

# Análise do conteúdo gênico e expressão diferencial de variantes do cromossomo B em *Psalidodon* (Teleostei, Characiformes)

Mateus Rossetto Vidal

Botucatu, SP





# Universidade Estadual Paulista ''Júlio de Mesquita Filho'' Instituto de Biociências de Botucatu

# Análise do conteúdo gênico e expressão diferencial de variantes de cromossomo B em *Psalidodon* (Teleostei, Characiformes)

Aluno: Mateus Rossetto Vidal Orientador: Prof. Dr. Fausto Foresti Coorientador: Dr. Duílio M. Z. A. Silva

> Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia).

Botucatu, SP

2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM. DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Vidal, Mateus Rossetto. Análise do conteúdo gênico e expressão diferencial de variantes do cromossomo B em Psalidodon (Teleostei, Characiformes) / Mateus Rossetto Vidal. - Botucatu, 2022 Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu Orientador: Fausto Foresti Coorientador: Duílio Mazzoni Zerbinato de Andrade Silva Capes: 20400004 1. Astyanax (Peixe). 2. Expressão gênica. 3. Genômica. 4. Citogenética.

Palavras-chave: Astyanax; Citogenética; Expressão gênica; Genômica; Psalidodon.

Dedicatória

À minha mãe Ana Cristina, com carinho dedico.

# Agradecimentos

Agradeço primeiramente ao Professor Fausto Foresti por ter aceito me orientar e por ter sempre me inspirado e motivado a ir além.

Ao meu Co-Orientador Duílio Mazzoni Zerbinato de Andrade Silva, obrigado por cobrar sempre o melhor de mim e me guiar para obter sempre o melhor resultado.

Ao Professor Cláudio Oliveira, por todo o apoio fornecido para esta pesquisa.

Ao meu colega Lucas Fortino Lasmar pela colaboração neste trabalho e por toda parceria e amizade.

Aos colegas do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, por terem me acolhido tão bem.

Ao Professor Fábio Porto Foresti e a todos os colegas do Laboratório de Genética de Peixes da UNESP Bauru, pela amizade e apoio no desenvolvimento deste projeto.

Aos membros do Laboratório de Biologia Molecular e Reprodutiva da UNESP de Botucatu, em especial ao Professor Rafael Henrique Nóbrega e à colega Maira da Silva Rodrigues pelo suporte.

Aos membros do Laboratório de Biologia do Músculo Estriado Esquelético da UNESP Botucatu, em especial à Professora Maeli Dal Pai e à colega Bruna Tereza T. Zanella pelo suporte.

Aos meus familiares que me deram todo apoio e suporte durante toda minha graduação e pós-graduação, em especial à minha namorada Ariane por me apoiar em todos os momentos da minha formação.

Ao Instituto de Biociências de Botucatu.

Ao programa de Pós-graduação em Zoologia.

Aos funcionários do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional e da seção técnica de Pós-Graduação que, pelo seu trabalho, permitiram que este estudo fosse realizado.

À FAPESP, CAPES e ao CNPq, pelo financiamento deste projeto.

Esta pesquisa foi financiada com recursos da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo Processos: 2019/15140-9; 2020/01775-0



Somos feitos de poeira das estrelas. Somos uma maneira de o cosmos conhecer a si mesmo. *Carl Sagan* 

# Resumo

Cromossomos B são elementos supranumerários do genoma de eucariotos, com diversos aspectos ainda incógnitos. Apesar de sua composição pobre em genes codificadores de proteínas, a descrição de transcritos provenientes destes elementos vem alterando a visão de que são estruturas inertes no genoma. Dentre os peixes do gênero Psalidodon, uma grande diversidade desses elementos pode ser observada, com a ocorrência de micro a macro cromossomos B com diferentes morfologias. Estudos anteriores demonstram a ocorrência de pelo menos 21 genes nos cromossomos B de Psalidodon paranae e Psalidodon scabripinnis, sendo que ambas as espécies possuem maior presença de cromossomos B em fêmeas, o que sugere sua atuação nas vias de diferenciação do sexo. Desta forma, o presente estudo visou investigar o conteúdo gênico da variante BfMa de Psalidodon fasciatus para testar a hipótese de origem comum com outras variantes no gênero, bem como investigar se a presença de cromossomos B leva à expressão diferencial de genes da via de diferenciação do sexo em P. paranae. Para isso, foram coletados e analisados indivíduos de P. paranae e P. fasciatus e as análises de qPCR permitiram identificar oito genes codificadores de proteína na variante BfMa de P. fasciatus (amhr2, ccpg1, cia30, g2e3, msh4, nobox, nusap1, *sbno2*), sendo que seis destes já foram descritos na variante *BfMb* da mesma espécie. Dessa forma, é altamente provável que ambas as variantes possuam uma origem comum e se diversificaram ao ponto de perder ou adquirir genes exclusivos. Ainda, devido ao compartilhamento de cinco genes entre os cromossomos B de Psalidodon já analisados, pode-se concluir que a variante BfMa também compartilha de uma origem comum com as demais variantes do gênero ocorrida há cerca de 4 milhões de anos e que sua origem não se deu por hibridação interespecífica recente. As análises de RT-qPCR em gônadas de P. paranae mostraram a expressão diferencial de três genes em fêmeas (cyp19a1a, esr1 e nobox) e de dois em machos (dmrt1 e nobox). A subexpressão dos genes cyp19a1a e esr1 em fêmeas poderia ser reflexo de um processo de desregulação causado pelo cromossomo B, ou uma resposta do genoma A para neutralizar o genoma B, ou ainda um possível efeito funcional destes cromossomos, que levaria a uma distorção do período reprodutivo. A superexpressão do gene *nobox* poderia refletir a existência de um mecanismo de acúmulo destes cromossomos, determinando uma maior eficiência no processo de oogênese e um maior sucesso reprodutivo para fêmeas +B. Em machos, a superexpressão do gene dmrt1 poderia causar uma alteração do ciclo reprodutivo dos indivíduos, como já foi verificado ocorrer em P. scabripinnis por outros autores.

# Abstract

B chromosomes are supernumerary elements found in the genome of eukaryotes and have several aspects still unknown. Despite its poor composition in protein-coding genes, the description of transcripts from these elements has changed the view that they are inert structures in the genome. Among the fish of the genus Psalidodon, a great diversity of these elements can be observed, with the occurrence of micro to macro B chromosomes, with different morphologies. Previous studies have demonstrated the occurrence of at least 21 genes in the B chromosomes of Psalidodon paranae and Psalidodon scabripinnis, with both species having a greater presence of B chromosomes in females, which suggests their role in sex differentiation pathways. Thus, the present study aimed to investigate the gene content of the BfMa variant of Psalidodon fasciatus to test the hypothesis of a common origin with other variants in the genus, as well as to investigate whether the presence of B chromosomes leads to the different expression of genes in the differentiation pathway of the sex in P. paranae. For this, individuals of P. paranae and P. fasciatus were collected and analyzed and the qPCR analysis allowed the identification of eight protein-coding genes in the BfMa variant of P. fasciatus (amhr2, ccpg1, cia30, g2e3, msh4, nobox, nusap1, and sbno2), being that six of these have already been described in the *BfMb* variant of the same species. Thus, it is highly likely that both variants have a common origin and have diversified to the point of losing or acquiring unique genes. Still, due to the sharing of five genes between the B chromosomes of *Psalidodon* already analyzed, it can be supposed that the *BfMa* variant also shares a common origin with the other variants of the genus, in a process that occurred about 4 million years ago and that its origin was not due to recent interspecific hybridization. RTqPCR analyzes in *P. paranae* gonads showed differential expression of three genes in females (cyp19a1a, esr1 and nobox), and two in males (dmrt1 and nobox). The under expression of the cyp19a1a and esr1 genes in females could reflect a dysregulation process caused by the B chromosome, or a response of the A genome to neutralize the B genome, or even a possible functional effect of these chromosomes, which would lead to a distortion of the reproductive period. The overexpression of the nobox gene could reflect the existence of a mechanism of accumulation involving these chromosomes, determining greater efficiency in the oogenesis process and greater reproductive success for +B females. In males, overexpression of the *dmrt1* gene could cause an alteration in the reproductive cycle, as has already been observed before in P. scabripinnis.

# Sumário

Capítulo	o 1 - Análise de conteúdo gênico da variante <i>BfMa</i> de <i>Psalidodon fasciatus</i>	. 10
1.1	Introdução	. 11
1.1.2	Cromossomos B no gênero Psalidodon	. 13
1.2	Objetivos	. 14
1.3	Material e métodos	. 15
1.3.1 N	Naterial	. 15
1.3.2 M	étodos	. 16
1.3.2.1	Estimulação de mitoses	. 16
1.3.2.2	Obtenção dos cromossomos metafásicos mitóticos	. 16
1.3.2.3	Coloração convencional com Giemsa	. 16
1.3.2.4	Detecção da heterocromatina constitutiva (Banda C)	. 16
1.3.2.5	Hibridação in situ fluorescente (FISH)	. 16
1.3.2.6	Estudos cariotípicos	. 17
1.3.2.7	Extração de DNA genômico	. 17
1.3.2.8	Análise de conteúdo gênico das variantes do cromossomo B por qPCR	. 17
1.3.2.9	Análises estatísticas	. 18
1.4	Resultados	. 18
1.4.1	Variabilidade cariotípica e presença de cromossomos B em P. fasciatus do Rio Alambari	. 18
1.4.2	Genes presentes na variante BfMa de P. fasciatus	. 19
1.5 Dis	cussão	.21
1.6 Co	nclusões	. 22
1.7 Ref	ferências	.23
Capítulo	o 2 - Efeitos do cromossomo B na expressão de genes de diferenciação sexual em <i>Psalidodon paranae</i>	. 29
2.1 Intro	odução	. 30
2.2 Mat	erial e métodos	. 32
2.2.1 Cc	oleta e análises cariotípicas	. 32
2.2.2 Ex	tração de RNA total e conversão para cDNA	.32
2.2.3 De	esenho de Primers para análise de expressão gênica por RT-qPCR	.33
2.2.4 Ar	nálise de expressão gênica – RT-qPCR	.33
2.2.5 Ar	nálise estatística	.33
2.3 Resu	ultados	.33
2.3.1 Te	este de eficiência dos primers desenhados	.34
2.3.2 Pa	adronização de genes de referência para análise de expressão gênica por RT-qPCR	.34
2.3.3 Ex	pressão de genes associados à diferenciação sexual em <i>P. paranae</i>	. 35
2.4 Dis	cussão	.37
2.5 Con	clusões	.40
2.6 Refe	erências	.41
Conside	erações Gerais	.46
Materia	al suplementar	.48

# Capítulo 1 - Análise de conteúdo gênico da variante BfMa de Psalidodon fasciatus

# 1.1 Introdução

Cromossomos B são elementos supranumerários do genoma de eucariotos descobertos há cerca de 115 anos (Wilson, 1907). Desde então, diversos estudos vêm tentando elucidar o seu papel biológico (Jones, 2017; Valente et al., 2017; Vujošević et al., 2018) e, no entanto, diversos aspectos estruturais e funcionais destes elementos genômicos ainda permanecem incógnitos.

Esses elementos estão presentes em apenas uma porção dos indivíduos de uma determinada população e podem até mesmo apresentar variação intraindividual (Foresti et al., 1989). Devido a essas características, são considerados não essenciais para a sobrevivência dos portadores (Camacho, 2005) e os efeitos fenotípicos causados por eles são pouco perceptíveis (Burt e Trivers, 2006). Entretanto, alguns efeitos fenotípicos causados pela presença dos cromossomos B foram relatados em algumas espécies, tais como resistência à ferrugem da folha em *Avena sativa* (Dherawattana & Satanaga, 1973), coloração do aquênio em *Haplopappus gracilis* (Jackson & Newmark, 1960) e resistência a antibióticos em *Nectria haematococca* (Coleman et al., 2009).

A origem dos cromossomos B em muitos casos ocorre a partir dos cromossomos componentes do complemento padrão da própria espécie e, deste modo, podem carregar informação genética redundante já presente nestes cromossomos (Martis et al., 2012). No entanto, os cromossomos B também podem ser adquiridos de espécies próximas através do processo de hibridação (Camacho, 2005; Tosta et al., 2015). Apesar de sua origem a partir dos cromossomos do complemento padrão, os cromossomos B não se recombinam com os cromossomos do complemento A durante o processo de meiose, seguindo desta forma seu próprio caminho evolutivo (Camacho, 2005). Em geral, os cromossomos B são majoritariamente compostos por heterocromatina e ricos em sequências de DNA repetitivo como DNA satélite, DNA ribossomal e elementos transponíveis (Camacho, 2005). Devido a estas características, alguns autores primeiramente os consideraram como elementos inertes do genoma (Rhoades & McClintock, 1935), enquanto outros os classificavam como elementos parasitas (Östergren, 1945).

Com o surgimento das primeiras evidências moleculares de atividade gênica e presença de genes codificadores de proteínas (GCPs) nos cromossomos B (Leach et al., 2005; Graphodatsky et al., 2005), ficou evidente que não se tratam de elementos geneticamente inertes, mas que podem atuar ativamente e desempenhar um papel biológico.

