de interesse foram isoladas do gel e purificadas usando o GE – PCR DNA and Gel Band Purification Kit, de acordo com o protocolo do fabricante. Após a eluição dos fragmentos realizou-se uma PCR-Pfx de cada banda isolada do produto de PCR através do kit *Pfx50™* DNA Polymerase da Invitrogen e em seguida os fragmentos de DNA foram clonados com o Kit Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit *with One Shot® TOP10 Electrocomp™ E. coli* (Life Technologies – Invitrogen), seguindo instruções do fabricante. Para verificar a presença de insertos de interesse nos clones obtidos, algumas colônias potencialmente portadoras destes foram repicadas em meio sólido LB e submetidas a reações de amplificação (PCR) com o uso dos *primers* M13 F (5' TGT AAA ACG ACG GCC AGT 3') e M13' R (5' CAG GAA ACA GCT ATG ACC 3'), seguindo o seguinte protocolo: em um tubo de 0,2 ml foi adicionado 15 µl de água Mili-Q, 1,5 µl de MgCl₂ (25mM), 2,5 µl de Tampão (50mM), 1,0 µl dNTP mix (2mM), 1,0 µl de cada *primer* (10mM), 0,5 µl de Taq polimerase (5U/µL) e fração do DNA obtido diretamente da colônia com auxílio de uma ponteira (*toothpick*), para um volume final de 25 µl.

A metodologia utilizada para a hibridação das sondas em cromossomos metafásicos foi realizada com base nos procedimentos estabelecidos por Pinkel *et al.* (1986), com adaptações.

As sondas do DNAr 5S das classes I e II de *G. inaequilabiatus* e da classe I de *G. sylvius* foram marcadas com Biotina-16-dUTP (Roche Applied Science), sendo a detecção do sinal de hibridação realizada com Avidina-fluoresceína conjugada (FITC). A sonda de DNAr 5S dos clones da classe II de *G. sylvius* foi marcada com Digoxigenina-11-dUTP (Roche Applied Science), sendo a detecção do sinal de hibridação realizada com anti-digoxigenina-rodamina (Roche Applied Science).

O sequenciamento nucleotídico dos clones de interesse foi realizado utilizando o Kit BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing de acordo com instruções do fabricante, em sequenciador automático ABI PRISM® 3100GeneticAnalyzer/HITACHI com 96 capilares. As sequências obtidas foram alinhadas utilizando o programa ATGC (Genetix Inc.), BIOEDIT (Hall, 1999) e DAMBE (Xia e Xie, 2001). Para identificação de possíveis homologias, as sequências nucleotídicas obtidas foram submetidas à busca online BLAST (“Basic Local Alignment Search Tool”) (Altschul *et al.*, 1990) através do National Center for Biotechnology Information - NCBI website <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). O alinhamento das sequências nucleotídicas foi realizado com o programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1997) e as análises de distância genética foram realizadas pelo parâmetro Kimura-2 (Kimura, 1980).

Resultados

A análise dos produtos de amplificação (PCR) do DNAr 5S nas espécies *G. sylvius* e *G. inaequilabiatus* em gel de agarose revelou a presença de dois fragmentos genômicos, sendo um menor composto por cerca de 450 pares de bases e outro maior com aproximadamente 650 pares de bases (Figura 1), evidenciando a ocorrência de classes distintas de DNAr 5S, denominadas classe I e classe II, respectivamente.

O sequenciamento de três clones para cada fragmento nas espécies em estudo permitiu a elaboração de uma sequência consenso para as classes I e II, revelando peculiaridades sobre as regiões mais conservadas e variáveis do gene ribossomal 5S. Estes dados encontram-se descritos na Tabela 1 e as sequências consenso de *G. sylvius* (Figura 5), *G. inaequilabiatus* (Figura 6) e entre as duas espécies (Figura 7).

As análises de divergência genética revelaram que entre as classes I das espécies *G. sylvius* e *G. inaequilabiatus*, a divergência encontrada foi de 4,6%, enquanto que entre as classes II de ambas as espécies foi encontrada uma divergência genética de 3,7%. Quando

analisada a divergência genética entre as sequências das classes I e II das duas espécies o valor encontrado foi de 68%.

Foram encontradas sequências do tipo TATA-like nos segmentos genômicos de ambas as espécies analisadas, não tendo sido encontradas, contudo, sequências do tipo microsatélite. As sequências foram blastadas no site do NCBI website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) e foi encontrada similaridade de 80% com o DNAr 5S de *Brycon*.

A realização de hibridação fluorescente *in situ* utilizando as sondas específicas de DNAr 5S da espécie *G. sylvius*, correspondentes aos segmentos da classe I com biotina e da classe II com digoxigenina, revelaram a marcação nos mesmos pares cromossômicos (Figura 2). Em *G. inaequilabiatus* ambas as classes I e II foram marcadas com biotina e hibridadas separadamente, detectando três pares cromossômicos para a classe I e cerca de quinze pares cromossômicos para a classe II (Figuras 3 e 4).

Discussão

Nesse estudo foram realizadas análises da estrutura do DNAr 5S de *G. sylvius* e *G. inaequilabiatus* a partir do DNA genômico total devido à interessante diferença encontrada nos padrões de dispersão deste segmento genômico nas duas espécies, quando realizada hibridação utilizando sondas específicas de DNAr 5s (Capítulo 1).

Quando realizada a amplificação do DNAr 5S de *G. sylvius* e *G. inaequilabiatus* por PCR foi possível detectar a existência de duas possíveis classes de segmentos para essa família gênica em ambas as espécies, sendo o fragmento menor identificado como Classe I e o fragmento maior como Classe II. A diferença observada entre as duas classes de DNAr 5S das espécies analisadas está relacionada à variabilidade de tamanho dos NTS, enquanto o gene 5S mostrou-se bastante conservado, com 120pb em ambas as espécies analisadas. Resultados similares foram encontrados em espécies de peixes do gênero *Leporinus*, no qual a análise da organização do DNAr 5S mostrou, para todas as espécies analisadas, a existência de duas classes componentes para esse gene ribossomal. Nestas espécies, o gene foi caracterizado por conter distintas sequências de NTS, denominadas NTS I com cerca de 200 pb e NTS II com cerca de 900pb, enquanto as sequências codificantes do gene 5S foram praticamente idênticas (Martins e Galetti, 2001). Em estudos realizado por Campo *et al.* (2009), análises da organização molecular do DNAr 5S em peixes do gênero *Merluccius* também apresentaram as regiões do gene altamente conservadas com 120 pb, enquanto o espaçador não transcrito apresentou variações em seu comprimento, sendo diferenciado pela presença ou ausência de

uma repetição simples de sequências. Diferenças no tamanho dos NTS foram também encontradas em outras espécies de peixes (Pendás *et al.*, 1995; Alves-Costa *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2010).

A complexa organização dessa família gênica em peixes é demonstrada pelos dados obtidos por Pinhal *et al.* (2009) analisando o DNAr 5S em tubarões do gênero *Rhizoprionodon*, também encontrando duas classes para esse segmento ribossomal com diferentes tamanhos em seus NTS. Entretanto, diferentemente dos dados comumente encontrados em peixes teleósteos, além da variação nos NTS, variações nucleotídicas consideráveis também foram identificadas no gene codificante 5S e entre as classes I e II de uma mesma espécie.

Os segmentos dos NTS, ao contrário da região transcrita do DNAr 5S que se apresenta conservada com 120 pb, são espaçadores não transcritos que não estão sob pressão seletiva, fazendo com que essas sequências sejam mais susceptíveis a eventos de mutação e, conseqüentemente, possuam uma extensiva variação. Dessa forma, estes segmentos do genoma parecem estar sujeitos a uma rápida evolução, o que os credenciam como ferramentas importantes para estudos da organização e dinâmica estrutural desta família multigênica, podendo ser utilizados como marcadores para rastrear eventos recentes de evolução em espécies próximas (Martins e Galetti, 2001; Campo *et al.*, 2009; Pinhal *et al.*, 2009). Apesar da ausência de forte pressão seletiva, também foi sugerido que estas regiões poderiam ter alguma influência sobre o nível de transcrição dos genes DNAr 5S (Martins e Galetti, 2001).

Embora os NTS não apresentem aparentemente funções específicas no genoma, os elementos TATA-like identificados nas sequências das espécies analisadas no presente trabalho estão comprovadamente associados à regulação da expressão gênica do DNAr 5S, como descrito ocorrer em mamíferos (Nederby-Nielsen *et al.*, 1993). As sequências dos fragmentos analisados revelaram, após blastadas, uma similaridade de 80% com o DNAr 5S de *Brycon*, espécie pertencente a um grupo taxonomicamente distinto. Embora tal fato possa ser decorrente da escassez de dados sobre sequências de DNAr 5S em peixes Neotropicais, não pode ser descartada a hipótese de existir tal identidade, dado o caráter conservado destas regiões genômicas. Portanto, têm-se indícios de que as duas possíveis classes analisadas do DNAr 5S em *G. sylvius* e *G. inaequilabiatus* se tratariam de genes funcionais, corroborando dados encontrados também em peixes do gênero *Gymnotus* (Claro, 2008) e em outras espécies de peixes Neotropicais (Martins e Galetti, 2001; Cruz, 2009).

O sequenciamento do gene ribossômico 5S junto ao seu NTS permitiu realizar análises de divergência genética. Uma primeira análise realizada entre as classes I e II de *G. sylvius*

com estas mesmas sequências de *G. inaequilabiatus* não revelou valores de divergência genética relevantes (Tabela 1). Entretanto, uma segunda análise comparando as sequências consenso das duas classes de *G. sylvius* e *G. inaequilabiatus* identificou valores de divergência genética de 68% entre as duas espécies. Este valor, considerado relevante, foi semelhante ao que comumente ocorre nos NTS de cada espécie, como já descrito anteriormente para outras espécies de peixes (Martins e Wasko, 2004; Fujiwara *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2010). Contudo, não coincide com aqueles encontrados em análises parciais de sequências do DNAr 5S em outras comparações de duas espécies de *Gymnotus* (*G. sylvius* e *G. cf. carapo*), conforme descrito por Claro (2008). Poderia ser considerado ainda que tal diferença genética decorreria da alta variabilidade que caracteriza estas regiões genômicas, determinando divergências entre espécies distintas.

