

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

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

Sandro Natal Daniel

ESTUDO DA ESTRUTURA CROMOSSÔMICA DE *Astyanax bockmanni*
(TELEOSTEI, CHARACIFORMES) EM DIFERENTES POPULAÇÕES: ENFOQUE
EM CROMOSSOMOS B

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências de Botucatu, Universidade
Estadual Paulista-UNESP, como parte dos
requisitos para a obtenção do título de
Mestre em Ciências Biológicas. Área de
concentração: Zoologia.

Orientador: Dr. Fábio Porto-Foresti
Co-orientador: Dr. Diogo Teruo Hashimoto

Botucatu
- 2014 -

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

Daniel, Sandro Natal.

Estudo da estrutura cromossômica de *Astyanax bockmanni* (TELEOSTEI,
CHARACIFORMES) em diferentes populações : enfoque em Cromossomos B /
Sandro Natal Daniel. - Botucatu, 2014

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

Orientador: Dr. Fábio Porto Foresti

Coorientador: Dr. Diogo Teruo Hashimoto

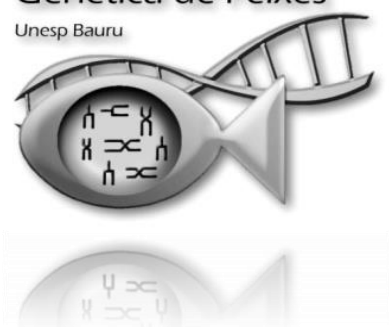
Capes: 20204000

1. *Astyanax* (Peixe). 2. Cromossomos - Polimorfismo. 3. DNA. 4. Citogenética
animal. 5. Teleosteos.

Palavras-chave: Cromossomos supranumerários; DNAs repetitivos; Evolução
cromossômica; Marcadores citogenético moleculares; Microdissecção e
pintura cromossômica.



Laboratório de
Genética de Peixes
Unesp Bauru



“Na medida em que adquirimos maiores conhecimentos, menos compreensíveis vão se tornando as coisas, porém muito mais misteriosas”

(Albert Schweitzer)

“Sonhe, apesar das ilusões. Caminhe, apesar dos obstáculos. Lute, apesar das barreiras e, acima de tudo, acredite em você mesmo.”

(Larissa Guerreiro)

*Dedico este trabalho às pessoas mais importantes da minha
vida...*

*...meus pais Ana e Sebastião (in memoriam). Vocês foram, são, e
sempre serão o grande exemplo de vida e pessoas que espero
alcançar um dia, saibam que é um enorme prazer dizer que
sou seu filho. Obrigado por me tornarem o Homem que sou
hoje, e obrigado por todo o amor e carinho sempre, eu os amo
mais que tudo!!!*

*...à Caroline Bessão, minha noiva, pelo amor, carinho,
dedicação, e compreensão em todos os momentos de nossa
convivência, muito obrigado, eu te amo muito!!*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a minha família, pelo apoio, amor incondicional, e por sempre acreditarem que eu chegaria aqui. Muito obrigado por tudo, vocês são a fonte de toda minha energia para eu continuar lutando em busca dos meus sonhos e ideais.

Ao Prof. Dr. Fábio Porto Foresti, orientador e amigo, pelo apoio e incentivo em todos os momentos destes seis anos de LaGenPe. Obrigado por me receber de braços abertos em seu laboratório, por sempre lutar e zelar para que nenhum “lagenpeano” ficasse sem bolsa, e por dividir comigo e demais companheiros, um pouquinho da sua experiência e seu conhecimento sobre os diversos ramos da citogenética de peixes, com total competência, paciência e amizade.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro concedido através de bolsa (Proc. 2011/15007-5).

Ao pesquisador Dr. Diogo Teruo Hashimoto, amigo e co-orientador, por me ajudar nas coletas, preparações e análises citogenéticas, e principalmente por participar diretamente de todas as etapas para a execução e conclusão deste trabalho. Obrigado por sempre me ajudar em todos os momentos que necessitei.

Aos amigos atuais e os que já se foram do Laboratório de Genética de Peixes (LaGenPe) da UNESP Bauru, em especial aos que compõe o quadro de alunos hoje: Aline (Line), Andréa (Dé), Bruna (Bru), Diego (Digs), Flávio (Garça), Fernanda (Fer), Maíce (Má), Manolo (Manolão), Rosângela (Rô), Vinícius (Vini), Faiçall (Faiça), Caio,

Willian (Will/Tio Phil), Raquel e Milena, por todos os momentos de descontração e amizade cultivados e compartilhados.