Neste contexto, a utilização de metodologias genéticas moleculares e o avanço das tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS) permitiram que diversos novos genes fossem identificados nos cromossomos B (Ruban et al., 2017; Ahmad et al., 2019), possibilitando que a pesquisa sobre os cromossomos B dessem um expressivo salto nos últimos 10 anos com relação à caracterização do conteúdo gênico destes cromossomos, tendo sido constatado que vários genes desses componentes genômicos são ativamente transcritos em diversas espécies (Trifonov et al., 2013; Navarro-Domínguez et al., 2017; Ahmad et al., 2020; Blavet et al., 2021; Silva et al., 2021). Com isso, alguns efeitos complexos destes cromossomos estão sendo desvendados, como por exemplo a eliminação dos cromossomos B apenas nas raízes de *Aegilops speltoides* durante a fase embrionária (Ruban et al., 2020), a presença de um gene adquirido por hibridação interespecífica chamado de haploidizador em *Nasonia vitripennis*, que causa uma conversão sexual de fêmeas em machos ao expulsar todo o genoma vindo do espermatozoide (Dalla Benetta et al., 2020) e a presença de um gene determinante de sexo feminino epistaticamente dominante ao Y em peixes ciclídeos (Clark & Kocher, 2019).

De acordo com Ruiz-Ruano et al. (2019), o conteúdo gênico dos cromossomos B parece ser um fator importante para garantir sua perpetuação. A ocorrência e manutenção da frequência destes cromossomos pode ser explicada por dois modelos, ou pela ocorrência simultânea de ambos (Pokorná & Reifová, 2021). No primeiro modelo, os cromossomos B levam a alterações fenotípicas benéficas e, desta forma, conferem vantagem adaptativa para os indivíduos portadores (Dherawattana & Satanaga, 1973; Coleman et al., 2009). Já o segundo modelo assume que estes cromossomos se fixam na população devido à capacidade de burlar a taxa de transmissão mendeliana, se acumulando na prole através de um mecanismo chamado de drive (Camacho, 2005). Em muitos casos, esta acumulação ocorre durante o processo meiótico nas fêmeas, em que o cromossomo B preferencialmente segrega para o oócito, ao invés de se fixar no corpúsculo polar (Kayano, 1957; Hewitt, 1976; Zurita et al., 1998). De acordo com Akera et al. (2017), o processo meiótico no oócito feminino providencia uma grande oportunidade para elementos genômicos egoístas se acumularem, devido à assimetria do fuso meiótico. Ao se ligarem preferencialmente ao lado do ovócito no fuso, as taxas de transmissão podem ultrapassar as taxas mendelianas esperadas. É interessante destacar que diversos genes relacionados com o ciclo celular já foram encontrados em cromossomos B (Valente et al., 2014; Makunin et al., 2018; Park et al.,

2019; Silva et al., 2021), sendo possível especular que estes cromossomos consigam manipular a maquinaria celular em benefício próprio (Ruiz-Ruano et al., 2019).

#### 1.1.2 Cromossomos B no gênero Psalidodon

Estima-se que a região Neotropical possua cerca de 27% do total de espécies de peixes, o que a torna a região biogeográfica mais rica do mundo com relação à fauna deste táxon (Reis et al., 2016). Dentre os peixes, os componentes da ordem Characiformes ganham grande destaque por serem um dos grupos mais representativos (Fricke et al., 2021). Inserido nesta ordem, o gênero *Psalidodon* (Characiformes, Characidae) recentemente redescrito por Terán et al. (2020), possui ampla distribuição na América do Sul (Ornelas-Garcia et al., 2008). No entanto, este gênero possui uma sistemática complexa (Rossini et al., 2016). O gênero *Psalidodon* é caracterizado pela ocorrência de espécies crípticas (Pansonato-Alves et al., 2013; Gavazzoni et al., 2018) e complexos de espécies, tais como os complexos *P. scabripinnis* (Moreira-Filho & Bertollo, 1991) e *P. fasciatus* (Artoni et al., 2006), sendo que uma variabilidade cariotípica significativa é encontrada entre os componentes destes complexos de espécies que apresentam, além de números diploides distintos, também diferentes variantes de cromossomos B (Maistro et al., 1992; Mizoguchi & Martins-Santos, 1997).

Com relação à variabilidade cariotípica no gênero *Psalidodon*, são encontrados números diploides desde 2n=36 em *P. schubarti* (Daniel-Silva & Toledo, 2001) até 2n=50 em diversas outras espécies (Oliveira et al., 2009), além de algumas espécies e populações apresentarem elementos supranumerários ou cromossomos B em seu genoma. De acordo com Oliveira et al. (2009), a morfologia e tamanho dos cromossomos B em *Psalidodon* é variada, podendo ser encontrados desde macro a micro cromossomos. No entanto, de acordo com Moreira-Filho et al. (2004), a variante metacêntrica com tamanho similar ao do primeiro par de cromossomos do complemento A é a mais recorrente. Devido a isso, foi proposta pelos autores a hipótese de que este cromossomo corresponderia à variante ancestral comum em *Psalidodon*. Essa hipótese foi posteriormente confirmada por Silva et al. (2016, 2021) com base no compartilhamento de sequências de DNA repetitivo e de genes codificadores de proteínas (GCPs), com base em análises realizadas nos cromossomos B de *P. paranae*, *P. scabripinnis*, *P. fasciatus* e *P. bockmanni*.

Um efeito funcional interessante dos cromossomos B foi relatado em *P*. *scabripinnis*, com alterações observadas no período reprodutivo de seus portadores (Castro

et al., 2018, 2019). Essa manifestação se deve à superexpressão do gene *dmrt1* em machos, causando a extensão do período reprodutivo de julho a fevereiro e a subexpressão do gene *foxl2a* em fêmeas, que determina um período reprodutivo curto e tardio de dezembro a fevereiro. De acordo com os autores, a extensão do período reprodutivo pode contribuir para a perpetuação do cromossomo supranumerário, uma vez que o período reprodutivo tardio de fêmeas +B coincide com o período reprodutivo estendido de machos +B, o que aumentaria a chance de gerar indivíduos +B.

Apesar do conteúdo conhecido de DNA repetitivo e dos aparentes efeitos funcionais dos cromossomos B em *Psalidodon* (Silva et al., 2016; Castro et al., 2018, 2019), pouco se sabe sobre seu conteúdo de genes codificadores de proteínas (GCPs) e sua atividade gênica. Recentemente Silva et al. (2021) encontraram diversos GCPs no cromossomo B metacêntrico grande de quatro espécies de Psalidodon. No entanto, o conteúdo gênico em outras variantes dentro destas mesmas espécies ainda permanece desconhecido. Devido à alta dinâmica cromossômica e evolutiva dos DNAs repetitivos, somadas à possibilidade destes componentes estarem associados a elementos saltatórios do genoma, a investigação sobre as relações entre os cromossomos B de espécies próximas pela análise desses elementos pode tornar-se uma empreitada difícil. Por outro lado, os GCPs possuem uma dinâmica evolutiva mais lenta, uma vez que geralmente são sequências menores e com menor número de cópias, que podem sofrer maior pressão seletiva. Ainda que os cromossomos B possam possuir regiões com seleção relaxada (Silva et al., 2014), é esperado que genes importantes para sua manutenção possam se apresentar mais conservados. Considera-se, pois, que o conhecimento, identificação e análise das sequências de GCPs poderiam indicar com precisão a origem e evolução dos cromossomos que as possuem.

#### 1.2 Objetivos

O presente projeto se insere no programa geral de estudos citogenéticos de peixes Neotropicais que vem sendo desenvolvido no Laboratório de Biologia e Genética de Peixes do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Instituto de Biociências da UNESP, Botucatu-SP, visando um melhor conhecimento do genoma e da estrutura cromossômica dos peixes e, em particular, das células eucariontes. Como já demonstrado, as espécies do gênero *Psalidodon* constituem um interessante modelo para o estudo dos cromossomos B, uma vez que estes elementos genômicos ocorrem em diferentes espécies, apresentando expressiva variação morfológica e estrutural. Dessa forma, o presente estudo tem como objetivos gerais:

- a) identificar exemplares portadores do cromossomo B em Psalidodon fasciatus;
- b) investigar se a presença de cromossomos B leva à expressão diferencial de genes da via de diferenciação do sexo nas espécies de *Psalidodon*;
- c) avaliar o processo de formação das variantes de cromossomos B de *Psalidodon* e testar a hipótese de origem comum com outras variantes encontradas em espécies do gênero;
- d) verificar se os genes codificadores de proteínas presentes nos cromossomos B metacêntricos grandes de *Psalidodon* estão presentes na variante *BfMa* de *Psalidodon fasciatus*.

# 1.3 Material e métodos

# 1.3.1 Material

Foram coletados indivíduos da espécie *P. fasciatus* da população do Córrego Alambari (22°27′6″S 49°14′25″W). Os procedimentos de amostragem, manutenção e análise dos animais (Figura 1) foram realizados de acordo com as regras internacionais em experimentação animal seguidas pela Universidade Estadual Paulista (CEEAA/IBB/UNESP, Número de Protocolo 1227). Como os cromossomos B não estão presentes em todos os indivíduos na população, um grande esforço de coleta foi realizado, tendo sido realizadas 9 expedições e coletados 30 animais.



**Figura 1.** (A) Localidade de coleta no Rio Alambari, Piratininga - SP. (B) Processo de coleta dos peixes junto à vegetação marginal com o uso de peneira. (C) Armazenamento dos peixes coletados em caixa d'água com sistema de aeração e controle de temperatura da água. (D) Exemplar de *Psalidodon fasciatus* da população do rio Alambari medindo 6,0 cm.

## 1.3.2 Métodos

# 1.3.2.1 Estimulação de mitoses

A fim de se obter maior frequência de células em divisão mitótica nas preparações cromossômicas, os animais foram mantidos durante 24 a 48 horas em aquários aquecidos a 26 °C antes de serem preparados. Esse método tem se mostrado eficiente e é menos invasivo que o método usualmente empregado com injeção de solução de fermento biológico (Cole & Leavens, 1971).

#### 1.3.2.2 Obtenção dos cromossomos metafásicos mitóticos

Para obtenção dos cromossomos metafásicos mitóticos foi utilizada a técnica proposta por Foresti et al. (1981), com algumas adaptações.

#### 1.3.2.3 Coloração convencional com Giemsa

As preparações cromossômicas foram coradas com solução de Giemsa a 5% em tampão fosfato (pH 6,7) por 5 minutos para visualização ao microscópio.

#### **1.3.2.4 Detecção da heterocromatina constitutiva (Banda C)**

Para obtenção do padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva nos cromossomos e detecção dos cromossomos B nas preparações foi usada a técnica de Bandamento C, descrita originalmente por Sumner (1972), com algumas adaptações.

# 1.3.2.5 Hibridação in situ fluorescente (FISH)

A técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) foi realizada nos casos em que o Bandamento C não foi suficiente para identificar as diferentes variantes de cromossomos B. Para isso, foram utilizadas como sondas sequências presentes nos cromossomos B de *Psalidodon* descritas por Silva et al. (2016) (As51 e DNAr 18S), bem como uma sonda cromossômica do cromossomo B microdissecado de *P. paranae* disponível em nosso laboratório (Silva et al., 2014). Para gerar as sondas, foi realizada a PCR incluindo digoxigenina-11-dUTP (Roche) ou biotina-16-dUTP (Roche) na reação. A FISH foi realizada de acordo com os procedimentos descritos por Pinkel et al. (1986) sob condições de alta estringência. A detecção dos sítios de hibridação foi realizada com anti digoxigenina

rodamina (Roche) e/ou avidina-FITC (Roche) e os cromossomos foram contracorados com DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) (Vector Laboratories).

# 1.3.2.6 Estudos cariotípicos

As lâminas foram analisadas em fotomicroscópio óptico de fluorescência (Olympus BX61) e as imagens foram capturadas usando o programa CellSens Dimension (Olympus). A composição final das imagens foi realizada usando o software editor de imagem Adobe Photoshop CS6.

# 1.3.2.7 Extração de DNA genômico

O DNA genômico dos exemplares analisados foi extraído a partir de fragmentos de fígado com a utilização do Kit NucleoSpin<sup>®</sup> Tissue Columns, Collection Tubes (2ml) e tratadas com RNase A (20 mg/ml – Invitrogen) para remoção do RNA residual das amostras. A integridade dos produtos gerados foi checada em gel de agarose 1%.

# 1.3.2.8 Análise de conteúdo gênico das variantes do cromossomo B por qPCR

Foram utilizados *primers* (Tabela S1) desenhados para a variante *BpM* de *P*. *paranae* (Silva et al., 2021) para quantificar a abundância dos genes testados no genoma de *P. fasciatus* em indivíduos 0B e +B, sendo analisados três indivíduos de cada grupo, checados previamente por citogenética.