A utilização da hibridação utilizando sondas específicas para os segmentos componentes das classes do gene ribossomal 5S em *G. sylvius* revelou que ambas as classes se apresentam em sintenia no par cromossômico número quatro. Por outro lado, em *G. inaequilabiatus* enquanto cerca de quinze pares cromossômicos foram identificados para a classe II, a classe I apresentou marcações em três pares cromossômicos. A co-localização cromossômica de duas classes de DNAr 5S também já foi documentada em raias de água doce (Cruz, 2009). Neste caso, experimentos de hibridação *in situ* utilizando sondas específicas de duas classes de DNAr 5S de *Potamotrygon motoro* revelaram a localização das regiões de DNAr 5S nos cromossomos, demonstrando que essas duas classes localizam-se em sintenia nos cromossomos do par 2, enquanto uma delas se apresentou em outro par cromossômico. Segundo a autora, tais resultados refletem a dinâmica desta região cromossômica e fornecem elementos que podem auxiliar na compreensão da organização e distribuição desta família de genes repetitivos, bem como nos processos envolvidos na diversificação e evolução das espécies do grupo.

O aspecto não conservado do padrão de dispersão do DNAr 5S entre as duas espécies de *Gymnotus* analisadas poderia estar associado a rearranjos cromossômicos ocorridos, que podem ter levado à perda de unidades repetidas deste gene em *G. sylvius*, espécie com menor número cromossômico ($2n=40$) em relação a *G. inaequilabiatus* ($2n=54$) (Claro, 2008; Claro e Almeida-Toledo 2010, Capítulo 1). Por outro lado, a dispersão diferencial poderia estar relacionada ao padrão de distribuição de heterocromatina nestas espécies. Enquanto *G. inaequilabiatus* apresenta grandes blocos heterocromáticos aparentemente coincidentes com os sítios múltiplos de DNAr 5S, *G. sylvius* é caracterizado pela ausência desses blocos. Assim, por serem regiões consideradas propícias a quebras cromossômicas, os grandes sítios

heterocromáticos presentes em *G. inaequilabiatus* poderiam ter facilitado a dispersão desta sequência gênica pelos cromossomos nesta espécie (Capítulo 1). Ainda, de acordo com Cioffi *et al.* (2010), elementos transponíveis do tipo retrotransposon REX₃ podem estar associados à distribuição e dispersão do DNAr 5S em representantes do gênero *Erythrinus*, evidenciando que a associação entre este DNA ribossômico e alguns elementos transponíveis podem ter sido determinantes para a divergência evolutiva dentro deste gênero.

Os possíveis mecanismos de dispersão gênica atuantes em *G. inaequilabiatus* estão de alguma forma relacionados intimamente à classe II do DNAr 5S, uma vez que a hibridação utilizando sondas da classe I evidenciou poucos pares marcados quando comparados à classe II nessa espécie. Neste sentido, investigações mais detalhadas sobre a estrutura molecular e dinâmica funcional destas sequências, bem como uma análise mais ampla envolvendo outros marcadores e uma maior amostragem dos representantes do gênero *Gymnotus* certamente trarão valiosas informações sobre a distribuição e os possíveis papéis destas sequências ribossômicas na diferenciação cariotípica deste grupo de peixes e no seu processo evolutivo.

Referências Bibliográficas

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

Tabela 1 – Análise da distância genética entre os clones da Classe I e os clones da Classe II; AT – porcentagem de bases AT encontrada; PB - número de bases; DG – divergência genética.

DNAr 5S	Classe I			Classe II		
	PB	DG	AT	PB	DG	AT
<i>G. sylvius</i>	427	1,7%	59,1%	600	1,0%	59,6%
<i>G. inaequilabiatus</i>	440	1,0%	58,7%	640	1,8%	59,7%

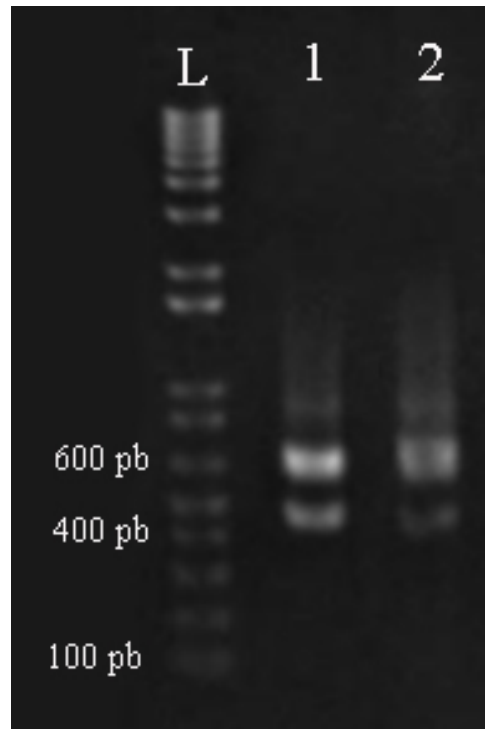


Figura 1: Amplificação do DNAr 5S. Em (1) *G. sylvius*, (2) *G. inaequilabiatus* e (L) marcador de peso molecular 1Kb (Invitrogen Life Technologies) visualizados em gel de agarose 1%.



Figura 2: Cariótipo de *G. sylvius* após hibridação fluorescente *in situ* com sonda de DNAr 5S classe I-verde (cerca de 450 pb) e classe II-vermelho (cerca de 650 pb). Resultado de *double FISH* demonstrando marcação com as duas sondas simultaneamente.

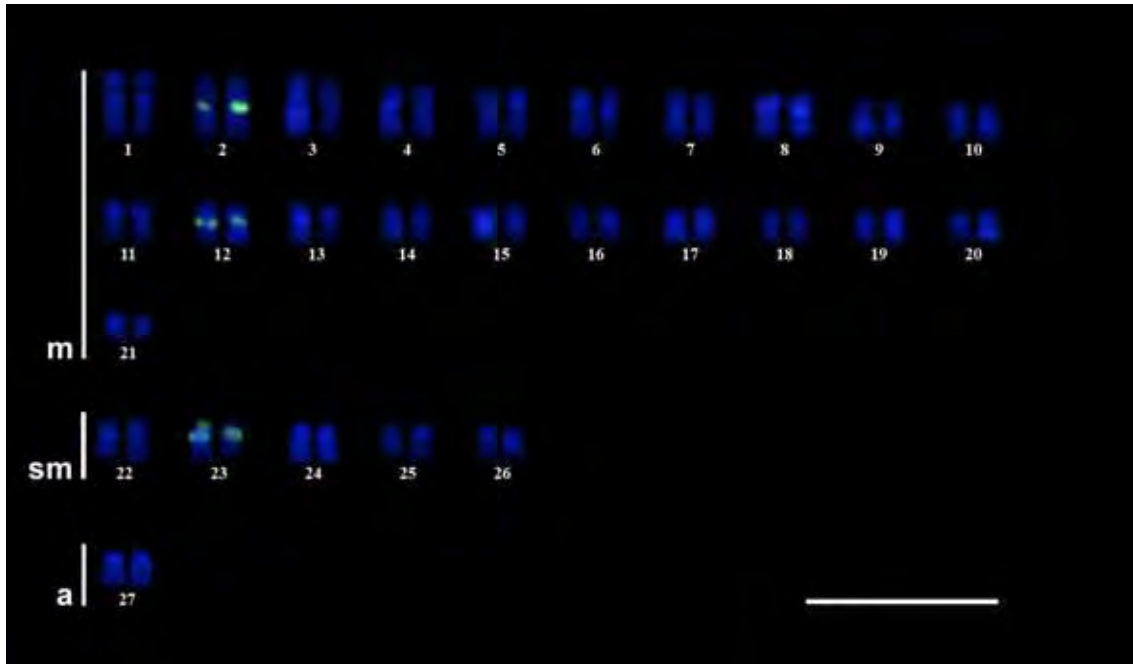


Figura 3: Cariótipo de *Gymnotus inaequilabiatus* após hibridação fluorescente *in situ* com sonda de DNAr 5S classe I (cerca de 450 pb). A barra equivale a 10 μ m.