Ao Prof. Dr. Jehud Bortolozzi, pela amizade, conhecimento compartilhado, e pelos excelentes momentos de descontração nas monitorias de Genética.

Ao grande amigo e companheiro Manolo Penitente, pela amizade incondicional cultivada ao longo dos últimos sete anos, pelo companheirismo durante toda a graduação, pelas incansáveis e intermináveis coletas, pela ajuda na obtenção de boas preparações citogenéticas, pelas sugestões e discussões construtivas. Obrigado por tudo meu amigo.

Aos amigos Prof^ª. Dr^ª. Daniela Cristina Ferreira e Dr. José Carlos Pansonato Alves, pela grande ajuda na execução de algumas técnicas e interpretação dos resultados obtidos neste trabalho.

Aos inúmeros amigos graduandos, pós graduandos, servidores e docentes da Unesp/Bauru/Botucatu, em especial o Departamento de Ciências Biológicas da Unesp Bauru, pelo cordial apoio sempre que necessário, e por participarem diretamente das etapas de minha formação acadêmica.

À seção de pós-graduação em Ciências Biológicas (Zoologia) do IBB Botucatu, pela disposição em ajudar sempre que solicitados.

Ao Prof. Dr. Fausto Foresti, sempre disposto a ensinar, apoiar e ajudar em qualquer que seja a situação ou trabalho, e por nos premiar com seu conhecimento, amor e dedicação à ciência.

Ao Prof. Dr. Cláudio de Oliveira, pela identificação das amostras e exemplo de vida acadêmica.

À Dr^a. Patrícia Elda Sobrinho Scudeler e Dr^a. Cristiane Kioko Shimabukuro Dias, do Laboratório de Biologia de Peixes da Unesp Botucatu, pela realização das técnicas de microdissecção cromossômica e sequenciamento.

Aos docentes e discentes do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes da UNESP Botucatu, sempre dispostos a ajudar, me fornecendo abrigo, material biológico, reagentes, equipamento, e toda sua estrutura.

Ao amigo Duílio Mazzoni Zerbinato de Andrade Silva, do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes da UNESP Botucatu, pelas discussões sempre construtivas, por me abrigar em sua casa todas as vezes que necessitei, pela parceria nos artigos científicos produzidos, e por me fornecer várias amostras para a finalização deste trabalho.

Aos meus sogros, Jaime e Maria, por me apresentarem com sua filha Caroline, e por sempre me tratarem como se também fosse um de seus filhos.

À minha noiva, namorada, cúmplice, confidente e amiga Caroline Bessão, por estar sempre me apoiar em todos os momentos. Saiba que você foi, e é um anjo em

minha vida, e sou muito grato por ser o seu companheiro, por me proporcionar o prazer de poder dividir um pouquinho de tudo ao seu lado. Eu Te amo muito meu amor.

RESUMO

Dentre os peixes da região Neotropical, temos a família Characidae, cujo gênero *Astyanax* é o mais comum e diversificado, contando com 141 espécies validadas. Estudos com diversas espécies do grupo têm demonstrado um dinamismo populacional particular, que leva à formação de populações geneticamente muito variáveis, além da ocorrência de cromossomos B, que neste gênero apresentam intensos polimorfismos. Estes cromossomos são classificados como elementos adicionais e dispensáveis, e estão presentes em plantas, fungos e animais, de diferentes morfologias e frequência variada. Frente a isso, foram analisadas seis populações distintas de *Astyanax bockmanni* coletadas nas bacias do rio Tietê e Paranapanema, além de exemplares das espécies *A. fasciatus* e *A. paranae* portadores de cromossomos supranumerários. Os estudos se basearam em técnicas citogenéticas clássicas (coloração com Giemsa, impregnação com nitrato de Prata, e bandamento C) e moleculares (hibridação *in situ* fluorescente e Zoo-FISH, por meio de sondas de DNAr 5S e 18S; genes para as histonas H1, H3; e elementos transponíveis *Rex1*, *Rex3* e *Rex6*). Também realizamos a microdissecção, amplificação, marcação e hibridação de uma sonda B-específica do cromossomo B acrocêntrico de *A. bockmanni*, nomeada B_{abock}. Os resultados indicaram que todos os exemplares de *A. bockmanni* e *A. paranae* apresentaram de 2n=50 cromossomos. Já *A. fasciatus* evidenciou 2n=46 cromossomos padrão. Todos os cariótipos das três espécies foram constituídos de cromossomos dos tipos metacêntricos, submetacêntricos, subtelocêntricos e acrocêntricos. Na espécie *A. bockmanni* (população Alambari), foram observados microcromossomos B acro e metacêntricos. Supranumerários meta, acro e subtelocêntricos observados na espécie *A. fasciatus*, e cromossomos B do tipo metacêntricos em *A. paranae*. As seis populações de *A. bockmanni* apresentaram divergências da heterocromatina constitutiva e RONS múltiplas, com exceção da população do rio Capivara, que indicou um sistema de RONS simples. Adicionalmente, o DNAr 18S revelou múltiplas marcações e polimorfismo inter e intra individual, confirmando o que foi previamente constatado pela impregnação com Prata. Por outro lado, o DNAr 5S foi localizado apenas em dois pares cromossômicos nas mesmas populações. A aplicação da FISH com o gene para a histona H1 também evidenciou marcações apenas em dois pares cromossômicos, com predomínio destes sítios em