Para obtenção da quantificação relativa (RQ) dos genes alvo foi utilizado o método  $2^{-\Delta Ct}$  (Bel et al., 2011). Para isso foi utilizado o gene autossômico de cópia única hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase (*hprt1*) como gene de referência. Desta forma, se o gene alvo não estiver presente no cromossomo B, espera-se uma RQ estatisticamente igual entre os grupos 0B e +B. Caso o gene alvo esteja presente no cromossomo B, espera-se que os grupos +B tenham RQ maior que os grupos 0B. Os ensaios de qPCR foram realizados com auxílio do termociclador StepOne Real-Time PCR Systems (Life Technologies). Os genes alvos e o gene de referência foram analisados simultaneamente em triplicatas técnicas e biológicas independentes. As reações foram realizadas com volume final de 10 µL, com 3 ng de gDNA, 5 µL de µL Power SYBR<sup>TM</sup> Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, USA) e 1 µl de cada *primer* a 5 µM. As condições de termociclagem utilizadas foram uma aplicação a 95 °C por 10 minutos; 45

ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. A especificidade dos produtos amplificados foi confirmada pela análise da curva de dissociação.

#### 1.3.2.9 Análises estatísticas

As comparações de dois grupos foram realizadas por estatística estimativa utilizando o método de plotagem Gardner-Altman, seguindo o design de Gardner e Altman implementado em https://www.estimationstats.com/ (Ho et al., 2019). Para verificar se houve predominância de cromossomos B em um dos sexos foi utilizado o teste de contingência de chi-quadrado com a aplicação do software GraphPad Prism 9.

# 1.4 Resultados

# 1.4.1 Variabilidade cariotípica e presença de cromossomos B em *P. fasciatus* do Rio Alambari

Na população de *P. fasciatus* do Rio Alambari, foi observada uma alta variabilidade cariotípica, com indivíduos apresentando 2n=45+B, 2n=46, 2n=46+B e 2n=46+2B (Tabela S2), tendo sido encontradas três variantes de cromossomos B (Figura 2), que foram identificadas conforme classificação proposta por Silva et al. (2016). Nos indivíduos portadores de cada variante (oito de 16 machos e quatro de 9 fêmeas), elas estavam presentes em 100% das células. A variante metacêntrica grande *BfMa* possui um padrão peculiar de heterocromatina em bandas, presença de DNA ribossomal 18S na região terminal do braço curto e DNA satélite As-51 na região intersticial do braço longo (Figura 3). Já a variante submetacêntrica de tamanho médio *Bfst* apresenta natureza totalmente heterocromática. Foi encontrado um indivíduo contendo ambas as variantes. Também foi encontrada uma variante metacêntrica grande *BfMb*, que apresentou natureza inteiramente heterocromática. No entanto, esta variante foi encontrada apenas em um indivíduo e não foi possível realizar experimentos de FISH para verificar a presença de sequências previamente descritas em Silva et al. (2016).



**Figura 2**. Cromossomos metafásicos de *Psalidodon fasciatus* portadores de variantes de cromossomos B após Bandamento C. Notar as diferenças de padrão heterocromático e da morfologia entre as variantes. Barra =  $10 \mu m$ .



**Figura 3**. Metáfase de *Psalidodon fasciatus* com variante *BfMa* após aplicação da técnica de FISH com sonda de DNAr 18S e DNA satélite As51. Barra =  $10 \mu m$ .

# 1.4.2 Genes presentes na variante BfMa de P. fasciatus

Foi analisado o conteúdo gênico da variante *BfMa*. Devido à alta variabilidade cariotípica da população, optamos por comparar três indivíduos sem cromossomo B com 2n=46 com três indivíduos 2n=45+B. Análises cariotípicas mostraram que em todos os indivíduos 45+B o par 10 submetacêntrico encontra-se sem seu homólogo. Dentre as

amostras obtidas, esta foi a melhor configuração possível para a realização das análises, de forma que caso um gene apresentasse quantificação relativa maior nos indivíduos do grupo com B, ela somente poderia ser atribuída a sua presença neste cromossomo, já que este grupo apresenta um cromossomo a menos que o grupo 0B.

De acordo com os resultados da qPCR, o teste de plotagem de Gardner-Altman mostrou que oito dos 13 genes analisados estão presentes na variante *BfMa (amhr2, ccpg1, cia30, g2e3, msh4, nobox, nusap1* e *sbno2*), uma vez que indivíduos portadores de B apresentaram valores de RQ significativamente mais altos do que aqueles 0B (Tabela 1). Desses oito genes, seis são compartilhados na variante *BfMb*. Dado que o genoma de *P. fasciatus* (Rio Alambari) contêm cerca de 23 pares cromossômicos, a probabilidade de um dado gene ser contido em um cromossomo extra é 1/23 = 0,043, assumindo que todos os cromossomos seriam do mesmo tamanho, o que claramente não ocorre, embora quando se considera o genoma médio isso possa ser uma suposição válida. Usando essa estimativa, verificou-se que a probabilidade binomial do cromossomo *BfMa* carregar seis dos nove GCPs encontrados no cromossomo *BfMb* por simples acaso mostrou-se extremamente baixa (P = 4,96 x 10<sup>-7</sup>). Portanto, a similaridade do conteúdo gênico entre estas variantes não pode ser explicada por apenas pelo acaso.

BfMa				$BfMb^1$			
Gene	Diferença da média	ICI	ICS	P Valor	Validado <sup>2</sup>	Validado <sup>2</sup>	Função
amhr2	15.5	12.6	19.2	0.0018	Sim	Sim	Desenvolvimento gonadal
ccpgl	0.277	0.0867	0.44	0.073	Sim	Não	Ciclo celular
cia30	3.71	2.58	4.84	0.0674	Sim	Sim	Mitocondrial
g2e3	7.63	4.29	9.92	0.0114	Sim	Sim	Ciclo celular
hem2	0.09	-0.01	0.213	0.104	Não	Não	Biossíntese
mdm2	-0.0433	-0.39	0.393	0.781	Não	Sim	Regulação indireta do ciclo celular
mot1	0.0767	-0.277	0.417	0.648	Não	Não	Transporte
msh4	1.37	1.26	1.49	0.00005	Sim	Sim	Ciclo celular
nobox	0.0833	0.0433	0.107	0.0127	Sim	Não	Ciclo celular
nusap	3.37	1.88	4.24	0.0119	Sim	Sim	Ciclo celular
rnf17	0.0001	-0.000133	0.000267	0.359	Não	Sim	Regulação indireta do ciclo celular
sbno2	2.15	1.79	2.54	0.0007	Sim	Sim	Corregulador transcricional
simc1	0.22	0.0267	0.413	0.101	Não	Sim	Fator de transcrição

**Tabela 1.** Análises estatísticas dos genes testados em indivíduos 0B e 1B de *Psalidodon fasciatus*.

Onde: ICI = Valor inferior do intervalo de confiança. ICS = Valor superior do intervalo de confiança. <sup>1</sup>Dados de Silva et al. (2021). <sup>2</sup>Foram considerados validados os genes nos quais o intervalo de confiança não envolve o valor zero (valor da média normalizada do grupo controle 0B) segundo Ho et al. (2019). O valor de P serve como referência complementar para a avaliação da significância do teste T de Student.

# 1.5 Discussão

Como já mostrado em diversos estudos, *P. fasciatus* é considerada um complexo de espécies de peixes do gênero *Psalidodon* com número diplóide que varia de 46 a 50 cromossomos, apresentando variações intrapopulacionais (Pazza et al., 2008; Kavalco et al., 2016; Pazza et al., 2017). Neste trabalho, mostramos que a população de *P. fasciatus* do Rio Alambari apresenta uma diversidade cariotípica com variações no número diplóide que incluem três diferentes variantes de cromossomos B. Dentre as variantes encontradas nesta população, é interessante destacar que a variante *BfMa* também foi identificada na população do córrego Águas de Madalena por Silva et al. (2016), estando separadas em água por mais de 247 km de distância. A presença desta variante em duas populações tão distantes poderia reforçar a hipótese de Silva et al. (2021) de que estes cromossomos estariam presentes na espécie desde o seu processo de especiação. Neste sentido, considerando que ambas as populações se encontram em componentes da bacia hidrográfica do Rio Paranapanema, pode-se especular que esta variante poderia também ser encontrada em outras populações de *P. fasciatus* da mesma bacia.

Enquanto a variante *BfMa* possui bandas de heterocromatina diferencialmente distribuídas entre seus braços, a variante *BfMb* é um isocromossomo de natureza inteiramente heterocromática. No presente estudo foram identificados oito GCPs na variante *BfMa*, enquanto Silva et al. (2021) encontraram 11 genes em *BfMb* da população do Córrego das Araras, sendo que seis desses genes são compartilhados entre as duas variantes. Esse compartilhamento de sequências revela uma relação evolutiva muito interessante, visto que é altamente improvável que ambas as variantes tenham se originado de modo independente e adquirido posteriormente um mesmo conjunto de genes. Dessa forma, a hipótese mais parcimoniosa para explicar a presença desses genes em comum seria a de que ambas as variantes possuam uma origem comum, mas que, ao longo do processo de diversificação tenham se diferenciado ao ponto de perder ou adquirir genes exclusivos, seguindo caminhos evolutivos distintos. Esta é a primeira vez em que o conteúdo gênico de duas variantes de

cromossomo B é comparada dentro de uma mesma espécie. É também interessante notar que nas análises de conteúdo gênico de *BfMa* (presente estudo) e de *BfMb* (Silva et al., 2021) por qPCR foram utilizados *primers* desenhados para a variante *BpM* de *P. paranae*, em que foram encontrados 20 GCPs. Dessa forma, é possível que genes que não apresentaram valores maiores de RQ em indivíduos B+ tenham sofrido alterações na região em que os *primers* foram desenhados para anelar. Portanto, futuras análises de NGS podem encontrar outros GCPs nessas variantes e melhor elucidar as relações evolutivas entre as variantes de cromossomo B de *Psalidodon*.

Como já relatado anteriormente e discutido na literatura, a presença de genes relacionados ao ciclo celular parece ser um fator importante para o sucesso evolutivo dos cromossomos B (Ruiz-Ruano et al., 2019; Park et al., 2019; Ahmad et al., 2020). É interessante observar que os genes cia30, g2e3, msh4, nusap1 e sbno2 estão presentes em nas variantes BfMa, BfMb e também nas variantes metacêntricas grandes de P. paranae, P. scabripinnis e P. bockmanni analisadas por Silva et al. (2021). Apesar de dados recentes mostrarem que estes cromossomos não apresentam taxas de transmissão acima de 50% em P. paranae (Goes et al., 2021), é possível especular que estes genes em comum tenham tido um papel essencial no sucesso evolutivo destes cromossomos durante o seu processo de formação e manutenção, considerando que três deles (g2e3, msh4 e nusap1) estão relacionados a funções do ciclo celular. Pode ser evidenciado ainda que a variante BfMa também compartilha uma origem comum ocorrida a cerca de 4 milhões de anos com as variantes analisadas por Silva et al. (2021), ainda que a variante BfMa tenha sofrido maiores alterações na sua macroestrutura, chegando a não ser considerada um isocromossomo perfeito, como ocorre com as variantes descritas por Silva et al. (2016, 2017). Portanto, apesar de eventos de hibridação interespecífica terem sido relatados entre P. fasciatus e P. paranae (Pinheiro et al., 2019), os cromossomos B dessas espécies acumularam diversas modificações que permitem descartar a hipótese de surgimento desses elementos genômicos em decorrência de processo de hibridação recente, diferentemente do que já foi relatado para outras espécies (McAllister & Werren, 1997; Tosta et al., 2015).

# 1.6 Conclusões

A variante *BfMa* de cromossomo B de *P. fasciatus* compartilha uma origem comum com outras quatro variantes encontradas entre as espécies portadoras deste elemento genômico

no gênero *Psalidodon* analisadas na literatura. Tal afirmação é sustentada pelo compartilhamento de pelo menos cinco genes entre as variantes, o que não poderia ser explicado apenas pelo acaso. Além disso, o acúmulo de diferenças no conteúdo gênico, somadas às diferenças macroestruturais observadas nas comparações com as demais variantes, apresentam-se como fortes elementos para refutar a hipótese de surgimento da variante *BfMa* pela ocorrência de hibridação interespecífica recente.

# 1.7 Referências

AHMAD, S.F.; JEHANGIR, M.; CARDOSO, A.L.; WOLF, I.R.; MARGARIDO, V.P.; CABRAL-de-MELLO, D.C. et al. B chromosomes of multiple species have intense evolutionary dynamics and accumulated genes related to important biological processes. **BMC genomics**, v. 21, n. 1, p. 1-25, 2020.

AHMAD, S.F.; MARTINS, C. The modern view of B chromosomes under the impact of high scale omics analyses. **Cells**, v. 8, n. 2, p. 156, 2019.

AKERA, T.; CHMÁTAL, L.; TRIMM, E.; AONBANGKHEN, C.; CHENOWETH, D. M.; JANKE, C. et al. Spindle asymmetry drives non-Mendelian chromosome segregation. **Science**, v. 358, n. 6363, p. 668-672, 2017.

ARTONI, R.F.; SHIBATTA, O.A.; GROSS, M.C.; SCHNEIDER, C.H.; ALMEIDA, M.C.; VICARI, M.R. et al. *Astyanax aff. fasciatus* Cuvier, 1819 (Teleostei; Characidae): evidences of a species complex in the upper rio Tibagi basin (Paraná, Brazil). **Neotropical Ichthyology**, v. 4, n. 2, p. 197-202, 2006.