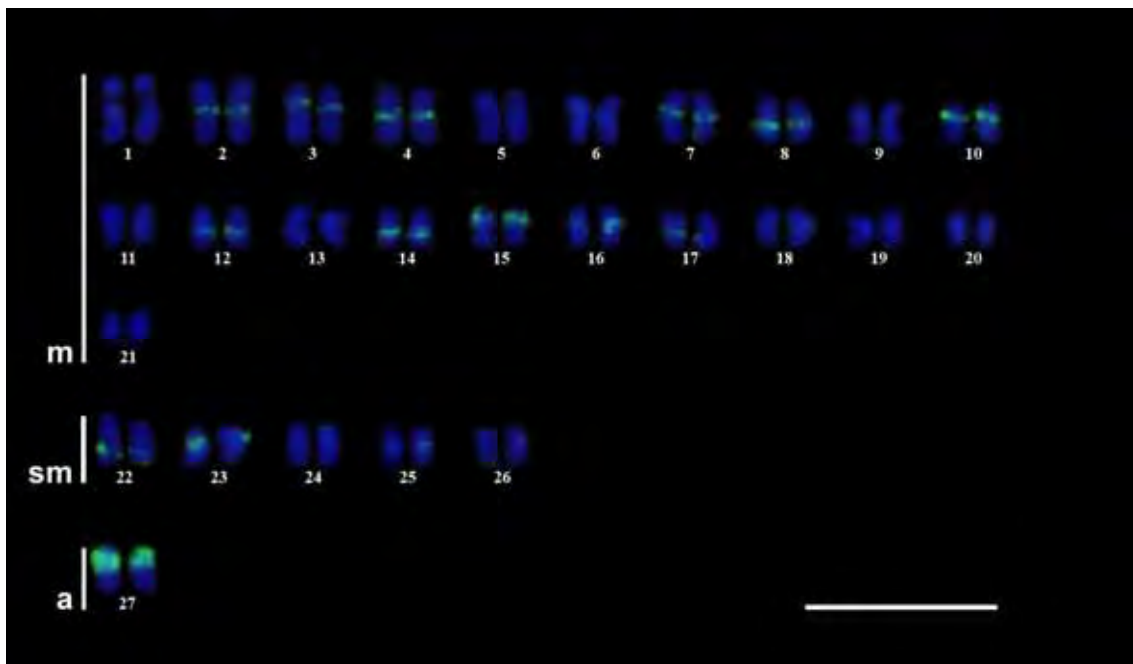


Figura 4: Cariótipo de *Gymnotus inaequilabiatus* após hibridação fluorescente *in situ* com sonda de DNAr 5S classe II (cerca de 650 pb). A barra equivale a 10 μ m.

```

+1
5S I IGS ACGCCCGATCTCGTCCGATCTCGGAAGCTAAGCAGGGTCGGGCTGGTTA [ 50]
5S I GS ..... [ 50]

5S I IGS GTACTTGGATGGGAGACCGCCTGGGAATACCAGGTGCTGTAAGCTTTTCA [100]
5S I GS .....AT [100]

+120
5S I IGS TATTTACACTTTTCTTACTATTTTGCTCCTTTATTTTTTTTATTTCT [150]
5S I GS G.A.AA.TGTAG...GT.AGT.T..CATT.TTC...GCG.C.AA.AGCA. [150]

5S I IGS TTCATTCATGCACTCACTCATGCACTCATTTCATTATTTTCGTTCTC [200]
5S I GS ..GC.CT.A.TT...TT...-A...-...T...A--.....A...C..A [200]

5S I IGS CTTATTTTTTTTTTTTATATAAAAAAAGAAATAGCCCTCCATGCACTTGC [250]
5S I GS T..CA.....C.....T..T...CATG....-...TA... [250]

5S I IGS ATACATCTAACAAAACCTTGCGATTGTATGTGGAGCGCTGGGATTGTCCT [300]
5S I GS .GCG.ATA..AT..G.....A.AG.-A.AA.ATAT....-..GA.AA. [300]

5S I IGS CTGTTTGTTTACGGAACGTATACATT.AATTATCTCCCCTTACGTAGTTG [350]
5S I GS .....C.GTAA..A.....AG--..G...A.CTT.A.A.AT.GTC.. [350]

5S I IGS GAAGAAGCAACCTTACCTTTTCTCTGCTATAGCTCCTGGATAATATATCCC [400]
5S I GS T.C....T.GG...GT..AG...GC....CTC...T.AA...GCCT.A.. [400]

5S I IGS ATACAATAAGCTTAAATTGATTTTAAAAACACATCTGCCTGCATACTGC [450]
5S I GS TC.G.GC.G..----.CC.C.--.CG.....C.A.....----- [450]

5S I IGS TGAGAGGGATGTGGCGTTAAATGGAATGAAAAGGAAGGAAAACACCGCA [500]
5S I GS ----- [500]

5S I IGS CACGAACTTTCTATCAAATGTTATCCGTCCGAGAAGCTACGGTGTGCTTT [550]
5S I GS ----- [550]

5S I IGS AAAAGCTGTGTTTTTCTCACAGCCAAATGCTTACGGCCATACCAGCCTGC [600]
5S I GS ----- [600]

```

Figura 5: Sequências consenso de DNAr 5S Classe I (5S I) e Classe II (5S II) alinhadas de *Gymnotus sylvius*. A região de transcrição se inicia no +1 e termina no +120 (em cinza). As sequências TATA-like estão contornadas por retângulos. Os pontos indicam nucleotídeos idênticos e gaps estão indicados pelos traços.

```

+1
5S I IGI ACGCCCGATCTCGTCCGATCTCGGAAGCTAAGCAGGTTTGGGCCTGGTTA [ 50]
5S I GI ..... [ 50]

5S I IGI GTACTTGGATGGGAGACCGCCTGGGAATACCAGGTGCTGTAAGCTTTTCA [100]
5S I GI .....T [100]

+120
5S I IGI TATTTGACACTTTTCTCTTACTATTTGCTCCTTTATT---TTTTTTATT [150]
5S I GI G...AA.T..A...AT.CG-----TTT..C...---...C...GC [150]

5S I IGI TCTTTCATTTCATGCCTCACTCACTCACTCACTCACT-----CACTCA----TG [200]
5S I GI GTC.A..AG...TTG...--.A....C...TTC-----...A.----- [200]

5S I IGI CACTCATCCATTTCATTCACTCATTTCATTTCATTTCATTTCGTTTCCTTATT [250]
5S I GI .G.....A-..AA.A..GTCT.A.TGCA..G..TA.GG.ACA...ACGC. [250]

5S I IGI ATTA|TTTTTTTTTT|TATA|AAAAAGAACTTTGCCCTTCATGCACTTGCATC [300]
5S I GI .A.GCG.A.G..CAG..T.TGG..CG.C.AAA---AT.A..G...-.... [300]

5S I IGI CATCTAACGAAACCTTGCGATTGTATGTGGAGC-GCTGGGATTGTCCTCT [350]
5S I GI T.G.....T.T...AT.....A.T..A...TA..A.G...AACTA [350]

5S I IGI GTTTGTTTACGGAACG|TATA|CATTFACTTATCTCCCCCTTACGTAGTTGG [400]
5S I GI .C.A....C.A...AT.G.CT..AC.-.....GG.-----.....C.- [400]

5S I IGI AAGAAGCAACCTACCTTTTCTCTGCT|TATA|GCTCCTGGATA-CTTATCCCA [450]
5S I GI .GTCT..TCTA.T...C..AAA.A.CC..AT.T...A.C.G.C.....T [450]

5S I IGI TACAATAAGCTTATTCTGATT|TTAA|AAAACACATCTGCCTCCATATTGCT [500]
5S I GI ...GGCC.TACC.GC...----- [500]

5S I IGI GAGAGGGATGTGGCGTAAAATGGAATGAAAAGGAAGGAAAACACCGCAC [550]
5S I GI ----- [550]

5S I IGI ACGAACTTTCTATCAAATGTTTTCCGTCGAGAAGCCACGGTGTGCTTTA [600]
5S I GI ----- [600]

5S I IGI AAAGCTGTGCTTTTCTCACATTTCATTGCTTACGGCCATACCAGCCTG [650]
5S I GI ----- [650]

```

Figura 6: Sequências consenso de DNAr 5S Classe I (5S I) e Classe II (5S II) alinhadas de *Gymnotus inaequilabius*. A região de transcrição se inicia no +1 e termina no +120 (em cinza). As sequências TATA-like estão contornadas por retângulos. Os pontos indicam nucleotídeos idênticos e gaps estão indicados pelos traços.

```

5S GS -----CAGGCUGGUAUGGCC---GUAA [ 50 ]
5S GI ACGCCCGAUCUCGUCGCGAUCUCGGAAGCUAA.....U.....CUG..U. [ 50 ]

5S GS GCGAUUGGCUGUGAGAAAAACACAGCUUUUAAAAGCACACCGUAGCUUCUC [ 100 ]
5S GI .UAC....A..G....CCGC.UGG.AA.ACC.G.UG.UGUA-.....U.. [ 100 ]

5S GS GGACGGAUAAACAUUUGAUAGAAAGUUCGUGUGCGGUGUUUUCCUCCUUU [ 150 ]
5S GI AU.UUUGAC..U...CUCUU.CUA...UGC.C.UU.A....UU..AU..C [ 150 ]

5S GS UUCAUCCAUUUAAACGCCACAUCCUCUCAGCAGU-AUGCAGGCAGAUGU [ 200 ]
5S GI ..UCA.U...GC.CUCA.U..CU.ACUCACU..C.C.....CU..UCCA. [ 200 ]

5S GS GUUUUUUAAAAUCAUAUUAAGCUUAUUGUAUGGGAUAAUUAUCCAGGAGC [ 250 ]
5S GI UCA..CACUC..UCAU..C.UUA.U...UCUCCU..U.AUUUAUUUUUU [ 250 ]

5S GS UAUAGCAGAGAAAAGGUAGGUUGCUUCUCCAACUACGUAAGGGGGAGAU [ 300 ]
5S GI .U.UAU.A....G..A.UU.CC-....A....C..G.A..C.UCUA.C.. [ 300 ]

5S GS AAUUAAAUGUAUACGUUCCGUAAACAAACAGAGGACAAUCCCAGCGCUCC [ 350 ]
5S GI ..CCUUGCG.U.GUA...G.AGCG.UGG..UU.UC.UC..UUU.UUU... [ 350 ]

5S GS ACAUACAAUCGCAAGGUUUUGUUAGAUGUAUGCAAGUGCAUGAAGGG--C [ 400 ]
5S GI GA..G..U..AUUUA..A.C.CCCCC...C.U.GU....A....CAAC. [ 400 ]

5S GS AAUUUUCUUUUUUGUAUAAAAAAAAAAAAAAAAUAA---GGAGAACGAAUA [ 450 ]
5S GI ...C....C.C.G.....GCUCCU...U.....UCCCAU.C..U..GC.. [ 450 ]

5S GS A---UGAAAUGAAUGAGUGCAUGAGUGAGUGCAUGAAUGAAAGAAUAAA [ 500 ]
5S GI .AUA....UUU..AA.ACA...CU.CC.C.AU...GC...GA.GG...UG [ 500 ]

5S GS AAAAAAUAAAGGAGCAAAAUAGUAAGAGAAAAGUGUGAAAUAUGAAAAGC [ 550 ]
5S GI GCGUU.-..U...AUG.....G...G--....CACCGC.C.CG..---. [ 550 ]

5S GS UUACAGCACCUUGUAUCCAGGCGGUCUCCCAUCCAAGUACUAACCAGG [ 600 ]
5S GI ..U.--U...AAA.G.....C.U.C.AGAAG.CA.GGU..G..UUA... [ 600 ]

5S GS CCCGACCCUGCUUAGUUCCGAGAUCGGGGAAAU-CGGGCGUC [ 650 ]
5S GI .UGU..UU.U..C.CA...AAUUGCUIA...CC..A.C.....G [ 650 ]

```

Figura 7: Sequências consenso e alinhadas de ambas as Classe I (5S I) e Classe II (5S II) do DNAr 5S de *Gymnotus sylvius* e *Gymnotus inaequilabiatu*s. Os pontos indicam nucleotídeos idênticos e gaps estão indicados pelos traços.