cromossomos metacêntricos. Em cinco, das seis populações de *A. bockmanni*, a sonda H3 apresentou grandes blocos marcados na região terminal de quatro cromossomos. Excepcionalmente, a população do córrego Alambari apresentou este gene na região terminal de sete cromossomos, alguns inclusive, não homólogos entre si. Os elementos transposons *Rex1* e *Rex6* exibiram pequenos sítios dispersos ao longo da maioria dos cromossomos das seis populações analisadas. O elemento *Rex3* revelou um grande bloco concentrado apenas num único cromossomo acrocêntrico nas populações Barra Seca e Batalha. Nas populações Capivara e Véu de Noiva, este elemento concentra grandes blocos em alguns cromossomos distintos. Adicionalmente, as populações Alambari e Campo Novo indicaram pequenos sítios distribuídos na maioria dos cromossomos padrão. Sinais conspícuos dos transposons *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* também foram reportados no microcromossomo B de *A. bockmanni*. A *FISH* e a *Zoo-FISH* da sonda B-específica (B_{abock}) foi realizada em seis populações *A. bockmanni*, e aplicada nas espécies *A. fasciatus* e *A. paranae*, respectivamente. Os resultados levantados indicaram uma pintura cromossômica total dos supranumerários de *A. bockmanni*, além de sequências homólogas com alguns cromossomos padrão. A *Zoo-FISH* indicou sinais de hibridação desta sonda no cromossomo B_{st} de *A. fasciatus*, com incidência de sítios homólogos a cromossomos padrão. Não foram observadas homologias entre a sonda B-específica e os cromossomos B e padrão da espécie *A. paranae*. Concluímos, portanto, que há uma conservação cromossômica entre as diferentes populações de *A. bockmanni* das duas bacias hidrográficas analisadas, entretanto, diferenças na distribuição cariotípica, RONS, heterocromatina e genes ribossomais, histônicos e transposons foram observadas entre elas, com destaque para a população Alambari que além da presença de cromossomos B portando elementos transponíveis *Rex1*, *Rex3* e *Rex6*, apresentou ampla ocorrência da histona H3 em seu genoma. Pesquisas adicionais, como o sequenciamento genômico destes indivíduos poderiam explicar, em nível de sequência, a ocorrência destas particularidades apenas nesta população. Ainda, o diagnóstico de sequências compartilhadas entre a sonda B-específica de *A. bockmanni* e cromossomos autossomos de outras espécies e populações, nos permite inferir uma possível origem destes elementos a partir de um cromossomo B ancestral. Logo, estudos desta natureza além de gerar informações sobre a constituição e distribuição do material genético de cromossomos B, fornecem subsídios para um melhor entendimento sobre sua origem, manutenção e evolução no grupo.