BEL, Y.; FERRÉ, J.; ESCRICHE, B. Quantitative real-time PCR with SYBR Green detection to assess gene duplication in insects: study of gene dosage in *Drosophila melanogaster* (Diptera) and in *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera). **BMC Research notes**, v. 4, n. 1, p. 1-8, 2011.

BLAVET, N.; YANG, H.; SU, H.; SOLANSKÝ, P.; DOUGLAS, R.N.; KARAFIÁTOVÁ, M. et al. Sequence of the supernumerary B chromosome of maize provides insight into its drive mechanism and evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 118, n. 23, 2021.

BURT, A.; TRIVERS, R. Genes in conflict: the biology of selfish genetic elements. Harvard University Press, 2006.

CAMACHO, J.P.M.B chromosomes. In: **The evolution of the genome**. Academic Press, 2005. p. 223-286.

CASTRO, J.P.; HATTORI, R.S.; YOSHINAGA, T.T.; SILVA, D.M.Z.A.; FORESTI, F.; SANTOS, M.H. et al. Differential expression of dmrt1 in *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidade) is correlated with B chromosome occurrence. **Zebrafish**, v. 16, n. 2, p. 182-188, 2018.

CASTRO, J.P.; HATTORI, R.S.; YOSHINAGA, T.T.; SILVA, D.M.Z.A.; RUIZ-RUANO, F.J.; FORESTI, F. et al. Differential expression of genes related to sexual determination can

modify the reproductive cycle of *Astyanax scabripinnis* (Characiformes: Characidae) in b chromosome carrier individuals. **Genes**, v. 10, n. 11, p. 909, 2019.

CLARK, F.E.; KOCHER, T.D. Changing sex for selfish gain: B chromosomes of Lake Malawi cichlid fish. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-10, 2019.

COLE, C.J.; LEAVENS, C.R. Chromosome preparations of amphibians and reptiles: improved technique. **Herpetol. Rev**, v. 3, n. 6, p. 102, 1971.

COLEMAN, J.J.; ROOUNSLEY, S.D.; RODRIGUEZ-CARRES, M.; KUO, A.; WASMANN, C.C.; GRIMWOOD, J. et al. The genome of *Nectria haematococca*: contribution of supernumerary chromosomes to gene expansion. **PLoS genetics**, v. 5, n. 8, p. e1000618, 2009.

DALLA BENETTA, E.; ANTOSHECHKIN, I.; YANG, T.; NGUYEN, H.Q.M.; AKBARI, O.S. Genome elimination mediated by gene expression from a selfish chromosome. **Science advances**, v. 6, n. 14, p. eaaz9808, 2020.

DANIEL-SILVA, M.F.Z; TOLEDO, L.F.A. Chromosome R-banding pattern and conservation of a marker chromosome in four species, genus *Astyanax* (Characidae, Tetragonopterinae). **Caryologia**, v. 54, n. 3, p. 209-215, 2001.

DHERAWATTANA, A.; SADANAGA, K. Cytogenetics of a Crown Rust-Resistant Hexaploid Oat with 42+ 2 Fragment Chromosomes 1. **Crop Science**, v. 13, n. 6, p. 591-594, 1973.

FORESTI, F.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; TOLEDO, S.A. Polymorphic nature of nucleolus organizer regions in fishes. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 31, n. 3, p. 137-144, 1981.

FORESTI, F.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; TOLEDO, S.A. Supernumerary chromosome system, C-banding pattern characterization and multiple nucleolus organizer regions in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Pisces, Characidae). **Genetica**, v. 79, n. 2, p. 107-114, 1989.

FRICKE R., ESCHMEYER W.N., VAN DER LAAN, R. (2021). Eschmeyer's Catalog offishes:genera,species,references.Disponívelem:<https://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp.>Acesso em: 06 Jan 2022.

GAVAZZONI, M.; PAIZ, L.M.; OLIVEIRA, C.A.M.; PAVANELLI, C.S.; GRAÇA, W.J.; MARGARIDO, V.P. Morphologically cryptic species of the *Astyanax bimaculatus* "caudal peduncle spot" subgroup diagnosed through cytogenetic characters. **Zebrafish**, v. 15, n. 4, p. 382-388, 2018.

GOES, C.A.G.; SILVA, D.M.Z.A.; UTSUNOMIA, R.; NASCIMENTO, N.F.; YASUI, G.S.; SENHORINI, J.A. et al. Sex-Dependent Inheritance of B Chromosomes in *Psalidodon paranae* (Teleostei, Characiformes) Revealed by Directed Crossings. **Zebrafish**, v. 18, n. 6, p. 363-368, 2021.

GRAPHODATSKY, A.S.; KUKEKOVA, A.V.; YUDKIN, D.V.; TRIFONOV, V.A.; VOROBIEVA, N.V.; BEKLEMISHEVA, V.R. et al. The proto-oncogene C-KIT maps to canid B-chromosomes. **Chromosome Research**, v. 13, n. 2, p. 113-122, 2005.

HEWITT, G.M. Meiotic drive for B-chromosomes in the primary oocytes of *Myrmekotettix maculatus* (Orthoptera: Acrididae). **Chromosoma**, v. 56, n. 4, p. 381-391, 1976.

HO, J.; TUMKAYA, T.; ARYAL, S.; CHOI, H.; CLARIDGE-CHANG, A. Moving beyond P values: data analysis with estimation graphics. **Nature methods**, v. 16, n. 7, p. 565-566, 2019.

JACKSON, R.C.; NEWMARK, P. Effects of supernumerary chromosomes on production of pigment in *Haplopappus gracilis*. Science, v. 132, n. 3436, p. 1316-1317, 1960.

JONES, N. New species with B chromosomes discovered since 1980. The Nucleus, v. 60, n. 3, p. 263-281, 2017.

KAVALCO, K.F.; PAZZA, R.; BRANDÃO, K.O.; GARCIA, C.; BERTOLLO, L.A.C.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F. Chromosomal diversification higher than molecular variation in *Astyanax aff. fasciatus* (Teleostei, Characidae). **Zebrafish**, v. 13, n. 4, p. 345-353, 2016.

KAYANO, H. Cytogenetic studies in Lilium callosum III. Preferential segregation of a supernumerary chromosome in EMCs. **Proceedings of the Japan Academy**, v. 33, n. 9, p. 553-558, 1957.

LEACH, C.R.; HOUBEN, A.; FIELD, B.; PISTRICK, K.; DEMIDOV, D. TIMMIS, J.N. Molecular evidence for transcription of genes on a B chromosome in *Crepis capillaris*. **Genetics**, v. 171, n. 1, p. 269-278, 2005.

MAISTRO, E.L.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F. Occurrence of macro B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* paranae (Pisces, Characiformes, Characidae). **Genetica**, v. 87, n. 2, p. 101-106, 1992.

MAKUNIN, A.I.; DEMENTYEVA, P.V.; GRAPHODATSKY, A.S.; VOLOBOUEV, V.T.; KUKEKOVA, A.V.; TRIFONOV, V.A. Sequencing of supernumerary chromosomes of red fox and raccoon dog confirms a non-random gene acquisition by B chromosomes. **Genes**, v. 9, n. 8, p. 405, 2018.

MARTIS, M.M.; KLEMME, S.; BANAEI-MOGHADDAM, A.M.; BLATTNER, F.R.; MACAS, J.; SCHMUTZER, T. et al. Selfish supernumerary chromosome reveals its origin as a mosaic of host genome and organellar sequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 33, p. 13343-13346, 2012.

MCALLISTER, B.F.; WERREN, J.H. Hybrid origin of a B chromosome (PSR) in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. **Chromosoma**, v. 106, n. 4, p. 243-253, 1997.

MIZOGUCHI, S.M.H.N.; MARTINS-SANTOS, I.C. Macro-and microchromosomes B in females of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Hereditas**, v. 127, n. 3, p. 249-253, 1997.

MOREIRA-FILHO, O. Astyanax scabripinnis (Pisces, Characidae): a species complex. **Brazil Journal of Genetics**, v. 14, p. 331-357, 1991.

MOREIRA-FILHO, O.; GALETTI JR, P.M.; BERTOLLO, L.A.C. B chromosomes in the fish *Astyanax scabripinnis* (Characidae, Tetragonopterinae): An overview in natural populations. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 106, n. 2-4, p. 230-234, 2004.

NAVARRO-DOMÍNGUEZ, B.; RUIZ-RUANO, F.J.; CABRERO, J.; CORRAL, J.M.; LÓPEZ-LEÓN, M.D.; SHARBEL, T.F. et al. Protein-coding genes in B chromosomes of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. Scientific reports, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2017.

OLIVEIRA, C.; FORESTI, F.; HILSDORF, A.W.S. Genetics of neotropical fish: from chromosomes to populations. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 35, n. 1, p. 81-100, 2009.

ORNELAS-GARCÍA, C.P.; DOMÍNGUEZ-DOMÍNGUEZ, O.; DOADRIO, I. Evolutionary history of the fish genus *Astyanax* Baird & Girard (1854)(Actinopterygii, Characidae) in Mesoamerica reveals multiple morphological homoplasies. **BMC** evolutionary biology, v. 8, n. 1, p. 1-17, 2008.

OSTERGREN, G. Parasitic nature of extra fragment chromosomes. **Bot. Not.**, v. 2, p. 157-163, 1945.

PANSONATO-ALVES, J.C.; HILSDORF, A.W.S.; UTSUNOMIA, R.; SILVA, D.M.Z.A.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Chromosomal Mapping of Repetitive DNA and Cytochrome C Oxidase I Sequence Analysis Reveal Differentiation among Sympatric Samples of *Astyanax fasciatus* (Characiformes, Characidae). **Cytogenetic and genome research**, v. 141, n. 2-3, p. 133-142, 2013.

PARK, D.; KIM, J.H.; KIM, N.S. De novo transcriptome sequencing and gene expression profiling with/without B-chromosome plants of *Lilium amabile*. Genomics & informatics, v. 17, n. 3, 2019.

PAZZA, R.; CRUVINEL, L.A.; KAVALCO, K.F. Parallel evolution evidenced by molecular data in the banded-tetra (*Astyanax fasciatus*). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 70, p. 141-146, 2017.

PAZZA, R.; KAVALCO, S.A.F.; PENTEADO, P.R.; KAVALCO, K.F.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F. The species complex *Astyanax fasciatus* Cuvier (Teleostei, Characiformes)– a multidisciplinary approach. **Journal of Fish Biology**, v. 72, n. 8, p. 2002-2010, 2008.

PINHEIRO, A.P.B.; MELO, R.M.C.; TEIXEIRA, D.F.; BIRINDELLI, J.L.O.; CARVALHO, D.C.; RIZZO, E. Integrative approach detects natural hybridization of sympatric lambaris species and emergence of infertile hybrids. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-12, 2019.

PINKEL, D; STRAUME, T.; GRAY, J.W. Cytogenetic analysis using quantitative, highsensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 83, n. 9, p. 2934-2938, 1986.

POKORNÁ, M.J.; REIFOVÁ, R. Evolution of B Chromosomes: From Dispensable Parasitic Chromosomes to Essential Genomic Players. **Frontiers in genetics**, v. 12, p. 727570-727570, 2021.

REIS, R.E.; ALBERT, J.S.; DI DARIO, F.; MINCARONE, M.M.; PETRY, P.; ROCHA, L.A. Fish biodiversity and conservation in South America. **Journal of fish biology**, v. 89, n. 1, p. 12-47, 2016.

RHOADES, M.M.; MCCLINTOCK, B. The cytogenetics of maize. **The Botanical Review**, v. 1, n. 8, p. 292-325, 1935.

ROSSINI, B.C.; OLIVEIRA, C.A.M.; MELO, F.A.G.; BERTACO, V.A.; ASTARLOA, J.M.D.; ROSSO, J.J. et al. Highlighting *Astyanax* species diversity through DNA barcoding. **Plos one**, v. 11, n. 12, p. e0167203, 2016.

RUBAN, A.; SCHMUTZER, T.; SCHOLZ, U.; HOUBEN, A. How next-generation sequencing has aided our understanding of the sequence composition and origin of B chromosomes. **Genes**, v. 8, n. 11, p. 294, 2017.

RUBAN, A.; SCHMUTZER, T.; WU, D.D.; FUCHS, J.; BOUDICHEVSKAIA, A.; RUBTSOVA, M. et al. Supernumerary B chromosomes of *Aegilops speltoides* undergo precise elimination in roots early in embryo development. **Nature communications**, v. 11, n. 1, p. 1-12, 2020.

RUIZ-RUANO, F.J.; NAVARRO-DOMÍNGUEZ, B.; LÓPEZ-LEÓN, M.D.; CABRERO, J.; CAMACHO, J.P.M. Evolutionary success of a parasitic B chromosome rests on gene content. **bioRxiv**, p. 683417, 2019.

SILVA, D.M.Z.A.; DANIEL, S.N.; CAMACHO, J.P.M.; UTSUNOMIA, R.; RUIZ-RUANO, F.J.; PENITENTE, M. et al. Origin of B chromosomes in the genus *Astyanax* (Characiformes, Characidae) and the limits of chromosome painting. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 291, n. 3, p. 1407-1418, 2016.