Capítulo 3

Marcação cromossômica das regiões nucleolares por pintura cromossômica e por sonda de DNAr 18S em espécies de *Gymnotus*

Resumo

Estudos realizados sobre as regiões organizadoras de nucléolo (RONs) em espécies do gênero *Gymnotus* revelaram sua característica conservada com relação à sua localização e apesar de alguns trabalhos relatarem extensos polimorfismos deste segmento genômico em representantes deste grupo, a maioria das espécies analisadas possui apenas um par cromossômico portador do sítio responsável pela produção de DNA ribossomal 45S. No entanto, os resultados obtidos somente pela impregnação com nitrato de Prata não permitem definir se o par cromossômico detectado é único, devido ao fato desta técnica detectar apenas RONs que permanecem ativas na intérfase precedente. Neste sentido, a hibridação fluorescente *in situ* (FISH) com sonda de DNAr 18S, que tem sido comumente utilizada em peixes, tem se mostrado muito eficiente também para as espécies deste gênero, confirmando e ampliando resultados obtidos pela impregnação por Prata e pela coloração com o fluorocromo Cromomicina A₃. Considerando a importância dos sítios de DNAr como marcadores citogenéticos, o presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de analisar a distribuição das RONs em três espécies do gênero *Gymnotus* (*G. sylvius*, *G. inaequilabiatus* e *G. cf. carapo*) pela impregnação por nitrato de Prata, CMA₃ e FISH, com sondas para o DNAr 18S e para o cromossomo portador das RONs, com o uso da técnica de pintura cromossômica, obtida por FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting), a partir dos cromossomos da espécie *Gymnotus cf. carapo* (citótipo 2n=42) da bacia Amazônica.

Introdução

As regiões organizadoras de nucléolo (RONs), formadas por genes de RNA ribossomal 5,8S, 18S e 28S têm sido amplamente estudadas em peixes, pois se caracterizam como importantes marcadores citogenéticos, permitindo análises e inferências sobre a evolução cromossômica em diferentes grupos (Howell e Black, 1980; Santi-Rampazzo *et al.*, 2008).

A impregnação com nitrato de Prata tem sido a técnica mais utilizada em estudos de localização das RONs, embora esta metodologia evidencie somente RONs transcricionalmente ativas (Howell e Black, 1980). Outra técnica utilizada para evidenciar estas regiões cromossômicas é a coloração com o fluorocromo CMA₃, que permite detectar sítios ribossomais ativos e inativos (Gold e Amemiya, 1986). Entretanto, estudos com peixes neotropicais mostraram que a CMA₃ pode marcar também regiões heterocromáticas não relacionadas com as RONs (Artoni *et al.*, 1999), regiões essas preferencialmente ricas em bases GC, como visto em representantes do gênero *Astyanax* (Domingues *et al.*, 2007). Considerando os resultados comumente obtidos pela impregnação por Prata e a marcação pelo fluorocromo CMA₃, a maneira mais eficaz para mapear fisicamente as RONs é através da hibridação fluorescente *in situ* (FISH) utilizando sondas específicas para a sequência do DNAr 45S. Dentre os genes da família do DNAr 45S, o 18S tem sido mais comumente utilizado em peixes, confirmando e ampliando resultados obtidos pela impregnação por nitrato de Prata e CMA₃ (Oliveira *et al.*, 2007). O estudo dessa região cromossômica em peixes permite analisar alguns aspectos da distribuição, número e polimorfismos existentes em diferentes grupos (Almeida-Toledo *et al.*, 1985).

Entre as espécies de peixes representantes do gênero *Gymnotus*, que apresentam ampla distribuição geográfica, os dados citogenéticos evidenciam a ocorrência de uma ampla diversidade cariotípica, com o número de cromossomos variando desde 34 até 54 em diferentes espécies (Fernandes-Matioli *et al.*, 1998a; Milhomem, 2010; Capítulo 1). O estudo das RONs em representantes do gênero *Gymnotus* tem mostrado que esta região é conservada nas diferentes espécies, caracterizando-se na maioria delas como um sistema simples, apresentando variabilidade somente no que se refere à localização nos cromossomos, podendo também ser encontrada em diferentes pares (Fernandes-Matioli *et al.*, 1997; Capítulo 1). Por outro lado, casos de RONs múltiplas já foram relatados em duas espécies, *Gymnotus pantanal* (Fernandes-Matioli *et al.*, 2005) e *G. jonasii* (Milhomem, 2010).

Na espécie *G. sylvius* as RONS estão localizadas em posição terminal nos cromossomos do par 17 e nas espécies *G. inaequilabiatus* e *G. cf. carapo* os sítios de DNAr também ocupam posição intersticial, mas nos cromossomos do par número 1 (Capítulo 1). Em *G. cf. carapo* da bacia Amazônica, as RONS estão localizadas no par número 20 (Milhomem *et al.*, 2008). Pela metodologia comumente utilizada ainda não foi possível determinar uma identidade comum para este par de homólogos nestas espécies de Gymnotiformes. Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo verificar se o par cromossômico portador dos sítios de DNAr em *G. sylvius*, *G. inaequilabiatus* e *G. cf. carapo* (presente estudo) e *G. cf. carapo* (Nagamachi *et al.*, 2010) manteve-se conservado durante a história evolutiva do grupo.

Materiais e Métodos

Foram analisados citogeneticamente indivíduos de três espécies de *Gymnotus*, (*G. sylvius*, *G. inaequilabiatus* e *G. cf. carapo*) de componentes de duas diferentes bacias hidrográficas, sendo *G. sylvius* e *G. inaequilabiatus* provenientes do Rio Pardo, cachoeira Véu da Noiva, Botucatu - SP, da bacia do Rio Paranapanema e *G. cf. carapo* proveniente do Rio Miranda, Passo do Lontra - MS, bacia do Rio Paraguai. Os exemplares analisados foram fixados em formol a 10%, conservados em álcool 70% e, após identificação, foram depositados no Museu do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (LBP) da UNESP de Botucatu, São Paulo, Brasil.

As preparações de cromossomos mitóticos foram realizadas de acordo com o protocolo utilizado por Foresti *et al.* (1993), com algumas adaptações. A marcação das RONS pelo nitrato de Prata seguiu a técnica proposta por Howell e Black (1980). A marcação pelo fluorocromo CMA₃ seguiu o procedimento estabelecido por Schweizer (1976). O mapeamento dos sítios de DNAr 18S nos cromossomos metafásicos foi realizado com a aplicação da técnica de hibridação fluorescente *in situ* (FISH), de acordo com o procedimento estabelecido por Pinkel *et al.* (1986), com modificações. Foi utilizada a sonda de DNAr 18S obtida por PCR (Polymerase Chain Reaction), a partir do DNA total de *G. cf. carapo* e marcada com Digoxigenina-11-dUTP (Roche Applied Science), sendo a detecção do sinal de hibridação realizada usando anti-digoxigenina-rodamina (Roche Applied Science).

A sonda do cromossomo portador das RONS de *G. carapo* (citótipo 2n=42) foi obtida por Fluorescence Activated Cell Sorting (Nagamachi *et al.*, 2010) e cedida pelos autores. A aplicação da técnica de hibridação utilizando esta sonda e a detecção de sua marcação foram

feitas segundo o protocolo descrito por Yang *et al.* (1995), com modificações propostas em Nagamachi *et al.* (2010).

Resultados

A impregnação pelo nitrato de Prata evidenciou que todas as espécies de *Gymnotus* analisadas possuem RONS simples (Figuras 1a, 2a e 3a). Os exemplares de *G. sylvius* apresentaram duas marcações em posição terminal nos braços curtos dos cromossomos do par 17, enquanto que os representantes de *G. inaequilabiatus* e *G. cf. carapo* apresentaram seus sítios ribossomais em posição intersticial no braço curto dos cromossomos do par número 1. A ocorrência de polimorfismo no tamanho das RONS foi observada com frequência nos cromossomos portadores, em todas as espécies analisadas (Figuras 1, 2 e 3). A coloração com o fluorocromo CMA₃ em *G. inaequilabiatus* e *G. cf. carapo* marcou somente o par da RONS (Figuras 2b e 3b) enquanto que em *G. sylvius* apresentaram dois pares cromossômicos marcados, além do par portador da RONS (Figuras 1b).

A aplicação da técnica de hibridação fluorescente usando a sonda de DNAr 18S confirmou os resultados de marcação obtidos pelo nitrato de Prata (Figuras 1c, 2c e 3c). A sonda total do cromossomo portador das RONS hibridizou em apenas um par de cromossomos nas três espécies analisadas (Figuras 1d, 2d e 3d), confirmando o caráter conservado de marcação neste par.

Discussão

Para o grupo dos Gymnotiformes, foram descritas RONS simples na maioria dos gêneros investigados citogeneticamente. Foresti *et al.* (1981) detectaram essa condição estudando RONS em cinco espécies desta ordem (*G. carapo*, *Apteronotus albifrons*, *Sternopygus macrurus*, *Eigenmannia virescens* e *Eigenmannia* sp.). Por outro lado, também já foram relatados casos em que as RONS apresentam-se de forma múltipla, como em *Eigenmannia* sp. (Almeida-Toledo *et al.*, 1996), *G. pantanal* (Fernandes-Matioli *et al.*, 2005) e *G. jonasi* (Milhomem, 2010).

A identificação das RONS pela impregnação por nitrato de Prata e por hibridação com a sonda de DNAr 18S revelou marcação coincidente em apenas um par cromossômico nas três espécies analisadas no presente trabalho, caracterizando-se como um sistema simples de RONS e corroborando dados obtidos anteriormente (Foresti *et al.*, 1981; Fernandes-Matioli *et*

al., 1997). Além disso, foi possível observar a existência de polimorfismo no tamanho dos sítios das RONS entre os cromossomos homólogos nas preparações destas espécies, situação recorrente em peixes e muito comum no gênero *Gymnotus* (Foresti *et al.*, 1981; Fernandes-Matioli *et al.*, 1997; Claro, 2008; Capítulo 1). Tal polimorfismo geralmente ocorre devido a duplicações das sequências de DNA ribossomal, provavelmente causadas por um crossing-over desigual durante a meiose (Almeida-Toledo *et al.*, 2000a). Considera-se, por outro lado, que a variação de tamanho observada neste segmento genômico poderia também ser decorrente de alterações cromossômicas como inversões, detectadas em outras espécies da ordem Gymnotiformes e evidenciadas em uma população de *G. carapo* (Foresti *et al.*, 1984).