ABSTRACT

Among the fish of the Neotropical region, we have the Characidae family whose genus *Astyanax* is the most common and diverse, with 141 species validated. Studies with several species of the group have shown a particular population dynamics, leading to the formation of genetically variable populations, besides the occurrence of B chromosomes, which in this genus exhibit intense polymorphisms. These chromosomes are classified as additional elements dispensable, and are present in plants, fungi and animals of varying frequencies and morphologies. So, six distinct populations of *Astyanax bockmanni* collected in the basins of the Tietê and Paranapanema were analyzed, beyond samples of the species *A. fasciatus* and *A. paranae* carriers of supernumerary chromosomes. The studies were based on classical cytogenetic techniques (Giemsa staining, impregnation with silver nitrate, and C-banding), and molecular (fluorescence in situ hybridization *FISH* and animal by means of 18S and 5S rRNA probes; genes for histones H1, H3, and transposable elements *Rex1*, *Rex3* and *Rex6*). We also performed microdissection, amplification, marking and hybridization of a B-specific probe acrocentric B chromosome of *A. bockmanni*, named B_{abock}. The results indicated that all specimens of *A. bockmanni* and *A. paranae* presented 2n=50 chromosomes. *A. fasciatus* showed 2n=46 chromosomes default. All karyotypes of the three species were made up of chromosomes metacentric, submetacentric, subtelocentric and acrocentric types. The species *A. bockmanni* (Alambari population) were observed B microchromosomes metacentric and acro Supernumerary, were acro and subtelocentric observed in the species *A. fasciatus*, and the metacentric B chromosomes in type *A. paranae*. The six populations of *A. bockmanni* showed differences in the constitutive heterochromatin and multiple NOR except the population Capivara river, which indicated a simple NOR system. Additionally, the 18S rRNA gene revealed multiple markings and inter and intra-individual polymorphism, confirming what was previously reported by impregnation with silver. In contrast, the 5S rDNA was located only in two pairs on the same chromosome populations. The application of *FISH* with the gene for histone H1 tags showed only two chromosome pairs hybridized, with a predominance of these sites in metacentric chromosomes. In five of the six populations of *A. bockmanni*, the H3 probe showed large blocks marked on four chromosomes in terminal region. Exceptionally, the population Alambari presented this gene terminally on seven chromosomes, including some not homologous

to each other. The transposons elements *Rex6* and *Rex1* exhibited small scattered along most chromosomes of the six populations analyzed sites. The *Rex3* element revealed a large block concentrated in only one acrocentric chromosome at the populations Barra Seca and Batalha streams. In the Capivara and Vêu de Noiva populations, this element focuses on large only blocks some distinct chromosomes. Additionally, Alambari and Campo Novo populations indicated small sites distributed in most standard chromosomes. Conspicuous signs of transposons *Rex1*, *Rex3* and *Rex6* were also reported us B microchromosome of *A. bockmanni*. The Zoo-FISH and FISH Probe B-specific (B_{abock}) was performed in six populations *A. bockmanni*, and applied to the species *A. fasciatus* and *A. paranae* respectively. The results indicated an overall supernumerary chromosome painting of *A. bockmanni*, and homologous sequences with some standard chromosomes. The Zoo-FISH showed signs of hybridization of this probe on chromosome B_{st} of *A. fasciatus*, with an incidence of homologous chromosomes standard sites. No homologies were observed between the probe B-specific and B chromosomes and pattern of *A. paranae*. We therefore conclude, that there is a chromosomal conservation among different populations of *A. bockmanni* of two watersheds analyzed, however, differences in karyotype distribution, NORs, heterochromatin and ribosomal genes, histones and transposons genes were observed between them, highlighting the Alambari population and the presence of B chromosomes carrying transposable elements *Rex1*, *Rex3* and *Rex6*, showed widespread occurrence of histone H3 in its genome. Further research, such as genomic sequencing of these individuals could explain, in sequence level, the occurrence of these characteristics only in this population. In addition, the diagnostic probe sequences shared between B-specific *A. bockmanni* chromosomes and autosomes of other species and populations, allows us to infer a possible origin of these elements from ancestor B chromosome. Therefore, studies of this nature in addition to generating information on the formation and distribution of genetic material from B chromosome, provides a basis for a better understanding of its origin, maintenance and evolution in the group.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Aspectos gerais sobre a família Characidae	1
1.2 Estudos citogenéticos em peixes: aplicação no grupo <i>Astyanax</i>	2
1.3 O estudo de DNAs repetitivos em peixes	5
1.4 Cromossomos B em peixes: ênfase no gênero <i>Astyanax</i>	9
1.6 Considerações gerais sobre Microdissecção Cromossômica	13
2 OBJETIVOS	17
3 MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 Material	18
3.2 Métodos	20
3.2.1 Estimulação de Mitoses	20
3.2.2 Obtenção de cromossomos metafásicos <i>in vivo</i>	21
3.2.3 Detecção da Região Organizadora de Nucléolo (NOR) por meio de Impregnação com Nitrato de Prata (Ag-NO ₃)	22
3.2.4 Caracterização da Heterocromatina Constitutiva (Banda C)	23
3.2.5 Extração do DNA genômico total	24
3.2.6 Preparação das sondas para a Hibridação <i>in situ</i> Fluorescentes (FISH)	24
3.2.6.1 Preparação das sondas de DNAr 5S e 18S	25
3.2.6.2 Preparação das sondas dos genes para a Histona H1 e H3	26
3.2.6.3 Preparação das sondas para os elementos transponíveis <i>Rex1</i> , <i>Rex3</i> e <i>Rex6</i>	27
3.2.7 Microdissecção Cromossômica	28
3.2.7.1 Agulhas/Micropipetas	28
3.2.8 Preparação do material a ser microdissecado	29
3.2.7.3 Kit GenomePlex® Single Cell Whole Genome Amplification (WGA4–Sigma)	30