SILVA, D.M.Z.A.; PANSONATO-ALVES, J.C.; UTSUNOMIA, R.; ARAYA-JAIME, C.; RUIZ-RUANO, F.J.; DANIEL, S.N. et al. Delimiting the origin of a B chromosome by FISH mapping, chromosome painting and DNA sequence analysis in *Astyanax paranae* (Teleostei, Characiformes). **PLoS One**, v. 9, n. 4, p. e94896, 2014.

SILVA, D.M.Z.A.; RUIZ-RUANO, F.J.; UTSUNOMIA, R.; MARTÍN-PECIÑA, M.; CASTRO, J.P.; FREIRE, P.P. et al. Long-term persistence of supernumerary B chromosomes in multiple species of *Astyanax* fish. **BMC biology**, v. 19, n. 1, p. 1-17, 2021.

SILVA, D.M.Z.A.; UTSUNOMIA, R.; RUIZ-RUANO, F.J.; DANIEL, S.N.; PORTO-FORESTI, F.; HASHIMOTO, D.T. et al. High-throughput analysis unveils a highly shared satellite DNA library among three species of fish genus *Astyanax*. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2017.

SUMNER, A.T.A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Exp.** Cell Res., v. 75, p. 304-306, 1972.

TERÁN, G.E.; BENITEZ, M.F.; MIRANDE, J.M. Opening the Trojan horse: phylogeny of *Astyanax*, two new genera and resurrection of *Psalidodon* (Teleostei: Characidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 190, n. 4, p. 1217-1234, 2020.

TOSTA, V.C.; MARTHE, J.B.; TAVARES, M.G.; FERNANDES-SALOMÃO, T.M.; POMPOLO, S.G.; RECCO-PIMENTEL, S.M. et al. Possible introgression of B chromosomes between bee species (genus *Partamona*). Cytogenetic and Genome Research, v. 144, n. 3, p. 220-226, 2015.

TRIFONOV, V.A.; DEMENTYEVA, P.V.; LARKIN, D.M.; O'BRIEN, P.C.M.; PERELMAN, P.L.; YANG, F. et al. Transcription of a protein-coding gene on B chromosomes of the Siberian roe deer (*Capreolus pygargus*). **BMC biology**, v. 11, n. 1, p. 1-11, 2013.

VALENTE, G.T.; CONTE, M.A.; FANTINATTI, B.E.A.; CABRAL-de-MELLO, D.C.; CARVALHO, R.F.; VICARI, M.R. et al. Origin and evolution of B chromosomes in the cichlid fish *Astatotilapia latifasciata* based on integrated genomic analyses. **Molecular biology and evolution**, v. 31, n. 8, p. 2061-2072, 2014.

VALENTE, G.T.; NAKAJIMA, R.T.; FANTINATTI, B.E.A.; MARQUES, D.F.; ALMEIDA, R.O.; SIMÕES, R.P. et al. B chromosomes: from cytogenetics to systems biology. **Chromosoma**, v. 126, n. 1, p. 73-81, 2017.

VUJOŠEVIĆ, M.; RAJIČIĆ, M.; BLAGOJEVIĆ, J. B chromosomes in populations of mammals revisited. **Genes**, v. 9, n. 10, p. 487, 2018.

WILSON, E.B. The supernumerary chromosomes of Hemiptera. Science, NY, v. 26, p. 870-871, 1907.

ZURITA, S.; CABRERO, J.; LÓPEZ-LEÓN, M.D.; CAMACHO, J.P.M. Polymorphism regeneration for a neutralized selfish B chromosome. **Evolution**, v. 52, n. 1, p. 274-277, 1998.

# **Capítulo 2 - Efeitos do cromossomo B na expressão de genes de diferenciação sexual em** *Psalidodon paranae*

# 2.1 Introdução

Em vertebrados, o processo de diferenciação sexual é determinado por uma cascata de múltiplos genes (Herpin & Schartl, 2015). No entanto, apesar de a maquinaria genética iniciadora ser diversa entre as espécies, os componentes afetados por essa cascata parecem ser evolutivamente conservados e geralmente convergem para a regulação de alguns agentes centrais (Herpin & Schartl, 2015; Capel, 2017). Em geral, a via de diferenciação masculina começa com maior expressão dos genes *sox9*, *sf1*, *fgf9*, *amh* e *dmrt1*, sendo este último um dos mais importantes para levar a diferenciação do sexo masculino e suprimir a via feminina (Herpin & Schartl, 2015). Quanto as vias de diferenciação feminina, duas vias diferentes podem ocorrer, envolvendo os genes *foxl2* e *esr1,2* ou os genes *rspo1*, *wnt4*, e *fst* (Herpin & Schartl, 2015; Martinez-Bengochea et al., 2020).

Apesar dos diversos fatores que podem regular o processo de determinação sexual (temperatura, oxigênio, pH e outros), os hormônios esteroides sexuais, principalmente os estrógenos, são considerados os principais indutores de diferenciação sexual (Guiguen et al., 2010; Martinez-Bengochea et al., 2020). A produção e ação desses hormônios estão diretamente ligadas com a produção da enzima aromatase gonadal (codificada pelo gene *cyp19a1a*), que converte andrógenos em estrógenos, e a produção de receptores celulares de estrógenos, codificados pelos genes esr1,2 (Guiguen et al., 2010). O gene cyp19a1a é ativado por um fator de transcrição codificado pelo gene *foxl2*, através da ligação a um motif específico na região do promotor deste gene (Wang et al., 2007). Os efeitos dos estrógenos são amplamente registrados entre os vertebrados, e a administração exógena desses hormônios pode levar a reversão sexual de machos para fêmeas (Piferrer, 2001; Kobayashi et al. 2003). Neste mesmo sentido, tratamentos que levam a inibição de atividade da enzima aromatase levam a reversão de fêmeas para machos (Guiguen et al., 1999). Apesar de a expressão do gene cyp19a1a ser mais importante durante o período de diferenciação sexual molecular (Li et al., 2019), os hormônios estrógenos são importantes também para manter a diferenciação sexual da gônada (Ogawa et al., 2008; Kitano et al., 2007; Guiguen et al., 2010). Por exemplo, Nakamura et al. (2003) demostraram em fêmeas de tilápia que, mesmo após diferenciação sexual, um tratamento inibidor de aromatase induz masculinização parcial, mas funcional, da gônada.

Os cromossomos B são elementos adicionais ao genoma e estão presentes em parte dos indivíduos de uma espécie. Apesar de a priori terem sido denominados elementos inertes

do genoma (Rhoades & McClintock, 1935), esses cromossomos são capazes de influenciar processos celulares complexos a seu favor (Dalla Benetta et al., 2020; Imarazene et al., 2021). Desta forma, apesar de em alguns casos conferirem benefício aos indivíduos portadores (Dherawattana & Satanaga, 1973; Coleman et al., 2009), são considerados pela literatura atual como elementos parasitas egoístas (Martis et al., 2012; Houben et al., 2014; Li et al., 2017; Dalla Benetta et al., 2020). Esses cromossomos podem também estar intimamente relacionados a vias de determinação sexual, como já foi relatado em *Astyanax mexicanus* (Imarazene et al., 2021), *Metriaclima lombardoi* (Clark & Kocher, 2019) e Nasonia vritripennis (Dalla-Benetta et al., 2020). Em alguns casos, os cromossomos B podem ter tido origem a partir de cromossomos sexuais (Serrano-Freitas et al., 2020), ou terem dado origem a estes (Nokkala et al., 2003).

Desde os primeiros estudos de cromossomo B no gênero *Psalidodon*, é sabido que os cromossomos B do gênero podem estar preferencialmente associados a um dos sexos (Maistro et al., 1992). Em P. scabripinnis foi demonstrado que em diversas populações o cromossomo B metacêntrico grande é preferencialmente encontrado em fêmeas (Maistro et al., 1992; Salvador & Moreira-Filho, 1992; Maistro et al., 1994; Vicente et al., 1996; Mizoguchi & Martins-Santos, 1997). Ainda, Rocon-Stange & Almeida-Toledo (1993) encontraram um microcromossomo B que está restrito a machos da espécie. Em P. paranae, espécie que faz parte do complexo de *P. scabripinnis*, foram analisados até então apenas os cromossomos B de três populações. Em todas as populações, a frequência de cromossomos B em fêmeas é maior (Maistro et al., 1992; Maistro et al., 1994; Porto-Foresti et al., 1997; Silva et al., 2014; presente estudo). No entanto, na população do Rio Cascatinha, Porto-Foresti et al. (1997) observaram que essa maior frequência está restrita aos indivíduos que habitam a nascente (65%), sendo que nos outros dois pontos amostrados a frequência de cromossomos B foi de 10%. Além disso, na população do Rio Capivara, foi observada uma maior proporção de fêmeas (Silva et al., 2014), sendo que este desvio poderia ser explicado por uma influência dos cromossomos na determinação sexual feminina.

Apesar de a presença de cromossomos B associados a distorção sexual ser bem evidenciada em literatura, poucos trabalhos buscaram analisar em peixes quais genes relacionados com as vias de diferenciação sexual possam estar sendo diferencialmente expressos devido à presença deste cromossomo. Neste sentido, Castro et al. (2018, 2019) demonstraram que em *P. scabripinnis* a presença de cromossomos B causa subexpressão do gene *foxl2* em fêmeas, e sobrexpressão do gene *dmrt1* em machos, o que os autores propõem

ser um efeito adaptativo deste cromossomo, pois leva a uma expansão do período reprodutivo destes indivíduos, aumentando o número da prole e a chance de ocorrerem cruzamentos entre indivíduos +B. Em *P. paranae* Silva et al. (2021) analisaram que o gene *nobox*, presente no cromossomo B, encontra-se sobre expresso, sendo que mais de 70% da expressão de genes B-específicos são deste gene. Este perfil de expressão dos cromossomos B é um forte indício de manipulação no desenvolvimento das gônadas, visto que o gene *nobox* possui um papel importante no processo de oogênese. Desta forma, a fim de elucidar como os cromossomos B podem influenciar na diferenciação do sexo, o presente trabalho teve como objetivo verificar se existe expressão diferencial de genes da via sexual entre indivíduos adultos 0B e +B de *P. paranae*.

#### 2.2 Material e métodos

#### 2.2.1 Coleta e análises cariotípicas

Foram analisados indivíduos de *P. paranae* da população do Ribeirão Cascatinha (22°53'30"S 48°28'36"W). Todos os procedimentos de amostragem, manutenção e análise foram realizados de acordo com as regras internacionais em experimentação animal seguidas pela Universidade Estadual Paulista (CEEAA/IBB/UNESP, Número de Protocolo 1227). A sexagem dos animais foi realizada de acordo com a anatomia da gônada e observação em microscópio óptico. A presença ou ausência de cromossomo B foi determinada através de análises citogenéticas de acordo com Foresti et al. (1981). Para melhor identificação dos cromossomos B foi empregada a técnica de Bandamento C, proposta por Sumner (1972).

#### 2.2.2 Extração de RNA total e conversão para cDNA

Após eutanásia os animais tiveram as gônadas retiradas, congeladas imediatamente em nitrogênio líquido e armazenadas a -70 °C. O RNA total foi extraído utilizando TRIzol<sup>®</sup> (Invitrogen) com purificação em coluna de sílica do kit NucleoSpin<sup>®</sup> Tissue Columns, Collection Tubes (2ml), conforme instruções do fabricante. As amostras foram tratadas com DNaseI (Thermo Fisher Scientific) e a integridade dos produtos gerados foi checada em gel de agarose 1%. A pureza foi checada utilizando Nanodrop One Spectrophotometer e apenas amostras com razão A260/280 entre 1,8-2,0 e A260/230 >2,0 foram utilizadas. O cDNA correspondente a cada amostra foi sintetizado com o uso do kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems), conforme instruções do fabricante.

# 2.2.3 Desenho de Primers para análise de expressão gênica por RT-qPCR

Para análise de expressão por RT-qPCR foram desenhados primers para genes de referência e genes alvo. Foram selecionados genes de referência comumente usados em literatura e que não estão presentes no cromossomo B de *P. paranae* (Silva et al., 2021). Os genes alvo foram selecionados de acordo com Martinez-Bengochea et al. (2020). Os primers foram desenhados em regiões éxon-éxon conservadas (Tabela S3).

# 2.2.4 Análise de expressão gênica – RT-qPCR

A quantificação relativa do número de cópias dos genes analisados foi realizada através do método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak & Schimittgen, 2001). Todos os primers tiveram sua eficiência testada de acordo com Bustin et al. (2009). A análise de estabilidade e escolha dos genes candidatos a genes de referência em cada grupo foi realizada através do algoritmo Normfinder (Andersen et al., 2004). Os ensaios de RT-qPCR foram realizados com auxílio do termociclador QuantStudio<sup>TM</sup> 12K Flex RealTime PCR Systems (Thermo Fisher Scientific, USA). As reações foram realizadas com volume final de 10 µL com 3 ng de cDNA, 5 µL de µL Power SYBR<sup>TM</sup> Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, USA) e 1 µl de cada primer a 3 µM. As condições de termociclagem foram 95 °C por 10 minutos; 45 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. A especificidade dos produtos amplificados foi confirmada pela análise da curva de dissociação.