Os tratamentos com CMA₃ revelaram, além das marcações normais nos sítios ribossomais e evidenciados pelos outros marcadores, também marcações adicionais em outras regiões cromossômicas, conforme observado em *G. sylvius* (Figura 1b), sugerindo que esses segmentos marcados sejam ricos em bases GC e independentem de qualquer relação com as RONS, como já foi descrito ocorrer em outras espécies de peixes Neotropicais (Artoni *et al.*, 1999). Diferentemente, *G. inaequilabiatus* e em *G. cf. carapo* (Figura 2b e 3b) tiveram apenas as regiões correspondentes às RONS marcadas por este fluorocromo.

Considerando a extensa variabilidade cariotípica do gênero *Gymnotus*, foi investigada a possibilidade de que diferentes pares poderiam ser portadores das RONS nas diferentes espécies, conforme indicado em estudos anteriores (Fernandes-Matioli *et al.*, 1997; Fernandes-Matioli *et al.*, 1998b; Milhomem, 2010, Capítulo 1). Assim, com a aplicação da técnica de hibridação utilizando como sonda o cromossomo total portador da RON de *G. carapo* (2n=42) proveniente da bacia Amazônica, era de se esperar que houvesse marcação em outros pares cromossômicos nas espécies do presente estudo, uma vez que foi verificado que as RONS se localizam no par 17 em *G. sylvius* e no par 1 em *G. cf. carapo* e *G. inaequilabiatus*, enquanto são localizadas no par 20 em *G. carapo* da bacia Amazônica, espécie da qual foi isolado o marcador. Ao contrário do esperado, os resultados mostram que este cromossomo manteve sua localização aparentemente conservada nas diferentes espécies estudadas neste trabalho.

Apesar da diferença significativa encontrada na macro e microestrutura cariotípica em representantes do gênero *Gymnotus* (Capítulos 1 e 2), o cromossomo portador das RONS parece ser conservado entre as diferentes espécies, tendo sido observadas variações apenas na posição do sítio correspondente ao DNAr 18S no mesmo cromossomo. Essa hipótese é reforçada por observações de Milhomem (2010) em estudos realizados com as RONS de diferentes espécies de *Gymnotus*, que aponta para a existência de RONS múltiplas em uma

única espécie, *G. jonasi*. Quando aplicada a técnica de hibridação com a mesma sonda utilizada no presente trabalho e com a sonda de DNAr 18S, foi observado que apenas a metade distal de um par de cromossomos acrocêntricos apresentava pintura, além de marcações de sítios de 18S em outros pares cromossômicos, sugerindo que os cromossomos originalmente portadores das RONS em *G. carapo* estão associados a outros cromossomos em *G. jonasi*, em rearranjos do tipo fusão *in tandem* ou translocação. Além disso, a ausência de sítios 18S neste cromossomo sugere uma possível reorganização dos sítios de DNAr no cariótipo desta espécie. Os dados obtidos confirmam os resultados de Milhomem (2010), reforçando a característica conservadora do par portador das RONS nestas espécies.

Referências

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

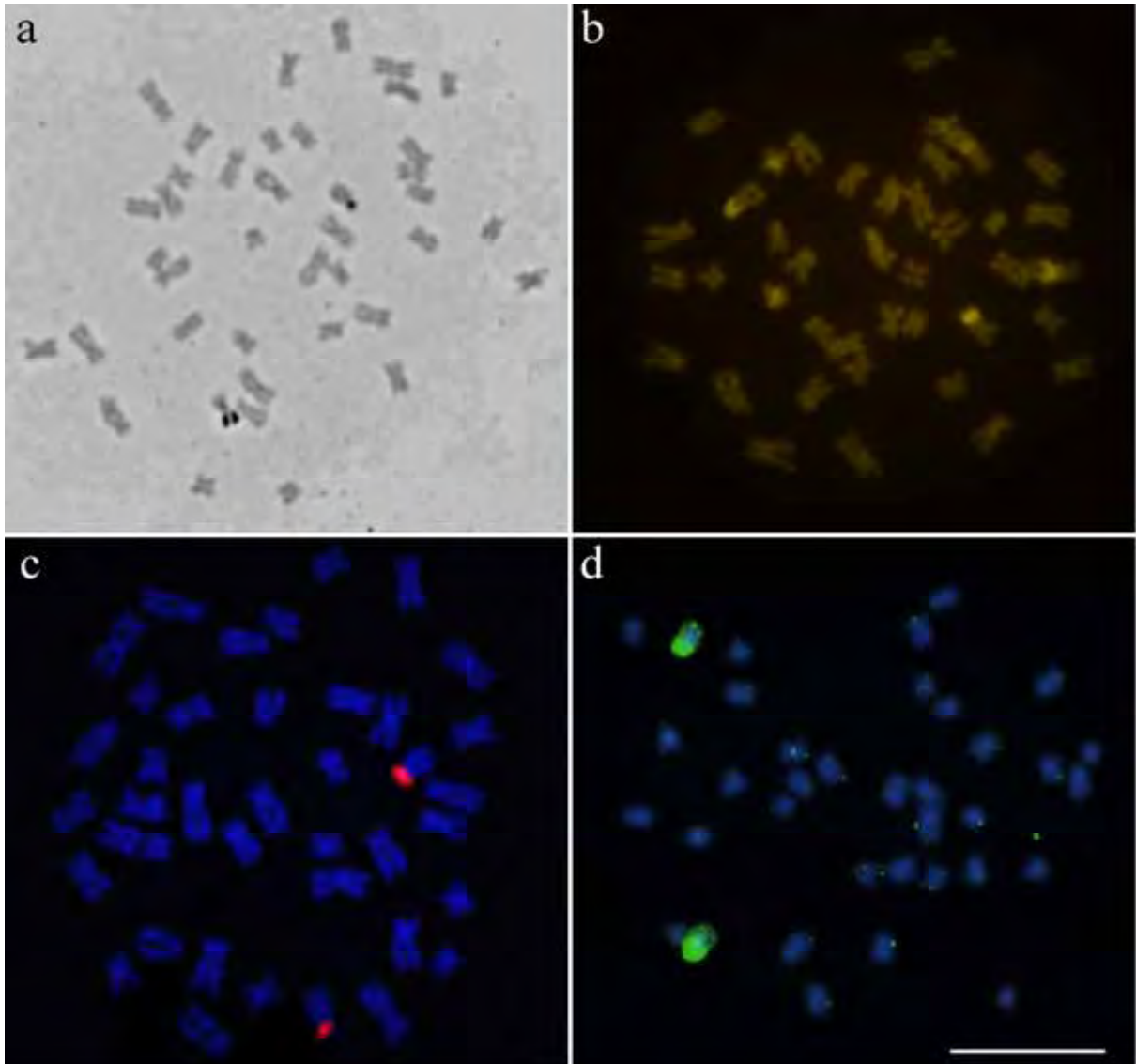


Figura 1: Metáfases de exemplar de *G. sylvius*. Em a impregnação por nitrato de Prata, em b coloração com o fluorocromo CMA₃, em c FISH com sonda de DNAr 18S e em d marcação com sonda total do cromossomo portador das RONS. A barra equivale 10µm.

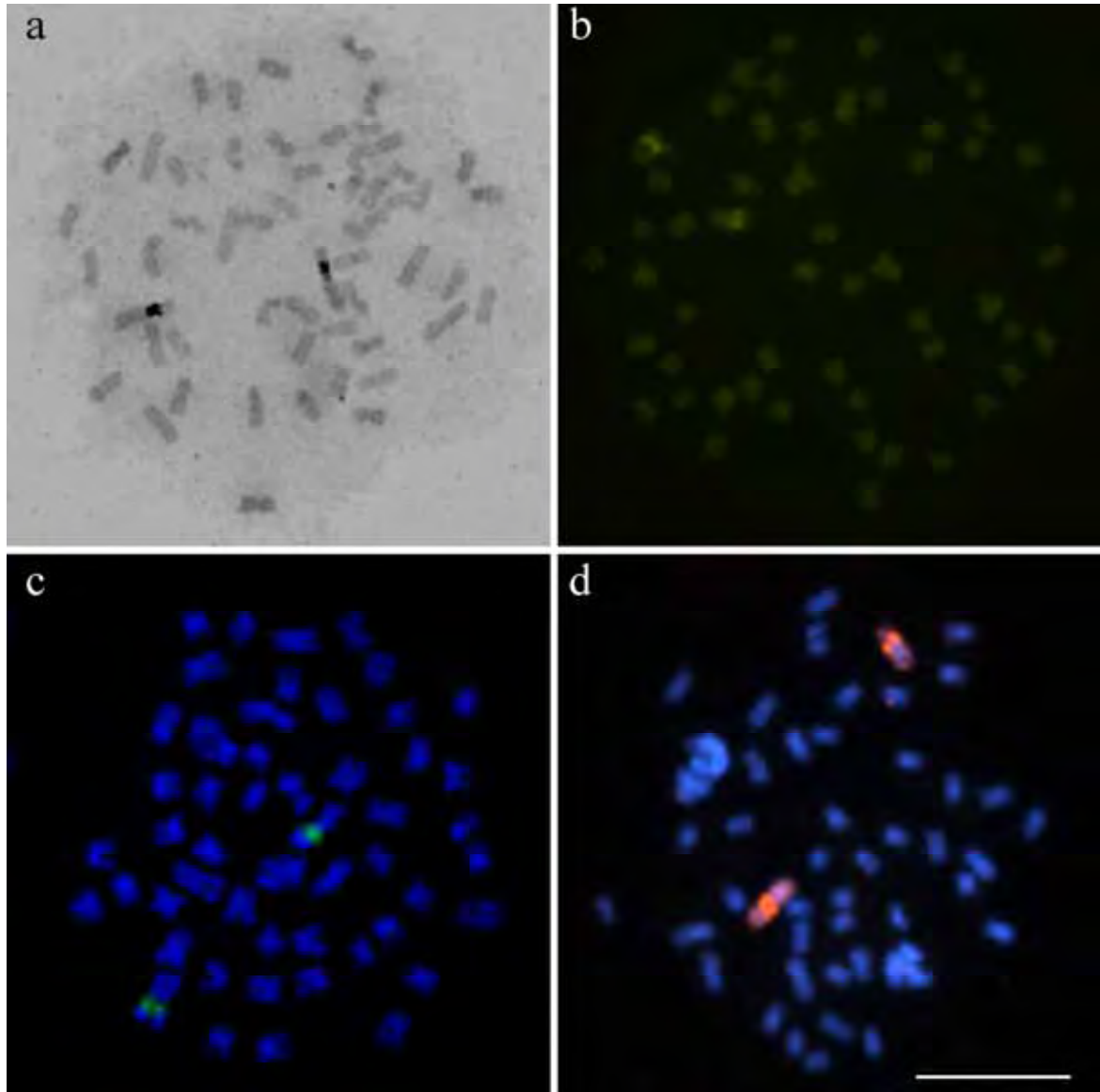


Figura 2: Metáfases de exemplar de *G. inaequilabiatus*. Em a impregnação por nitrato de Prata, em b coloração com o fluorocromo CMA₃, em c, FISH com sonda de DNAr 18S e em d marcação com sonda total do cromossomo portador das RONS. A barra equivale 10 μ m.