3.2.7.4 Reamplificação do material microdissecado	32
3.2.7.5 PCR de marcação da sonda do DNA isolado do cromossomo B com o Kit GenomePlex® Single Cell Whole Genome Amplification (WGA3–Sigma)	32
3.3 Hibridação fluorescente <i>in situ</i> (FISH) e Zoo-FISH	33
3.3.1 Preparação, limpeza, e detecção dos sinais de Hibridação <i>in situ</i> Fluorescente (FISH) e Zoo-FISH	33
3.4 Estudos cariotípicos	36
3.5 Montagem dos Cariótipos	36
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1 Capítulo 1	38
4.2 Capítulo 2	53
4.3 Capítulo 3	67
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	80
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais sobre a família Characidae

De acordo com Nelson (2006), a ordem Characiformes é composta por 18 famílias, 270 gêneros, e aproximadamente 1674 espécies, os quais podem ser diferenciados dos demais grupos por possuírem o corpo coberto por finas escamas (exceto a cabeça), presença de nadadeiras pélvicas ou ventrais, geralmente situadas após a inserção das nadadeiras peitorais, ocorrência de raios nas nadadeiras moles (Britski *et al.*, 1999). Além disso, apresentam grande variação em sua estrutura corpórea, mandibular e anatomia interna, dieta diversificada, e são encontrados nos mais diferentes ecossistemas (Vari, 1998).

Das famílias que compõe a ordem Characiforme, a família Characidae é considerada uma das mais numerosas e complexas dentre os peixes de águas continentais da América do Sul (Nelson, 2006), com aproximadamente 780 espécies válidas (Froese e Pauly, 2010), onde o grande número de espécies incluídas nesta família pode estar diretamente associado às variedades e diferentes morfologias encontradas, o que dificulta proposições de classificação, de modo que as relações de parentesco com as demais famílias Characiformes têm sido muito prejudicadas, (Lucena, 1993).

Dentre os Characidae distribuídos na região Neotropical, o gênero *Astyanax* é o mais diversificado (Lucena *et al.*, 2013), e estudos sistemáticos têm enfatizado que os representantes deste grupo compõem complexos de espécies e taxonomia controversa (Reis *et al.*, 2003), como por exemplo, os já conhecidos complexos *Astyanax scabripinnis* e *A. fasciatus*, assim definidos por Moreira-Filho e Bertollo (1991) e

Artoni *et al.* (2006), baseando-se principalmente em caracteres morfológicos e cromossômicos em seus estudos. Tal fato só comprova a necessidade de estudos citogenéticos adicionais neste grupo de peixes, uma vez que diversas espécies que o compõe nem ao menos foram reconhecidas como espécies, e encontram-se alocadas em diferentes grupos ou complexos.

1.2 Estudos citogenéticos em peixes: aplicação no grupo *Astyanax*

Até a década de 1970, estudos citogenéticos em peixes eram muito limitados quanto às informações relacionadas ao genoma desse grupo animal, onde a citogenética clássica era a mais difundida, empregando principalmente as técnicas de coloração convencional com Giemsa, bandamento C, e localização das NORs através da coloração por nitrato de Prata (Ag-NOR) (Santi-Rampazzo *et al.*, 2008). Na década seguinte, com o advento da citogenética molecular, começaram a emergir informações mais detalhadas principalmente relacionadas à hibridação *in situ* fluorescente (*FISH*) (Meltzer *et al.*, 1992). Dessa forma, a utilização das sondas produzidas a partir de DNAr tornaram-se importantes ferramentas nos estudos relacionados à composição, evolução e estrutura do material genético dos cromossomos em peixes (Silva *et al.*, 2013; Voltolin *et al.*, 2013).