## 2.2.5 Análise estatística

As comparações de dois grupos foram realizadas por estatística estimativa utilizando o método de plotagem Gardner-Altman seguindo o design de Gardner e Altman implementado em https://www.estimationstats.com/ (Ho et al., 2019). Para verificar se houve predominância de cromossomos B em um dos sexos foi utilizado o teste de contingência de chi-quadrado no software GraphPad Prism 9.

#### 2.3 Resultados

Foram coletados 63 indivíduos de *P. paranae* sendo que 26 de 35 fêmeas e cinco de 28 machos apresentaram cromossomos B metacêntricos grandes heterocromáticos (*BpM*) (Silva et al., 2016) em 100% das células (Tabela S4). Um teste de contingência chi-quadrado mostrou que houve uma frequência significativamente maior de cromossomos B em fêmeas ( $\chi^2 = 23,94$ , df = 1, P = <0,0001).

# 2.3.1 Teste de eficiência dos primers desenhados

Os valores de eficiência de reação para os primers de genes de referência e genes alvo em cada espécie estão descritos na Tabela 1. Todos os primers apresentaram valores de eficiência de reação comparáveis, o que permite o uso do método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  para posterior análise de expressão gênica. Os genes *dmrt1*, *foxl2* e *sox9* em fêmeas de *P. paranae* apresentaram altos valores de Cq em todas as diluições realizadas, e.g. Cq > 33, indicando que sua expressão não é passível de ser detectada mesmo com grande quantidade de cDNA. Assim, inferimos que estes genes apresentam expressão basal ou não são expressos nestes exemplares, o que é corroborado pela não montagem de transcritos destes genes no transcriptoma de fêmeas da espécie montado por Silva et al. (2021).

**Tabela 1.** Valores de eficiência de reação dos *primers* testados em machos e fêmeas de *Psalidodon paranae*.

		Eficiência (%)		
Gene		P. paranae		
		Fêmea	Macho	
	hmbs	101	103	
	tbp	103	109	
Referência	ppiaa	97	97	
	pgk1	98	104	
	hprt	101	104	
	cyp19a1a	100	84	
	dmrt1	Indetectável	100	
Comoia	esr1	99	98	
Sexuals	foxl2	Indetectável	Indetectável	
	sox9	Indetectável	104	
	amh	102	100	

# 2.3.2 Padronização de genes de referência para análise de expressão gênica por RTqPCR

As análises de estabilidade dos genes candidatos a referência mostraram que, entre os grupos 0B e 1B, a combinação dos genes hprt + tbp para ambos os sexos possui os maiores níveis de estabilidade, com valor de 0,22 para fêmeas e 0,41 para machos, de acordo com o

35

algoritmo Normfinder. Para a realização do método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  foi utilizada a média geométrica do Cq dos de ambos os genes.

# 2.3.3 Expressão de genes associados à diferenciação sexual em P. paranae

As análises de RT-qPCR evidenciaram que a presença de cromossomo B induz a expressão diferencial de alguns genes relacionados a diferenciação sexual nas gônadas de *P. paranae*. Em machos, foi observada uma superexpressão dos genes *nobox* e *dmrt1* em indivíduos 1B (Figura 1). Por outro lado, em fêmeas 1B houve uma redução significativa nos níveis de transcritos dos genes *esr1* e *cyp19a1a* e aumento nos níveis do gene *nobox* (Figura 2).



**Figura 1.** Gráficos de estimativa de Gardner-Altman mostrando os níveis de transcrição dos genes sexuais em testículos de indivíduos 0B e 1B de *Psalidodon paranae*, conforme analisado por RT-qPCR. Ambos os grupos são plotados nos eixos esquerdos e a diferença média (tamanho do efeito) é plotada em um eixo flutuante à direita, como uma distribuição de amostragem *bootstrap*. A diferença média é representada como um ponto preto e o intervalo de confiança de 95% é indicado pelas extremidades da barra de erro vertical. NREQ = *Normalized Relative Expression Quantity*.



**Figura 2.** Gráficos de estimativa de Gardner-Altman mostrando os níveis de transcrição dos genes sexuais em ovários 0B e 1B de *Psalidodon paranae*, conforme analisado por RT-qPCR. Ambos os grupos são plotados nos eixos esquerdos e a diferença média (tamanho do efeito) é plotada em um eixo flutuante à direita, como uma distribuição de amostragem *bootstrap*. A diferença média é representada como um ponto preto e o intervalo de confiança de 95% é indicado pelas extremidades da barra de erro vertical. NREQ = *Normalized Relative Expression Quantity*.

### 2.4 Discussão

No presente trabalho foi observada uma distribuição significativamente diferente de cromossomos B entre fêmeas e machos de *P. paranae*. A prevalência de cromossomos B metacêntricos grandes em fêmeas já havia sido demonstrada para *P. scabripinnis* (Mizoguchi & Martins-Santos, 1997) e *P. paranae* (Porto-Foresti et al., 1997; Silva et al., 2014). Ainda, foi observado aqui a expressão diferencial de quatro genes envolvidos com a via de diferenciação e manutenção do sexo, sendo três deles da via sexual feminina (*cyp19a1a, esr1* e *nobox*) e um da via sexual masculina (*dmrt1*). Resultados similares foram encontrados por Castro et al. (2018, 2019), em que o gene *foxl2* apresenta subexpressão em

gônadas femininas e o gene *dmrt1* está superexpresso em gônadas masculinas de *P. scabripinnis*. Assim, a manipulação de genes envolvidos com a diferenciação sexual parece ser uma característica em comum para a perpetuação desses cromossomos no complexo *P. scabripinnis*. Apesar de o presente estudo não analisar indivíduos juvenis em período de determinação sexual, a análise de gônadas adultas em desenvolvimento também fornece dados importantes para elucidar os possíveis efeitos funcionais exercidos pelos cromossomos B, visto que diversos genes envolvidos com a diferenciação sexual possuem expressão constante, mesmo em gônadas adultas, para manutenção da diferenciação morfofisiológica do sexo e funcionamento das gônadas (Britt et al., 2002; Rajendiran et al., 2021). Desta forma, é possível propor algumas hipóteses para os efeitos da subexpressão dos genes *cyp19a1a* e *esr1* e superexpressão do gene *nobox* em fêmeas e da superexpressão do gene *dmrt1* em machos.

Silva et al. (2014) sugerem a possibilidade de as distorções sexuais observadas em diferentes populações de *P. paranae* serem causadas por uma influência exercida pelos cromossomos B na determinação do sexo. Este tipo de influência já foi relatado para outras espécies como no peixe ciclídeo *Metriaclima lombardoi*, em que o cromossomo B carrega um gene determinante feminino epistaticamente dominante ao sistema XY (Clark & Kocher, 2019) e em *Astyanax mexicanus* foi relatado que o cromossomo B possui dois locus de um gene determinante de machos (Imarazene et al., 2021). Assim, seria possível especular que mecanismos similares poderiam ocorrer em *P. paranae*, visto que o presente estudo demonstra uma influência na expressão de genes envolvidos com a diferenciação sexual devido a presença do cromossomo B. Neste sentido, supondo que este cromossomo leve a determinação sexual feminina, a subexpressão dos genes *cyp19a1a* e *esr1* em fêmeas poderiam ser entendidas como distorções nos *feedbacks* regulatórios da via estrogênica devido às alterações na determinação do sexo (Martinez-Bengochea et al., 2020).

Alternativamente, a subexpressão dessa via poderia também ser um mecanismo de resposta do genoma A em uma corrida para neutralizar os efeitos do cromossomo B (Frank, 2000). Neste sentido, a inibição do gene *cyp19a1a* poderia levar a uma reversão sexual de fêmeas em machos, visto que a inibição da enzima aromatase induz a uma reversão para o sexo masculino em diversas espécies, conforme citado na literatura (Britt et al., 2002; Nakamura et al., 2003; Ogawa et al., 2008). No entanto, o efeito dessa subexpressão parece não ser suficiente para desencadear uma reversão sexual. No presente estudo foi observada uma superexpressão do gene *dmrt1* em machos, assim como relatado ocorrer para machos

de *P. scabripinnis* (Castro et al., 2018). A superexpressão deste gene poderia ser um indício da inibição do processo de feminilização, visto que o gene *dmrt1* pode inibir a expressão do gene *cyp19a1a* e levar à regulação da via estrogênica (Herpin & Schartl, 2011). Por fim, para maior sustentação dessas hipóteses, análises de juvenis em período de determinação sexual são necessárias, visto que o presente estudo se limita a analisar indivíduos adultos.

A subexpressão dos genes cyp19a1 e esr1 observadas em gônadas femininas +B de P. paranae poderiam levar a uma menor produção e ação de hormônios estrógenos. Este hormônio é um dos principais agentes de diferenciação sexual feminina em vertebrados, no entanto também é essencial para outras funções como manutenção e funcionamento normal das gônadas (Miura et al., 2007; Rajendiran et al., 2021). Desta forma, alterações nos níveis de estrógeno levam, muitas vezes, a alterações funcionais e morfológicas nas gônadas (Nakamura et al., 2003; Guiguen et al., 2010). Assim, considerando que a subexpressão desses genes parece não ser suficiente para induzir a reversão sexual, um possível efeito funcional de menores níveis de estrógeno causados pelos cromossomos B poderia ser um atraso na progressão de células germinativas para a oogênese inicial (Miura et al., 2007), levando a uma alteração no período reprodutivo. Essa hipótese vai de acordo com o observado em P. scabripinnis, em que fêmeas +B apresentam período reprodutivo curto e tardio (Cornelio et al., 2017). Ainda, Castro et al. (2019) também observaram subexpressão em fêmeas +B do gene *foxl2*, responsável por codificar um fator de transcrição que ativa cyp19a1a. Assim, a manipulação de genes relacionados a via estrogênica parece ser uma característica em comum nos cromossomos B das duas espécies. No entanto, no presente estudo não foi possível identificar níveis quantificáveis de transcritos de foxl2 em ambos os sexos. Assim, a expressão desse gene poderia se limitar apenas a fases específicas do desenvolvimento em P. paranae e não sofrer influência pelos cromossomos B em adultos.

A superexpressão do gene *nobox* em fêmeas observada no presente estudo corrobora os dados de superexpressão observados por Silva et al., (2021). Ainda, os autores verificaram que este gene está presente no cromossomo B e representa mais de 70% dos transcritos B-específicos. O gene *nobox* codifica um fator de transcrição homeobox essencial para o desenvolvimento de oócitos, atuando principalmente na transição de folículos primordiais a primários, além de poder estar envolvido na supressão da expressão do gene *dmrt1* (Huntriss et al., 2006; Choi et al., 2007). A expressão contínua deste gene em oócitos em desenvolvimento sugere também um importante papel no controle de redes de expressão gênica ao longo do processo de oôgenese (Krotz et al., 2009). Desta forma, Takashima et al.

(2021) sugerem que a competência dos oócitos gerados pode ser impactada pela expressão do gene *nobox*. Portanto, a superexpressão deste gene em fêmeas de *P. paranae* +B poderia levar a uma maior produção e desenvolvimento de oócitos, o que levaria a um maior sucesso reprodutivo destes indivíduos. Essa hipótese está de acordo com o maior índice gonadossomático observado em fêmeas +B de *P. scabripinnis* durante seu pico reprodutivo (Cornelio et al., 2017). Assim, apesar da baixa taxa de transmissão observada em cruzamentos de fêmeas 1B x machos 0B (Goes et al., 2021), a maior presença de cromossomos B em fêmeas associado a maior produção de oócitos poderia representar um mecanismo de acúmulo destes cromossomos.

Em machos +B, foi observada uma superexpressão do gene *dmrt1* nas gônadas, assim como observado para *P. scabripinnis* por Castro et al. (2018). Em *P. scabripinnis*, esta superexpressão está associada a uma extensão do período reprodutivo nos indivíduos +B (Castro et al., 2018, 2019) e de acordo com os autores isto possibilitaria uma maior geração de descendentes. Assim, a alteração na expressão do gene *dmrt1* em machos parece ser uma característica importante para o sucesso dos cromossomos B no complexo *P. scabripinnis*. Com relação a superexpressão do gene *nobox*, apesar de desempenhar um importante papel na oôgenese, esse gene também é expresso em testículos humanos (Huntriss et al., 2006). No entanto, até onde sabemos, poucos estudos buscam entender sobre sua atuação neste tecido, principalmente em peixes. Assim, para o entendimento de possíveis efeitos causados pela superexpressão do gene *nobox* em gônadas masculinas de *P. paranae* B+, estudos posteriores são necessários.

#### 2.5 Conclusões

A presença de cromossomos B exerce efeito sobre os genes de diferenciação sexual principalmente em fêmeas, o que era esperado devido a maior presença destes cromossomos neste sexo. A subexpressão dos genes envolvidos com a via estrogênica (*cyp19a1a* e *esr1*) poderia ser reflexo de uma desregulação causada pelos cromossomos B, uma resposta do genoma A para neutralizar o genoma B, ou um possível efeito funcional destes cromossomos que levaria a uma distorção do período reprodutivo. Esta última hipótese está de acordo com a alteração do ciclo reprodutivo observado em *P. scabripinnis*. Ainda, a superexpressão do gene *nobox* poderia levar a uma maior eficiência no processo de oogênese, o que poderia levar a um maior sucesso reprodutivo para fêmeas +B, representando um possível mecanismo de acúmulo destes cromossomos. Em machos +B, a superexpressão do gene

*dmrt1* poderia causar uma distorção do ciclo reprodutivo, assim como visto para *P. scabripinnis* em literatura. Por fim, pode-se concluir que os cromossomos B de *P. paranae* estão associados a distorção na expressão de genes importantes para a diferenciação sexual em ambos os sexos. Considera-se pois, que análises posteriores envolvendo a expressão destes genes durante o período de determinação do sexo em juvenis poderiam também auxiliar na elucidação do processo de manipulação destes genes de maneira completa durante o ciclo de vida.