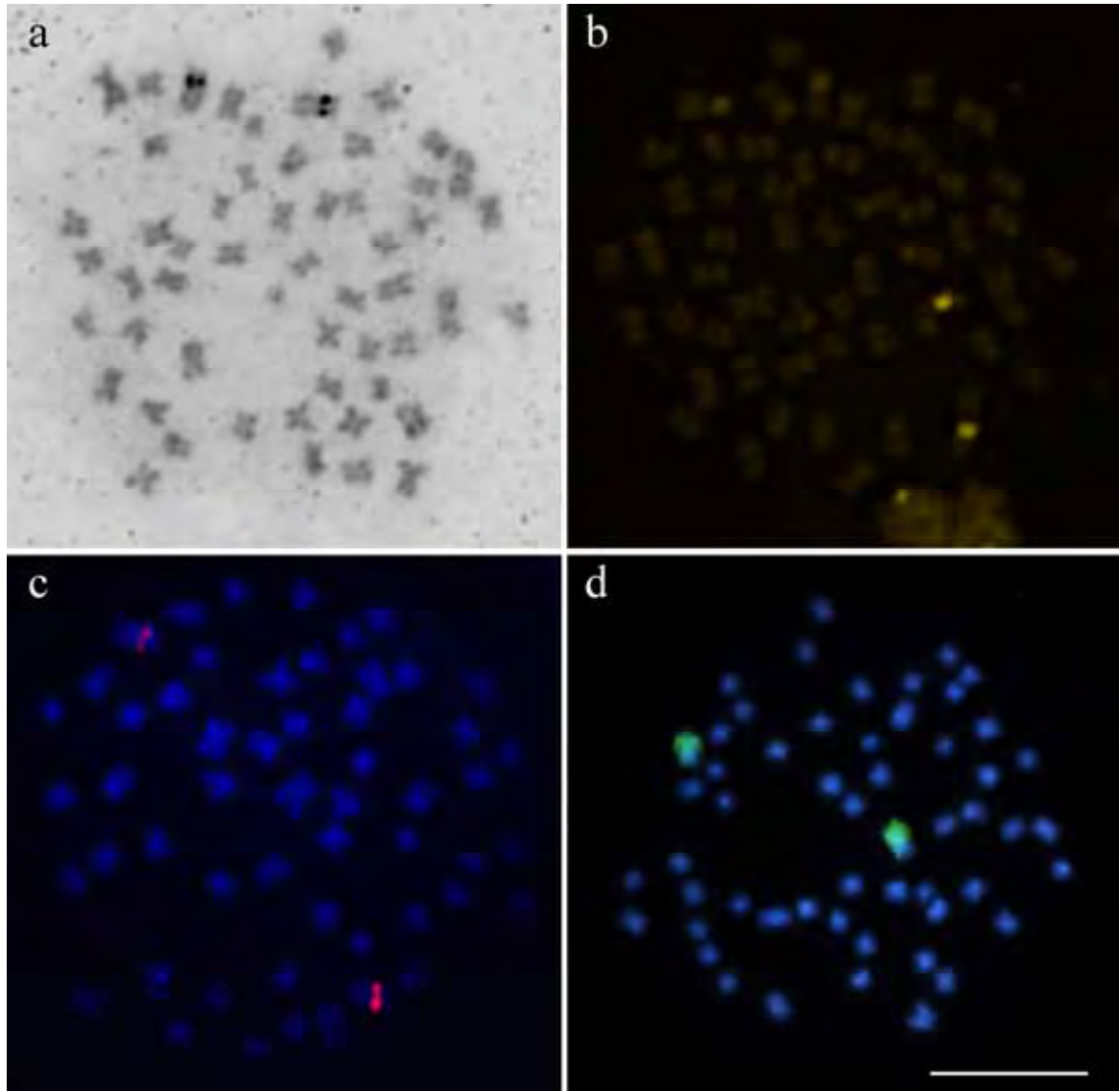


Figura 3: Metáfases de exemplar de *G. cf. carapo*. Em a impregnação por nitrato de Prata, em b coloração com o fluorocromo CMA₃, em c FISH com sonda de DNAr 18S e em d marcação com sonda total do cromossomo portador das RONS. A barra equivale 10µm.

5 Considerações Finais

Os estudos citogenéticos em peixes do gênero *Gymnotus* têm evidenciado a existência de uma alta diversidade cariotípica entre as espécies, notadamente em relação ao número diplóide e à fórmula cariotípica (Fernandes-Matioli *et al.*, 1998b; Milhomem, 2010). Porém, análises realizadas com a aplicação de diferentes técnicas citogenéticas clássicas e moleculares em espécies deste gênero revelaram aspectos bastante consistentes de conservação da macro e microestrutura do cariótipo nas comparações entre populações de uma mesma espécie, resultados semelhantes em análise com populações de *G. sylvius* e *G. cf. carapo* (Claro, 2008). Considerando essas características, a citogenética poderia ser utilizada como uma ferramenta importante para diagnóstico taxonômico neste grupo de peixes (Margarido *et al.*, 2007).

Os estudos citogenéticos realizados neste trabalho envolvendo quatro diferentes espécies do gênero *Gymnotus* trouxeram informações significativas relacionadas à evolução cromossômica. Três números diplóides distintos e quatro fórmulas cariotípicas foram encontrados com números diplóides de 40 cromossomos (22m+12sm+6st) em *G. sylvius*; de 52 cromossomos (32m+18sm+2st) em *G. pantherinus* e de 54 cromossomos em *G. inaequilabiatus* (42m+10sm+2a) e *G. cf. carapo* (38m+12sm+4st).

As análises citogenéticas convencionais, como bandamento C, revelaram uma distribuição diferencial da heterocromatina constitutiva, sendo que as quatro espécies analisadas possuem regiões heterocromáticas em posição centromérica e pericentromérica na maioria dos cromossomos (Fernandes-Matioli *et al.*, 1998b; Silva e Margarido, 2005; Margarido *et al.*, 2007). Além dessas regiões, *G. sylvius* apresentou blocos heterocromáticos coincidentes com as RONS e *G. inaequilabiatus*, *G. pantherinus* e *G. cf. carapo* apresentaram grandes blocos heterocromáticos intersticiais em alguns cromossomos.

A impregnação pelo nitrato de Prata evidenciou que todas as espécies de *Gymnotus* analisadas possuem RONS simples mudando apenas a posição cromossômica (Fernandes-Matioli *et al.*, 2007; Claro 2008; Milhomem *et al.*, 2010), sendo localizada no par 17 em *G. sylvius*, enquanto nas outras três espécies foram localizadas no par 1. Estes resultados foram coincidentes com os dados obtidos pela aplicação da técnica de hibridação com sonda do DNAr 18S e pela coloração com o fluorocromo Cromomicina (CMA₃) (Milhomem *et al.*, 2008; Claro, 2008). Além disso, o tratamento com CMA₃ em *G. sylvius* e *G. pantherinus* detectou a presença de marcações adicionais em alguns cromossomos, além daquelas correspondentes às RONS indicando, assim, a presença de regiões ricas em pares de bases GC

em outros sítios cromossômicos. A presença e distribuição de tais segmentos cromossômicos no genoma das espécies, além de servirem como marcadores das modificações cariotípicas ocorridas durante o processo de diferenciação, podem dar indicações dos mecanismos evolutivos atuantes nos processos de especiação.

A aplicação da técnica de hibridação fluorescente *in situ* utilizando sonda de DNAr 5S mostrou um padrão de distribuição bem diferente do DNAr 18S. Enquanto em *G. sylvius* foi detectado apenas um par cromossômico envolvido com a marcação por esta sonda, em *G. pantherinus* esta ocorreu em dois pares cromossômicos; já em *G. inaequilabiatus* cerca de dezessete pares cromossômicos mostraram marcação e em *G. cf. carapo* sinais de marcação foram observados em cerca de quinze pares. Esta ampla dispersão do DNAr 5S poderia estar associada à distribuição da heterocromatina constitutiva, que caracteriza regiões geralmente mais propícias a quebras cromossômicas e, neste caso, pode ter facilitado a dispersão do DNAr 5S nas duas espécies. Por outro lado, a manutenção de apenas um par cromossômico envolvido na síntese de RNAr 5S em *G. sylvius* parece reforçar esta hipótese, uma vez que esta espécie não apresenta grandes blocos heterocromáticos nos cromossomos, como encontrado nas outras espécies. Além disso, estudos realizados em outras espécies de peixes mostraram a possível existência de elementos transponíveis associados à dispersão do DNAr 5S (Cioffi *et al.*, 2010).

Devido a este interessante padrão de dispersão do DNAr 5S, já detectado em outras espécies de peixes (Hatanaka e Galetti, 2004; Mantovani *et al.*, 2005), foi realizada a amplificação desse gene nas espécies em estudo, sendo possível observar a existência de duas classes compondo este segmento genômico, como já visto em peixes do gênero *Leporinus* (Martins e Galetti, 2001). Neste sentido, as duas classes encontradas foram isoladas, sequenciadas e preparadas como sondas individuais para realização da hibridação fluorescente *in situ*. A classe I apresentou cerca de 450 pb e a classe II cerca de 650 pb. A FISH utilizando essas sondas revelou que em *G. sylvius* as duas classes apresentam-se co-localizadas no mesmo par cromossômico, enquanto que em *G. inaequilabiatus* a classe II apareceu mais dispersa em relação à classe I. Esse aspecto não conservado do padrão de dispersão do DNAr 5S entre as duas espécies analisadas pode estar associado a rearranjos cromossômicos ocorridos que podem ter levado à perda de unidades repetidas deste gene em *G. sylvius*, espécie com menor número cromossômico ($2n=40$) em relação a *G. inaequilabiatus* ($2n=54$). De algum modo, esses rearranjos devem estar mais associados à classe II, que se mostrou amplamente dispersa no complemento cromossômico da espécie quando comparada à classe I em *G. inaequilabiatus*.