O gênero *Astyanax* (Characiformes, Characidae) foi inicialmente proposto por Baird e Girard (1854), com sua primeira revisão mais completa feita por Eigenmann (1921), na época validando 74 espécies, hoje estes números já somam 241 espécies, podendo ainda, chegar a aproximadamente 233 (Eschmeyer, 2013), as quais habitam diversos ambientes, com grande preferência por cabeceiras de pequenos rios, riachos e córregos (Garutti e Britski, 2000; Vari e Castro, 2007) e são abundantes na maioria das bacias hidrográficas brasileiras (Lima *et al.*, 2003).

As espécies pertencentes a este grupo apresentam uma diversidade acentuada quanto ao número diplóide, que variam desde $2n=36$ cromossomos em *A. schubarti* (Morelli *et al.*, 1983; Daniel-Silva e Almeida-Toledo, 2001; Moreira-Filho *et al.*, 2001) a $2n=50$ cromossomos em *A. bockmanni* (Kavalco *et al.*, 2009; Hashimoto e Porto-Foresti, 2010; Fernandes *et al.*, 2010; Hashimoto *et al.*, 2011; Daniel *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2013). Além disso, pode-se notar uma variação quanto à morfologia cromossômica, presença de cromossomos supranumerários e triploidia natural entre outras (Fauaz *et al.*, 1994; Mestriner *et al.*, 2000; Moreira-Filho *et al.*, 2001; Hashimoto *et al.*, 2008; Daniel *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2013). Essas variações são relacionadas à altitude, diferenciação sexual ou ainda poluição ambiental (Porto-Foresti *et al.*, 1997; Néo *et al.*, 2000).

Estudos com diversas espécies do gênero *Astyanax* têm demonstrado um dinamismo populacional particular, que pode levar à formação de populações geneticamente variáveis (Vari e Castro, 2007). Aplicada ao grupo, a técnica de banda C têm revelado a ocorrência de considerável quantidade de polimorfismos cromossômicos, isto é, segmentos que variam em tamanho entre os indivíduos. Ocorrem, além disso, diferenças em relação à quantidade e posição das marcações (Mizoguchi e Martins-Santos, 1998). Na literatura são descritas várias hipóteses para explicar este intenso polimorfismo de blocos heterocromáticos entre indivíduos, populações e espécies, além de representar uma técnica de excelente custo benefício e importante marcador na diferenciação dos cromossomos do complemento padrão (Mizoguchi e Martins-Santos, 1998).

Quanto às Regiões Organizadoras de Nucléolo (NORs) o gênero *Astyanax* de uma forma geral, muitas vezes apresenta marcações múltiplas, padrão frequentemente observado em diversas populações e espécies (Maistro *et al.*, 2000; Kavalco e Moreira-

Filho, 2003; Ferreira-Neto *et al.*, 2009; Da Silva *et al.*, 2012; Ferreira-Neto *et al.*, 2012; Machado *et al.*, 2012), entretanto, em algumas populações do grupo estas marcações podem apresentar um padrão de distribuição simples (Kavalco *et al.*, 2004; Ferreira-Neto *et al.*, 2009; Fernandes *et al.*, 2010; Kavalco *et al.*, 2011), ou ainda polimórficos (Mantovani *et al.*, 2000; Hashimoto e Porto-Foresti, 2010; Santos *et al.*, 2013).

Inserida no gênero *Astyanax*, encontramos a espécie *A. bockmanni*, caracterizada por uma confluência de características particulares em relação às demais espécies do grupo (Vari e Castro, 2007). O primeiro trabalho citogenético realizado em *A. bockmanni* é creditado à Kavalco *et al.* (2009), que descreveram a distribuição cromossômica de duas populações da bacia do rio Paranapanema, com múltiplas NORs visualizadas na maioria das vezes em pontos terminais dos cromossomos. Pequenas quantidades de heterocromatina constitutiva foram localizadas na região terminal de dois pares cromossômicos.

Posteriormente, Hashimoto e Porto-Foresti (2010) descreveram a composição cariotípica em duas populações provenientes de efluentes da bacia do rio Tietê, e observaram elevado polimorfismo das regiões heterocromáticas em ambas as populações, além de um alto grau de variabilidade intra e inter individuais das NORs em vários cromossomos das mesmas populações. Recentemente, alguns trabalhos vêm abordando o uso de marcadores citogenéticos aliados a análises de sequências de DNA nesta espécie (Hashimoto *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2013), evidenciando que estes marcadores são úteis e de suma importância na busca de ferramentas que auxiliem na elucidação dos inúmeros processos evolutivos envolvidos na diferenciação cariotípica de peixes, principalmente nas espécies do gênero *Astyanax*, reconhecidamente de difícil caracterização morfológica.