# 2.6 Referências

ANDERSEN, C.L.; JENSEN, J.L.; ØRNTOFT, T.F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer research**, v. 64, n. 15, p. 5245-5250, 2004.

BRITT, K.L.; KERR, J.; O'DONNELL, L.; JONES, M.E.E.; DRUMMOND, A.E.; DAVIS, S.R. et al. Estrogen regulates development of the somatic cell phenotype in the eutherian ovary. **The FASEB journal**, v. 16, n. 11, p. 1389-1397, 2002.

BUSTIN, S.A.; BENES, V.; GARSON, J.A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M. et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p 611-622, 2009.

CAPEL, B. Vertebrate sex determination: evolutionary plasticity of a fundamental switch. **Nature Reviews Genetics**, v. 18, n. 11, p. 675-689, 2017.

CASTRO, J.P.; HATTORI, R.S.; YOSHINAGA, T.T.; SILVA, D.M.Z.A.; FORESTI, F.; SANTOS, M.H. et al. Differential expression of dmrt1 in *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidade) is correlated with B chromosome occurrence. **Zebrafish**, v. 16, n. 2, p. 182-188, 2018.

CASTRO, J.P.; HATTORI, R.S.; YOSHINAGA, T.T.; SILVA, D.M.Z.A.; RUIZ-RUANO, F.J.; FORESTI, F. et al. Differential expression of genes related to sexual determination can modify the reproductive cycle of *Astyanax scabripinnis* (Characiformes: Characidae) in B chromosome carrier individuals. **Genes**, v. 10, n. 11, p. 909, 2019.

CHOI, Y.; QIN, Y.; BERGER, M.F.; BALLOW, D.J.; BULYK, M.L.; RAJKOVIC, A. Microarray analyses of newborn mouse ovaries lacking *Nobox*. **Biology of reproduction**, v. 77, n. 2, p. 312-319, 2007.

CLARK, F.E.; KOCHER, T.D. Changing sex for selfish gain: B chromosomes of Lake Malawi cichlid fish. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-10, 2019.

COLEMAN, J.J.; ROUNSLEY, S.D.; RODRIGUEZ-CARRES, M.; KUO, A.; WASMANN, C.C.; GRIMWOOD, J. et al. The genome of *Nectria haematococca*: contribution of supernumerary chromosomes to gene expansion. **PLoS genetics**, v. 5, n. 8, p. e1000618, 2009.

CORNELIO, D.; CASTRO, J.P.; SANTOS, M.H.; VICARI, M.R.; ALMEIDA, M.C.; MOREIRA-FILHO, O. et al. Hermaphroditism can compensate for the sex ratio in the

*Astyanax scabripinnis* species complex (Teleostei: Characidae): expanding the B chromosome study model. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 27, n. 3, p. 681-689, 2017.

DALLA BENETTA, E.; ANTOSHECHKIN, I.; YANG, T.; NGUYEN, H.Q.M.; AKBARI, O.S. Genome elimination mediated by gene expression from a selfish chromosome. **Science advances**, v. 6, n. 14, p. eaaz9808, 2020.

DHERAWATTANA, A.; SADANAGA, K. Cytogenetics of a Crown Rust-Resistant Hexaploid Oat with 42+ 2 Fragment Chromosomes 1. **Crop Science**, v. 13, n. 6, p. 591-594, 1973.

FORESTI, F.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; TOLEDO, S.A. Polymorphic nature of nucleolus organizer regions in fishes. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 31, n. 3, p. 137-144, 1981.

FRANK, S.A. Polymorphism of attack and defense. **Trends in ecology & evolution**, v. 15, n. 4, p. 167-171, 2000.

GOES, C.A.G.; SILVA, D.M.Z.A.; UTSUNOMIA, R.; NASCIMENTO, N.F.; YASUI, G.S.; SENHORINI, J.A. et al. Sex-Dependent Inheritance of B Chromosomes in *Psalidodon paranae* (Teleostei, Characiformes) Revealed by Directed Crossings. **Zebrafish**, v. 18, n. 6, p. 363-368, 2021.

GUIGUEN Y.; FOSTIER, A.; PIFERRER, F.; CHANG, C.F. Ovarian aromatase and estrogens: a pivotal role for gonadal sex differentiation and sex change in fish. **General and comparative endocrinology**, v. 165, n. 3, p. 352-366, 2010.

GUIGUEN, Y.; BAROILLER, J.F.; RICORDEL, M.J.; ISEKI, K.; MCMEEL, O.M.; MARTIN, S.A.M. et al. Involvement of estrogens in the process of sex differentiation in two fish species: the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and a tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research**, v. 54, n. 2, p. 154-162, 1999.

HERPIN, A.; SCHARTL, M. Plasticity of gene-regulatory networks controlling sex determination: of masters, slaves, usual suspects, newcomers, and usurpators. **EMBO** reports, v. 16, n. 10, p. 1260-1274, 2015.

HERPIN, A.; SCHARTL, M. Sex determination: switch and suppress. **Current Biology**, v. 21, n. 17, p. R656-R659, 2011.

HO, J.; TUMKAYA, T.; ARYAL, S.; CHOI, H.; CLARIDGE-CHANG, A. Moving beyond P values: data analysis with estimation graphics. **Nature methods**, v. 16, n. 7, p. 565-566, 2019.

HOUBEN, A.; BANAEI-MOGHADDAM, A.M.; KLEMME, S.; TIMMIS, J. N. Evolution and biology of supernumerary B chromosomes. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 71, n. 3, p. 467-478, 2014.

HUNTRISS, J.; HINKINS, M.; PICTON, H. Mc. cDNA cloning and expression of the human *NOBOX* gene in oocytes and ovarian follicles. **MHR: Basic science of reproductive medicine**, v. 12, n. 5, p. 283-289, 2006.

IMARAZENE, B.; DU, K.; BEILLE, S.; JOUANNO, E.; FERON, R.; PAN, Q. et al. A supernumerary "B-sex" chromosome drives male sex determination in the Pachón cavefish, *Astyanax mexicanus*. **Current Biology**, v. 31, n. 21, p. 4800-4809. e9, 2021.

KITANO, T.; YOSHINAGA, N.; SHIRAISHI, E.; KOYANAGI, T.; ABE, S.I. Tamoxifen induces masculinization of genetic females and regulates P450 aromatase and Müllerian inhibiting substance mRNA expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). **Molecular reproduction and development**, v. 74, n. 9, p. 1171-1177, 2007.

KOBAYASHI, T.; KAJIURA-KOBAYASHI, H.; NAGAHAMA, Y. Induction of XY sex reversal by estrogen involves altered gene expression in a teleost, tilapia. **Cytogenetic and genome research**, v. 101, n. 3-4, p. 289-294, 2003.

KROTZ, S. P.; BALLOW, D. J.; CHOI, Y.; RAJKOVIC, A. Expression and localization of the novel and highly conserved gametocyte-specific factor 1 during oogenesis and spermatogenesis. **Fertility and sterility**, v. 91, n. 5, p. 2020-2024, 2009.

LI, M.; SUN, L.; WANG, D. Roles of estrogens in fish sexual plasticity and sex differentiation. General and comparative endocrinology, v. 277, p. 9-16, 2019.

LI, Y.; JING, X.A.; ALDRICH, J.C.; CLIFFORD, C.; CHEN, J.; AKBARI, O.S. et al. Unique sequence organization and small RNA expression of a "selfish" B chromosome. **Chromosoma**, v. 126, n. 6, p. 753-768, 2017.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. **methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

MAISTRO, E.L.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. New occurrence of a macro B-chromosome in *Astyanax scabripinnis* paranae (PISCES, CHARACIFORMES, CHARACIDAE). **Revista Brasileira de Genética**, v. 17, n.2, p. 153-156, 1994

MAISTRO, E.L.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F. Occurrence of macro B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* paranae (Pisces, Characiformes, Characidae). **Genetica**, v. 87, n. 2, p. 101-106, 1992.

MARTINEZ-BENGOCHEA, A.; DORETTO, L.; ROSA, I.F.; OLIVEIRA, M.A.; SILVA, C.; SILVA, D.M.Z.A. et al. Effects of 17β-estradiol on early gonadal development and expression of genes implicated in sexual differentiation of a South American teleost, *Astyanax altiparanae*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, v. 248, p. 110467, 2020.

MARTIS, M.M.; KLEMME, S.; BANAEI-MOGHADDAM, A.M.; BLATTNER, F.R.; MACAS, J.; SCHMUTZER, T. et al. Selfish supernumerary chromosome reveals its origin as a mosaic of host genome and organellar sequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 33, p. 13343-13346, 2012.

MIURA, C.; HIGASHINO, T.; MIURA, T. A Progestin and an Estrogen Regulate Early Stages of Oogenesis in Fish. **Biology of Reproduction**, v. 77, p. 822-828, 2007.

MIZOGUCHI, S.M.H.N.; MARTINS-SANTOS, I.C. Macro-and microchromosomes B in females of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Hereditas**, v. 127, n. 3, p. 249-253, 1997.

NOKKALA, S.; GROZEVA, S.; KUZNETSOVA, V.; MARYANSKA-NADACHOWSKA, A. The origin of the achiasmatic XY sex chromosome system in *Cacopsylla peregrina* (Frst.) (Psylloidea, Homoptera). Genetica, v. 119, n. 3, p. 327-332, 2003.

NAKAMURA, M.; BHANDARI, R.K.; HIGA, M. The role estrogens play in sex differentiation and sex changes of fish. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 28, p. 113-117, 2003.

OGAWA, S.; AKIYOSHI, M.; HIGUCHI, M.; NAKAMURA, M.; HIRAI, T. Post-sex differentiational'sex reversal in the female common carp (*Cyprinus carpio*). **Cybium**, v. 32, n. 2, p. 102-103, 2008.

PIFERRER, F. Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. Aquaculture, v. 197, n. 1-4, p. 229-281, 2001.

PORTO-FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; MAISTRO, E.L.; FORESTI, F. Estimated frequency of B-chromosomes and population density of *Astyanax scabripinnis* paranae in a small stream. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 20, n. 3, 1997.

RAJENDIRAN, P.; JAAFAR, F.; KAR, S.; SUDHAKUMARI, C.; SENTHILKUMARAN, B.; PARHAR, I. Sex Determination and Differentiation in Teleost: Roles of Genetics, Environment, and Brain. **Biology**, v. 10, n. 10, p. 973, 2021.

RHOADES, M.M.; MCCLINTOCK, B. The cytogenetics of maize. **The Botanical Review**, v. 1, n. 8, p. 292-325, 1935.

ROCON-STANGE, E.A.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F. Supernumerary B chromosomes restricted to males in *Asyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Revista Brasileira de Genética**, v. 16, p. 601-615, 1993.

SALVADOR, L.B.; MOREIRA-FILHO, O.B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Heredity**, v. 69, n. 1, p. 50-56, 1992.

SERRANO-FREITAS, E.A.; SILVA, D.M.Z.A.; RUIZ-RUANO, F.J.; UTSUNOMIA, R.; ARAYA-JAIME, C.; OLIVEIRA, C. et al. Satellite DNA content of B chromosomes in the characid fish *Characidium gomesi* supports their origin from sex chromosomes. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 295, n. 1, p. 195-207, 2020.

SILVA, D.M.Z.A.; DANIEL, S.N.; CAMACHO, J.P.M.; UTSUNOMIA, R.; RUIZ-RUANO, F.J.; PENITENTE, M. et al. Origin of B chromosomes in the genus *Astyanax* (Characiformes, Characidae) and the limits of chromosome painting. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 291, n. 3, p. 1407-1418, 2016.

SILVA, D.M.Z.A.; PANSONATO-ALVES, J.C.; UTSUNOMIA, R.; ARAYA-JAIME, C.; RUIZ-RUANO, F.J.; DANIEL, S.N. et al. Delimiting the origin of a B chromosome by FISH mapping, chromosome painting and DNA sequence analysis in *Astyanax paranae* (Teleostei, Characiformes). **PLoS One**, v. 9, n. 4, p. e94896, 2014.

SILVA, D.M.Z.A.; RUIZ-RUANO, F.J.; UTSUNOMIA, R.; MARTÍN-PECIÑA, M.; CASTRO, J.P.; FREIRE, P.P. et al. Long-term persistence of supernumerary B chromosomes in multiple species of *Astyanax* fish. **BMC biology**, v. 19, n. 1, p. 1-17, 2021.

SUMNER, A.T.A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Exp.** Cell Res., v. 75, p. 304-306, 1972.

TAKASHIMA, T.; FUJIMARU, T.; OBATA, Y. Effect of in vitro growth on mouse oocyte competency, mitochondria and transcriptome. **Reproduction**, v. 162, n. 4, p. 307-318, 2021.