A aplicação da técnica de hibridação com a sonda telomérica (TTAGGG)_n revelou sinais de marcação fluorescente nas extremidades de todos os cromossomos, nas quatro espécies analisadas. Porém, em *G. sylvius* foram detectados sinais de marcação também na região telomérica intersticial (ITS) de um par cromossômico metacêntricos, indicando a possível ocorrência de rearranjos cromossômicos recentes do tipo fusão cêntrica neste conjunto cromossômico (Claro e Almeida-Toledo 2010).

A aplicação da técnica de pintura do par cromossômico portador das RONS em *G. sylvius*, *G. inaequilabiatus* e *G. cf. carapo* utilizando como sonda o cromossomo inteiro portador das RONS de *G. cf. carapo* (citótipo 2n=42) proveniente da bacia Amazônica, obtida por FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting), mostrou um padrão conservado desse cromossomo nas diferentes espécies de *Gymnotus*, resultado semelhante encontrado em outras espécies do gênero (Milhomem, 2010). Ainda que a variabilidade cariotípica existente entre essas espécies seja grande, não foram observadas diferenças entre os pares cromossômicos portadores das RONS nas distintas espécies analisadas. Esses resultados parecem confirmar o caráter conservador das características cariotípicas desta classe de DNAr, como tem sido observado nas espécies deste gênero.

6 Referências Bibliográficas

- Affonso PRAM, Galetti Jr. PM. 2005. Chromosomal diversification of reef fishes from genus *Centropyge* (Perciformes, Pomacanthidae). *Genetica*, 123: 227-233.
- Albert JS, Crampton WGR. 2003. Seven new species of the Neotropical electric fish *Gymnotus* (Teleostei, Gymnotiformes) with a redescription of *G. carapo* (Linnaeus). *Zootaxa*, 000:1-54.
- Albert JS, Crampton WGR, Thorsen DH, Lovejoy NR. 2005. Phylogenetic systematics and historical biogeography of the Neotropical electric fish *Gymnotus* (Teleostei: Gymnotidae). *Systematics and Biodiversity*, 4: 375-417.
- Almeida-Toledo LF, Foresti F, Toledo-Filho SA. 1985. Spontaneous triploidy and NOR activity in *Eigenmannia* sp. (Pisces, Sternopygidae) from the Amazon basin. *Genetica*, 66:85-88.
- Almeida-Toledo LF, Stocker AJ, Foresti F, Toledo-Filho SA. 1996. Fluorescence *in situ* hybridization with rDNA probes on chromosomes of two nucleolus organizer region phenotypes of species of *Eigenmannia* (Pisces, Gymnotoidei, Sternopygidae). *Chromosome Research*, 4: 301-305.
- Almeida-Toledo LF, Foresti F, Toledo-Filho SA. 2000a. Karyotypic evolution in Neotropical freshwater fish. *Chromosome Today*, 13: 169-182.
- Almeida-Toledo LF, Foresti F, Daniel MFZ, Toledo-Filho SA. 2000b. Sex chromosome evolution in fish: the formation of the neo-Y chromosome in *Eigenmannia* (Gymnotiformes). *Chromosoma*, 109: 197-200.
- Almeida-Toledo LF, Foresti F. 2001. Morphologically differentiated sex chromosomes in Neotropical freshwater fish. *Genetica*, 111: 1-3.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215: 403-410.
- Alves-Costa FA, Wasko AP, Oliveira C, Foresti F, Martins C. 2006. Genomic organization and evolution of the 5S ribosomal DNA in Tilapiini fishes. *Genetica*, 127: 243-252.
- Artoni RF, Molina WF, Bertollo LAC, Galetti Jr. PM. 1999. Heterochromatin analysis in the fish species *Liposarcus anisitsi* (Siluriformes) and *Leporinus elongatus* (Characiformes). *Genetics and Molecular Biology*, 22: 39-44.
- Artoni RF, Falcão JDN, Moreira-Filho O, Bertollo LAC. 2001. An uncommon condition for a sex chromosome system in Characidae fish. Distribution and differentiation of the ZZ/ZW system in *Triportheus*. *Chromosome Research*, 9: 449-456.

- Artoni RF, Bertollo LAC. 2002. Evolutionary aspects of the ZZ/ZW sex chromosome system in the Characidae fish, genus *Triportheus*. A monophyletic state and NOR. *Heredity*, 89: 15-19.
- Bertollo LAC, Takahash CS, Moreira-Filho O. 1978. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Revista Brasileira de Genética*, 1: 103-120.
- Bertollo LAC, Born GG, Dergam JA, Fenocchio AS, Moreira-Filho O. 2000. A biodiversity approach in the Neotropical fish *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic distribution of cytotypes and cytotaxonomic considerations. *Chromosome Research*, 8: 603-613.
- Born GG, Bertollo LAC. 2002. An XX/XY sex chromosome system in a fish species, *Hoplias malabaricus*, with a polymorphic NOR-bearing X chromosome. *Chromosome Research*, 8:111-118.
- Campo D, Machado-Schiaffino G, Horreo JL, Garcia-Vazquez E. 2009. *Journal of Molecular Evolution*, 68: 208-216.
- Claro FL. 2008. *Gymnotus carapo* e *Gymnotus sylvius* (Teleostei: Gymnotidae): uma abordagem citogenético-molecular. Dissertação de mestrado. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo. 97p.
- Claro FL, Almeida-Toledo, LF. 2010. Evidence of chromosome fusion in *Gymnotus sylvius* Albert & Fernandes-Matioli, 1999 (Teleostei: Gymnotiformes) detected by telomeric probes and R-banding. *Caryologia*, 63: 134-141.
- Cioffi MB, Martins C, Bertollo LAC. 2010. Chromosome spreading of associated transposable elements and ribosomal DNA in the fish *Erythrinus erythrinus*. Implications for genome change and karyoevolution in fish. *BMC Evolutionary Biology*, 10:271-280.
- Cole CJ, Levans CR. 1971. Chromosome preparations of amphibians and reptiles: improved technique. *Herpetol. Rev.*, 3: 102.
- Crampton WGR, Hopkins CD. 2005. Nesting and paternal care in the weakly electric fish *Gymnotus* (Gymnotiformes: Gymnotidae) with descriptions of larval and adult electric organ discharges of two species. *Copeia*, 1: 48-60.
- Crampton WGR, Thorsen DH, Albert JS. 2005. Three new species from a diverse and sympatric assemblage of the electric fish *Gymnotus* (Ostariophysi: Gymnotidae) in the lowland Amazon Basin, with notes on ecology. *Copeia*, 1:82-99.
- Cruz VP. 2009. Estudos citogenéticos em raias do gênero *Potamotrygon* (Chondrichthyes: Myliobatiformes: Potamotrygonidae) na bacia superior do rio Paraná. Dissertação de

Referências Bibliográficas

- mestrado. Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP. 132p.
- Diniz D, Laudicina A, Cioffi MB, Bertollo LAC. 2008. Microdissection and whole chromosome painting. Improving sex chromosome analysis in *Tripottheus* (Teleostei, Characiformes). *Cytogenetic and Genome Research*, 122: 163-168.
- Domingues MS, Vicari MR, Abilhoa V, Wamser JP, Cestari MM, Bertollo LAC, Almeida MC, Artoni RF. 2007. Cytogenetic and comparative morphology of two allopatric population of *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Teleostei: Characidae). *Neotropical Ichthyology*, 5: 37-44.
- Drouin G, Moniz de Sá M. 1995. The concerted evolution of 5S ribosomal genes linked to the repeats of other multigene families. *Molecular Biology Evolution*, 12: 481-493
- Feldberg E, Porto JIR, Bertollo LAC. 2003. Chromosomal changes and adaptation of Cichlid fishes during evolution. In *Fish adaptation* (Val AL, Kapoor BG.), New Delhi & New York. Science Publishers, 285-308.
- Fernandes-Matioli FMC, Almeida-Toledo LF, Toledo-Filho SA. 1997. Extensive nucleolus organizer region polymorphism in *Gymnotus carapo* (Gymnotoidei, Gymnotidae). *Cytogenetics and Cell Genetics*, 78: 236-239.
- Fernandes-Matioli FMC, Almeida-Toledo LF, Toledo-Filho SA. 1998a. Natural triploidy in the Neotropical species *Gymnotus carapo* (Pisces: Gymnotiformes). *Caryologia*, 3: 319-322.
- Fernandes-Matioli FMC, Marchetto MCN, Almeida-Toledo LF, Toledo-Filho SA. 1998b. High intraspecific karyological conservation in four species of *Gymnotus* (Pisces: Gymnotiformes) from Southeastern Brazilian basins. *Caryologia*, 3: 221-234.
- Fernandes-Matioli FMC, Almeida-Toledo LF. 2001. A molecular phylogenetic analysis in *Gymnotus* species (Pisces: Gymnotiformes) with inferences on chromosome evolution. *Caryologia*, 54: 23-30.
- Fernandes-Matioli FMC, Albert J, Daniel-Silva MFZ, Lopes CE, Crampton WGR, Almeida-Toledo LF. 2005. A new *Gymnotus* (Teleostei: Gymnotiformes: Gymnotidae) from the Pantanal Matogrossense of Brazil and adjacent drainages: continued documentation of a cryptic fauna. *Zootaxa*, 933, 1-14.
- Ferro DAM, Néó DM, Moreira-Filho O, Bertollo LAC. 2001. Nucleolar organizing regions, 18S and 5S rDNA in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): Populations distribution and functional diversity. *Genetica*, 110: 55-62.