Assim, considerando a intensa variabilidade cariotípica em representantes do gênero *Astyanax* (Hashimoto *et al.*, 2011), ampla distribuição geográfica (Zanata e Camelier, 2009), alta plasticidade fenotípica, grande capacidade de se adaptar aos mais diversos ambientes (Dowling *et al.*, 2002), rápida especialização ecológica e diferenciação morfológica (Reeves e Bermingham, 2006), estudos citogenéticos representam excelentes ferramentas na busca de um melhor conhecimento da sistemática de determinados grupos de peixes, contribuindo de forma significativa para uma inferência mais precisa das relações filogenéticas, estrutura e evolução cariotípica destes grupo animal.

1.3 O estudo de DNAs repetitivos em peixes

Organismos eucariotos apresentam em seus cromossomos grande fração de segmentos de DNA repetitivo, que aparentemente, não são encontrados em indivíduos procariontes (Camacho *et al.*, 2002). O uso destas sequências como marcadores cromossômicos têm revelado informações significativas nos estudos citogenéticos em peixes nos últimos anos, auxiliando de forma direta no entendimento das estruturas envolvidas na evolução de genomas, origem e evolução de cromossomos supranumerários, diferenciação sexual, e rearranjos cromossômicos (Votolin *et al.*, 2010).

Além disso, diferentes pesquisas têm demonstrado que as sequências repetitivas não estão distribuídas ao acaso no genoma de muitos organismos (Bueno *et al.*, 2013), mas ligadas a regiões intergênicas, heterocromáticas, e em alguns casos, envolvendo elementos transponíveis (Charlesworth *et al.*, 1994; Martins *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2013). Apesar disso, na grande maioria das espécies de peixes estudadas, uma fração

esmagadora das pesquisas são voltadas para o ponto de vista descritivo do número e localização de sítios de DNAr, principalmente do gene 18S. Somado a isso, pesquisas objetivando averiguar de forma clara se os sítios CMA₃ e DNAr 18S são equivalentes, ou se são apenas regiões heterocromáticas ricas em GC são reportadas (Martins e Galetti, 1999).

Em relação ao gene ribossomal 5S, diversos trabalhos em diferentes espécies de peixes reportam a localização do sítio apenas em dois pares cromossômicos, principalmente em regiões intersticiais (Vicente *et al.*, 2001; Hashimoto *et al.*, 2011). Este padrão de localização intersticial parece estar relacionado a vantagens na organização desse gene em peixes e em outros vertebrados (Guerra, 2004), entretanto, sítios do gene 5S também podem ser reportados em regiões teloméricas e pericentroméricas em peixes (Molina e Galetti, 2002). Em diversas espécies do grupo *Astyanax*, frequentemente são relatados sítios homólogos de DNAr 5S (Almeida-Toledo *et al.*, 2002; Hashimoto *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2013), sugerindo que a localização deste gene nos cromossomos deste gênero mantiveram-se conservados acerca dos diversos fatores evolutivos a que foram submetidos.

O mapeamento físico de sequências repetitivas dos genes para Histona em peixes também tem sido utilizado com relativo sucesso. Hashimoto *et al.* (2011), ao mapearem os padrões de distribuição do gene para a histona H1 em três espécies do gênero *Astyanax*, verificaram que este se encontrava em sintonia com o DNAr 5S em um par cromossômico, sugerindo que esta seria uma condição comum ao gênero. Além disso, os autores sugerem que as espécies *A. bockmanni* e *A. fasciatus* são mais relacionadas comparadas à *A. altiparanae*, justamente com o advento de que ambas possuem clusters adicionais de DNAr 5S em um par de cromossomos acrocêntricos,

característica não observada em *A. altiparanae*. Esta teoria foi posteriormente confirmada com o sequenciamento destes genes.

Recentemente, Silva *et al.* (2013) mapearam os genes para a histona H1, H3 e H4 em duas populações de *A. bockmanni*. Os autores identificaram que os três genes estão distribuídos e co-localizados em dois pares cromossômicos nas duas populações, indicando que os sítios desta família multigênica encontram-se muito bem conservados. Resultados semelhantes foram diagnosticados por Pansonato-Alves *et al.* (2013) em *A. fasciatus*. Assim, apesar de existirem diversos estudos voltados à estrutura, funcionalidade e evolução de proteínas histônicas (Ramakrishnan *et al.*, 1993), no grupo dos peixes apenas algumas espécies tiveram estes genes mapeados, e ainda de forma fragmentada ou isolada.