VICENTE, V.E.; MOREIRA-FILHO, O.; CAMACHO, J.P.M. Sex-ratio distortion associated with the presence of a B chromosome in *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae). Cytogenetic and Genome Research, v. 74, n. 1-2, p. 70-75, 1996.

WANG, D.S.; KOBAYASHI, T.; ZHOU, L.Y.; PAUL-PRASANTH, P.; IJIRI, S.; SAKAI, F. et al. Foxl2 up-regulates aromatase gene transcription in a female-specific manner by binding to the promoter as well as interacting with ad4 binding protein/steroidogenic factor 1. **Molecular Endocrinology**, v. 21, n. 3, p. 712-725, 2007.

# **Considerações Gerais**

O desenvolvimento deste projeto forneceu um melhor entendimento sobre a origem e as relações evolutivas dos cromossomos B do gênero *Psalidodon*, bem como sobre os mecanismos de atuação destes cromossomos a nível de expressão gênica.

A presença de cromossomos B no gênero *Psalidodon* está associada a um complexo histórico evolutivo. No entanto, o compartilhamento de genes entre a variante *BfMa*, analisada no presente estudo, e outras variantes do gênero, indica que esta variante também teria se originado em um mesmo processo de formação há cerca de 4 milhões de anos atrás. Dentre os genes compartilhados entre todas as variantes, pelo menos três estão relacionados a funções do ciclo celular, e desta forma é possível especular que tenham sido genes importantes para o sucesso evolutivo destes cromossomos. O compartilhamento de seis genes da variante *BfMa* dentre os 11 genes encontrados em *BfMb* de *P. fasciatus* indica que estes cromossomos são capazes de perder ou adquirir genes exclusivos e seguir caminhos evolutivos distintos dentro de uma mesma espécie. Ainda, apesar da ocorrência de hibridação interespecífica entre *P. fasciatus* e *P. paranae*, o acúmulo de diferenças estruturais entre as variantes *BfMa* e *BpM*, bem como o acúmulo de diferenças no conteúdo gênico, permitem descartar a hipótese de surgimento da variante *BfMa* por hibridação específica recente.

Em seguida, a análise de expressão diferencial de genes associados com a via de diferenciação do sexo em *P. paranae* ajuda elucidar os possíveis efeitos funcionais destes cromossomos. As análises indicam que os genes envolvidos com a produção e ação de hormônios estrógenos encontram-se subexpressos em fêmeas +B. Essa subexpressão poderia levar a menor produção e ação destes hormônios e poderia ser um reflexo da distorção dos feedbacks regulatórios causados pelos cromossomos B, bem como um mecanismo de supressão da ação destes cromossomos por parte do genoma A. Neste sentido, a superexpressão do gene *dmrt1* em machos +B poderia ser um indício desta supressão de genes da via estrogênica também poderia ser entendida como um efeito funcional dos cromossomos B, levando a uma menor produção de estrógeno e alterando o ciclo reprodutivo da espécie. A superexpressão do gene *nobox* em fêmeas +B poderia levar a uma maior produção de ovócitos e conferir um importante efeito adaptativo para os cromossomos B, indicando assim um mecanismo de acúmulo destes cromossomos.

Por fim, consideramos que os resultados e as hipóteses aqui apresentados fornecem novas perspectivas para o estudo de cromossomos B em peixes. Ainda, posteriores análises de NGS podem elucidar de forma mais ampla as relações evolutivas entre diferentes variantes de cromossomo B em *Psalidodon*. Também, análises dos efeitos dos cromossomos B na expressão de gônadas de juvenis em período de determinação sexual podem elucidar de forma completa o mecanismo de atuação destes cromossomos durante o ciclo de vida.

# Material suplementar

Tabela S1. Primers utilizados nos experimentos de qPCR em gDNA de Psalidodon fasciatus, população do rio Alambari.

Gene	Sequência F	Sequência R
amhr2	GAGTGCCGGTCTGTTCGTTA	CTCTGACCAGACGTTTCCCC
sbno2	AGAGACCAGCACTCTCTCCA	GATGGCCTCAAGCTGTAGGG
simc1	ACAGAAATCCTTGCTGGCGA	GGGCTATTGGGCAGACTCTC
ccpg1	GAACCGTGCTCTGAAGACCA	GCGTTGGTTCTCAGACAGGA
cia30	СТАСААААТАААСАССТТААТТТАТТС	TTTGTACATTGTCTGCTTTTT
g2e3	GCTATACTGAGGCCAGGCTG	TCTTCATGTCGCTTGGTGCT
hem2	AGGCAGGGGCATTTGACC	AGCAGTCATGGCCTCAAGAA
mdm2	TTCTCAGTGGAGGAGGAAAGC	TGCTGCGTGAGTCTGAAGAC
mot1	GCTGGATCTCTCATGAGGCC	AAGGAAGCCACGGTGTTTGA
msh4	CATCTTCATCTGCCACTTTG	AAATCCCCTGAGCTGGTTCT
nobox	GTCTGTGACGTCTGGTCCTG	GCTGGGCCAGAAAAGTGTTG
nusap1	CTGCCAGTCGTGCCCCATT	TTTGTTGACTGAAAGGACAGCTG
rnf17	ACACGGTTAAGCTCCACATCA	TACTGCTGGAGTGTTGCCTC

Nº de Identificação	Sexo	Estágio de maturação	Data de coleta	2n	Tipo de B
85680 Fêmea		Madura	07/11/2019	-	st/M?
85681	Macho	Desenvolvimento	07/11/2019	-	st/M?
85682	Macho	Desenvolvimento	07/11/2019	46+B	Ma
85683	Macho	Desenvolvimento	07/11/2019	-	-
85684	Macho	Desenvolvimento	07/11/2019	45+B	Ma
85685	Fêmea	Desenvolvimento	25/11/2019	-	-
85686	Macho	Maduro	25/11/2019	46	-
85687	Fêmea	Desenvolvimento	25/11/2019	-	-
85688	Macho	Maduro	25/11/2019	48	st
85689	Macho	Maduro	25/11/2019	46	-
85690	Macho	Desenvolvimento	03/12/2019	45+B	Ma
85691	Fêmea	Extrusada	03/12/2019	46	-
85692	Macho	-	10/12/2019	45+B	Ma
85693	Macho	Maduro	10/12/2019	46	-
85711	-	-	31/01/2020	-	-
85712	-	-	31/01/2020	46	-
85723	Fêmea	Maduro	26/08/2020	46	
85727	-	Desenvolvimento	26/08/2020	46+B	Mb
85741	-	-	26/08/2020	-	-
85746	-	Desenvolvimento	26/08/2020	46	
85747	Macho	Desenvolvimento	26/08/2020	-	
85756	Fêmea	Desenvolvimento	26/08/2020	47	M(a/b?)
85796	Macho	Desenvolvimento	24/11/2020	-	
85797	Macho	Desenvolvimento	24/11/2020	45+B	Ma
85798	Macho	Desenvolvimento	24/11/2020	46	
85799	Macho	Maduro	14/12/2020	45 + B	Ma
85800	Fêmea	Maduro	14/12/2020	45 + B	Ma
85801	Macho	Maduro	14/12/2020	46+Bma+ Bst	Ma e st
12551	Fêmea	-	21/03/2019	47	st
12558	Fêmea	-	21/03/2019	45/46	Ma

**Tabela S2.** Relação de espécimes de *Psalidodon fasciatus* coletados na população do rio Alambari.

\_

Genes	Sequência F	Sequência R		
Referência	Sequencia i	Sequencia K		
hprt	CTCACGGACTCATCTTGGACAGGAC	GCAGATCTGCAAAGAACTTGTAGCC		
hmbs	GTGCTCTCGTTCACCTTGTT	TACAGTCTGGACGGTGCTG		
pgk1	CCTACTGGGGAAAGATGTAACG	CTGCAGCAGGATCAGCACAG		
ppiaa	CTTCATGTGCCAGGGTGGT	TCATCCTCAAACTTGTGGCCAT		
tbp	CCCCCAGCTACAGAATATTGTA	TGCGTTTCTGGCTCGAAGT		
Genes				
Alvo				
nusap1	AAGATTCAGCCTAAGCCGCC	CTGAAGGGGACACTGTGCTT		
amhr2	GCCTTCAGCCTAACAAGCAGG	TTGTCTGGTCAGCTGTCAGTAG		
cyp19a1a	TCACCGTGACTCTGTGCAAATA	GCCATTGAGGAGCTGATAGAGA		
dmrt1	TTCTCCTACTGCTTCAGGTCAC	CAGTGGAGGCATCAGAGTGTC		
esr1	CAAGAGGAGCATACAAGGTCAC	TCTTCCTGCGGTTTCTGTCAAT		
foxl2	AGGCGCATGAAAAGACCATTCA	TGAGCCAGGGACCAGGAG		
nobox	CGCACCTCCTACAGTACAGATC	TTCTGCTTTTCTGAATCTGGGT		
sox9	ATCTTCAAAGCCCTGCAGCAAG	GGACCTTGGGATTGACCTGAAT		

Tabela S3. Primers utilizados nos experimentos de RT-qPCR em cDNA de Psalidodon paranae

Nº de Identificação	Sexo	Estágio de maturação	Data de coleta	2n
85964	Macho	Maturação	14/04/2021	75-78?
85965	Fêmea	Desenvolvimento	14/04/2021	50 + B
85966	Fêmea	Regredida	14/04/2021	50
85967	Fêmea	Desenvolvimento	14/04/2021	50 + B
85968	Macho	Maduro	14/04/2021	50
85969	Fêmea	Desenvolvimento	14/04/2021	50 + B
85970	Fêmea	Desenvolvimento	14/04/2021	50
85971	Macho	Maduro	14/04/2021	-
85972	Fêmea	Desenvolvimento	14/04/2021	50 + B
85973	Macho	Imaturo	26/04/2021	-
85974	Macho	-	26/04/2021	-
85975	Fêmea	Desenvolvimento	26/04/2021	50 + B
85976	Macho	Desenvolvimento	26/04/2021	50
85977	Macho	-	26/04/2021	50
85997	Macho	Desenvolvimento	24/05/2021	50
85998	Fêmea	Regredida	24/05/2021	-
85999	Macho	Desenvolvimento	24/05/2021	50 + B
85600	Macho	Desenvolvimento	24/05/2021	50 + B
106001	Macho	-	24/05/2021	50
106002	Macho	-	24/05/2021	-
106003	Macho	-	24/05/2021	-
106004	Fêmea	Desenvolvimento	26/05/2021	50
106005	Fêmea	Desenvolvimento	26/05/2021	50 + B
106006	Fêmea	Desenvolvimento	26/05/2021	50 + 2B
106007	Macho	Maduro	26/05/2021	50
106008	Fêmea	Desenvolvimento	26/05/2021	50 + B
106009	Fêmea	Regeneração	26/05/2021	50 + B
106010	Fêmea	Desenvolvimento	26/05/2021	50 + B
106011	Macho	Regeneração	26/05/2021	50
106012	Fêmea	Desenvolvimento	26/05/2021	50 + B
106013	Macho	Desenvolvimento	26/05/2021	50 + B
106014	Fêmea	Desenvolvimento	28/05/2021	50 + B
106015	Fêmea	Desenvolvimento	28/05/2021	50 + B
106016	Macho	Maduro	28/05/2021	50
106017	Fêmea	Desenvolvimento	28/05/2021	50 + B

Tabela S4. Relação de espécimes de Psalidodon paranae coletados na população do ribeirão Cascatinha.

106018	Fêmea	Desenvolvimento	28/05/2021	50 + B
106019	Fêmea	Desenvolvimento	28/05/2021	50 + B
106020	Macho	-	28/05/2021	50
106021	Macho	Desenvolvimento	28/05/2021	50
106022	Macho	Imaturo	28/05/2021	-
106023	Macho	Desenvolvimento	28/05/2021	50
106024	Fêmea	Desenvolvimento	28/05/2021	50 + B
106025	Macho	Desenvolvimento	28/05/2021	50
106026	Macho	-	28/05/2021	50
106027	Macho	-	28/05/2021	50
106028	Macho	Maduro	28/05/2021	50 + B
106029	Fêmea	Desenvolvimento	28/05/2021	50 + B
106030	Fêmea	Desenvolvimento	28/05/2021	50 + B
106031	Fêmea	Regeneração	28/05/2021	50
106032	Fêmea	Desenvolvimento	28/05/2021	50 + B
106033	Fêmea	Desenvolvimento	28/05/2021	50 + B
106045	Fêmea	Madura	08/06/2021	50
106046	Fêmea	Regeneração	08/06/2021	50 + B
106047	Macho	Maduro	08/06/2021	50
106048	Macho	Maduro	08/06/2021	50
106049	Fêmea	Regeneração	08/06/2021	50 + B
106050	Macho	Maduro	08/06/2021	50
106051	Fêmea	Madura	08/06/2021	50
106052	Fêmea	Madura	08/06/2021	50 + B
106070	Fêmea	Regeneração	20/07/2021	50 + B
106071	Fêmea	Regeneração	20/07/2021	50
106072	Fêmea	Regeneração	20/07/2021	50 + B
106073	Fêmea	Regeneração	20/07/2021	-