Referências Bibliográficas

- Foresti F, Almeida-Toledo LF, Toledo-Filho SA. 1981. Polymorphic nature of nucleolus organizer regions on fishes. *Cytogenetic and Cell Genetics*, 31: 137-144.
- Foresti F, Torres RA, Toledo-Filho SA. 1984. Chromosome studies in *Gymnotus Carapo* and *Gymnotus sp* (Pisces, Gymnotidae). *Caryologia (Firenze)*, 37: 141-146.
- Foresti F, Oliveira C, Almeida-Toledo LF. 1993. A method for chromosome preparations from large specimens of fishes using in vitro short treatment with colchicine. *Experientia*, 49: 810-813.
- Fujiwara M, Inafuku J, Takeda A, Watanabe A, Fujiwara A, Kohno S, Kubota S. 2008. Molecular organization of 5S rDNA in bitterlings (Cyprinidae). *Genetica*, 10.1007/s10709-008-9294-2.
- Gold JR, Amemiya CT. 1986. Chromomycin A₃ stains nucleolus organizer regions of fish chromosomes. *Copeia*, 1: 226-231.
- Hall, TA. 1999 BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.*, 41:95-98.
- Hatanaka T, Galetti Jr. PM. 2004. Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetica*, 122: 239-244
- Henning F, Trifonov V, Ferguson-Smith MA, Almeida-Toledo LF. 2008. Non-homologous sex chromosomes in two species of the genus *Eigenmannia* (Teleostei: Gymnotiformes). *Cytogenetic and Genome Research*, 121: 55-58.
- Howell WM, Black DA. 1980. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: A 1-step method. *Experientia*, 36: 1014-1015.
- Kao TT. 1990. Microdissection and microcloning of human chromosome 21. *Proceedings of Clinical and Biological Researchs*, 360: 89-104.
- Kavalco KF. 2008. Estudos Evolutivos no gênero *Astyanax* (Pisces, Characidae). Tese de Doutorado. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo. 197p.
- Kimura, M.1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16:111-120.
- Lacerda MCV, Maistro EL. 2007. Cytogenetic Analysis of Three Sympatric *Gymnotus* Species (Teleostei: Gymnotidae) from the Fundo Stream, MG, Brazil. *Cytologia*, 72: 89-93.
- Levan A, Fredga K, Sandberg AA. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52: 201-220.

Referências Bibliográficas

- Long EO, David IB. 1980. Repeated genes in Eukaryotes. *Annual Reviews in Biochemistry*, 49: 727-764.
- Mantovani M, Abel LDS, Moreira-Filho O. 2005. Conserved 5S and variable 45S rDNA chromosomal localization revealed by FISH in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Genetica*, 123: 211-216
- Mago-Leccia F. 1994. Electric fishes of the continental waters of America. *Biblioteca de la Academia de Ciencias Fisicas, Matematicas y Naturales*, Caracas, 29: 1-206.
- Margarido VP, Bellafronte E, Moreira-Filho O. 2007. Cytogenetic analysis of three sympatric *Gymnotus* (Gymnotiformes, Gymnotidae) species verifies invasive species in the Upper Paraná River basin, Brazil. *Journal of Fish Biology*, 70: 155-164.
- Martins C, Galetti Jr. PM. 1999. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). *Chromosome Research*, 7: 363-367.
- Martins C, Galetti Jr. PM. 2001. Two rDNA arrays in Neotropical fish species: is it a general rule for fishes? *Genetica*, 111: 439-446.
- Martins C, Wasko AP. 2004. Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish genome. In Williams CR (ed) *Focus on Genome Research*. Nova Science Publishers, Hauppauge, NY, 335-363.
- Meltzer PS, Guan XY, Burgess A, Trent JM. 1992. Rapid generation of region specific probes by chromosome microdissection and their application. *Nature Genetics*, 1: 24-28.
- Milhomem SSR, Pieczarka JC, Crampton WGR, Souza ACP, Carvalho Jr. JR, Nagamachi CY. 2007. Differences in karyotype between two sympatric species of *Gymnotus* (Gymnotiformes: Gymnotidae) from the eastern amazon of Brazil. *Zootaxa*, 1397: 55-62.
- Milhomem SSR, Pieczarka JC, Crampton WGR, Silva DS, Souza ACP, Carvalho Jr. JR, Nagamachi CY. 2008. Chromosomal evidence for a cryptic species in the *Gymnotus carapo* species-complex (Gymnotiformes, Gymnotidae). *BMC Evolutionary Biology*, 9: 75.
- Milhomem SSR. 2010. Variabilidade cromossômica em espécies do gênero *Gymnotus* (Gymnotidae-Gymnotiformes): primeira abordagem com técnica de Pintura Cromossômica. Tese de doutorado. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará. Belém-PA. 144p.
- Morescalchi MA, Liguori I, Rocco L, Archimandritis A, Stingo V. 2008. Karyotypic characterization and genomic organization of the 5S rDNA in *Polypterus senegalus* (Osteichthyes, Polypteridae). *Genetica*, 132: 179-186

Referências Bibliográficas

- Nagamachi CY, Pieczarka JC, Milhomem SSR, O'Brien PCM, Souza ACP, Ferguson-Smith MA. 2010. Multiple rearrangements in cryptic species of electric knifefish, *Gymnotus carapo* (Gymnotidae, Gymnotiformes) revealed by chromosome painting. *BMC Genetics*, 11: 28.
- Nederby-Nielsen J, Hallenberg C, Frederiksen S, Sorensen PD, Lomholt B. 1993. Transcription of human 5S rRNA genes is influenced by an upstream DNA sequence. *Nucleic Acids Research*, 26: 3631-3636.
- Oliveira C, Almeida-Toledo LF, Foresti F, Britski HA, Toledo-Filho SA. 1988a. Chromosome formulae of Neotropical freshwater fishes. *Revista Brasileira de Genética*, 11: 577-624.
- Oliveira C, Almeida-Toledo LF, Foresti F, Toledo-Filho SA. 1988b. Supernumerary chromosomes, Robertsonian rearrangements and multiple NORs in *Corydoras aeneus* (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae). *Caryologia*, 41: 227-236.
- Oliveira C, Almeida-Toledo LF, Mori L, Toledo-Filho SA. 1992. Extensive chromosomal rearrangements and nucleolar DNA content changes in the evolution of the armoured catfishes genus *Corydoras* (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae). *Journal of Fish Biology*, 40: 419-431.
- Oliveira C, Wright JM. 1998. Molecular cytogenetic analysis of heterochromatin in the chromosomes of tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae). *Chromosome Research*, 6: 205- 11.
- Oliveira C, Foresti F, Almeida-Toledo LF. 2007. Karyotypic evolution in Neotropical fishes. In: *Fish Cytogenetics*. Pisano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F, Kapoor BG. Enfield, Science Publisher, 111-164.
- Pansonato-Alves JC, Paiva LRS, Oliveira C, Foresti F. 2010. Interspecific chromosomal divergences in the genus *Characidium* (Teleostei, Characiformes, Crenuchidae). *Neotropical Ichthyology*, 8:77-86.
- Pansonato-Alves JC, Vicari MR, Oliveira C, Foresti F. 2011. Chromosomal diversification in populations of *Characidium cf. gomesi* (Teleostei, Crenuchidae). *Journal of Fish Biology*, 78: 183-194.
- Pendás AM, Mórán P, Freije JP, Garcia-Vásquez E. 1994. Chromosomal location and nucleotide sequence of two *tandem* repeats of the Atlantic salmon 5S rDNA. *Cytogenetics Cell Genetics*, 67: 31-36.

Referências Bibliográficas

- Pendás AM, Morán P, Martínez JL, Garcia-Vásquez E. 1995. Applications of 5S rDNA in Atlantic salmon, brown trout, and in Atlantic salmon x brown trout hybrid identification. *Molecular Ecology*, 4: 275 – 276.
- Phillips RB, Reed KM. 1996. Application of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) techniques to fish genetics: a review. *Aquaculture*, 140: 197-216.
- Pinhal D, Araki CS, Gadig OBF, Martins C. 2009. Molecular organization of 5S rDNA in sharks of the genus *Rhizoprionodon*: insights into the evolutionary dynamics of 5S rDNA in vertebrate genomes. *Genetics Research*, 91: 61-72
- Pinkel D, Straume T, Gray JW. 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83: 2934-2938.
- Reis RE, Kullander SO, Ferraris C. 2003. Check List of freshwater Fishes of South and Central America. Porto Alegre: Edipucrs, 742p.
- Sánchez S, Laudicina A, Jorge LC. 2004. A New Report of Multiple Sex Chromosome System in the Order Gymnotiformes (Pisces). *Cytologia*, 69: 155-160.
- Santi-Rampazzo AP, Nishiyama PB, Ferreira PEB, Martins-Santos IC. 2008 Intrapopulational polymorphism of nucleolus organizer region in *Serrapinnus notamelas* (Characidae, Cheirodontinae) from the Paraná River. *Journal of Fish Biology*, 72:1236-1243.
- Schweizer D. 1976. Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. *Chromosoma*, 58: 307-324.
- Schweizer D, Ambros P, Andrlé M. 1978. Modification of DAPI banding on human chromosomes by prestaining with a DNA-binding oligopeptide antibiotic, Distamycin A. *Experimental Cell Research*, 111: 327-332.
- Silva EB, Margarido VP. 2005. An X1X1X2X2/X1X2Y multiple sex chromosome system in a new species of the genus *Gymnotus* (Pisces, Gymnotiformes). *Environmental Biology of Fishes*, 73: 293–297.
- Singer MF. 1982. Highly repeated sequences in mammalian genomes. *Int. Rev. Cytol.*, 76: 67-112.
- Sumner AT. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research*, 75: 304-306.
- Telenius H, Pelmeur A, Tunnacliffe A. 1992 Cytogenetic analysis by chromosome painting using DOP-PCR amplified flow-sorted chromosomes. *Genes Chromosomes Cancer*, 4: 257–263.

Referências Bibliográficas

- Thompson, JD, Gibson, TJ, Plewniak, F, Jeanmougin, F, Higgins, DG. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.*, 24:4876-4882.
- Yang F, Carter NP, Shi L, Ferguson-Smith MA. 1995. A comparative study of karyotypes of muntjacs by chromosome painting. *Chromosoma*, 103: 642–652.
- Xia, X e Xie, Z. 2001. DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *J. Heredity*, 92:371-373.
- Zhu HP, Lu MX, Gao FY, Huang ZH, Yang LP, Gui JF. 2010. Chromosomal localization of rDNA genes and genomic organization of 5S rDNA in *Oreochromis mossambicus*, *O. urolepis hornorum* and their hybrid. *Journal of Genetics*, 89: 163-171.