Outro enfoque utilizando sequências repetitivas são os estudos sobre filogenia (Hashimoto *et al.*, 2011; Pansonato-Alves *et al.*, 2013a,b). Garrido-Ramos *et al.* (1994) caracterizaram uma família de sequências de DNA satélite do genoma de *Sparus aurata*, que aliada à técnica de *FISH* evidenciaram que todas as sondas derivadas dessa família de DNA satélite hibridava apenas em regiões centroméricas de todos os cromossomos do complemento padrão. Garrido-Ramos *et al.* (1999) realizaram um estudo sobre sequências satélites em exemplares da família Sparidae, e os resultados indicaram pelo menos dois grupos monofiléticos identificados com base nessas sequências. Em trabalho semelhante, Robles *et al.* (2004) isolaram um DNA satélite denominado *PstI* e pesquisaram sobre as relações filogenéticas entre várias espécies do gênero *Acipenser*. Segundo os próprios autores, este satélite evidenciou elevado grau de conservação em 13 espécies deste grupo, correspondendo a um dos DNA satélites mais antigos datados até o momento.

Além dos estudos relatados anteriormente, podemos incluir ainda as pesquisas envolvendo os elementos transponíveis (TEs) transposons. TEs são sequências de DNA repetitivo, constituídas por um grupo de segmentos com capacidade de se mover ao longo dos cromossomos, ou ainda transpor entre locais não homólogos dentro do genoma (Ferreira *et al.*, 2011a,b). Estes elementos normalmente organizam-se de forma distinta nas mais variadas espécies, distribuindo-se e ocupando geralmente regiões eucromáticas (Ferreira *et al.*, 2011a; Cox *et al.*, 2012). O mapeamento físico destes elementos em peixes têm mostrado padrões de distribuição similares nos mais diferentes grupos, com exceções de algumas espécies (Ferreira *et al.*, 2011b). Assim, é plausível aceitar que estes elementos possam se acumular em regiões específicas dentro de cada grupo, onde a tendência ao acúmulo parece ser compartilhada (Valente *et al.*, 2011). Entre os diversos retroelementos encontrados em peixes, os transposons da família Rex parecem ser os mais abundantes em diferentes Teleósteos (Volff *et al.*, 1999, 2000, 2001; Böhne *et al.*, 2008; Ferreira *et al.*, 2011; Pansonato-Alves *et al.*, 2013a,b). Segundo Volff *et al.* (2001), os transposons *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* correspondem a repetições não-LTRs, que têm se mantido ativas durante a evolução de diferentes linhagens de peixes.

Estudos envolvendo sequências repetitivas também têm sido realizados na busca da elucidação sobre a origem e evolução de cromossomos supranumerários em peixes (Voltolin *et al.*, 2010, 2013; Vicari *et al.*, 2011), bem como na identificação de sequências sexo-específicas (Cioffi *et al.*, 2011; Machado *et al.*, 2012). Em estudo pioneiro, Mestriner *et al.* (2000) isolaram uma sequência de DNA satélite composta por 51pb, denominada *KpnI*, e descreveram a composição genética de uma família de DNA repetitivo em cromossomos supranumerários de *Astyanax scabripinnis*. Os autores verificaram que esse satélite também está presente na região terminal de vários

cromossomos do complemento padrão, além da região intersticial de ambos os braços do cromossomo B. Estes resultados ajudaram a reforçar a hipótese de que esse cromossomo B seria um isocromossomo.

Em *Prochilodus lineatus*, uma das sequências satélites isoladas por Jesus *et al.* (2003) foi observada em todos os cromossomos B, além de vários cromossomos do complemento padrão, o que levou os autores proporem uma origem destes elementos através de cromossomos do complemento padrão. Paralelamente, Ferreira e Martins (2008) caracterizaram sequências de DNA repetitivo no genoma de *Oreochromis niloticus*, e observaram uma distribuição de elementos repetitivos em regiões centroméricas e teloméricas. Ainda de acordo com os autores, anteriormente nesta mesma espécie, o acúmulo dessas sequências repetitivas em cromossomos sexuais foi observado de forma bem diferente, sugerindo que o DNA repetitivo teria um papel importante na diferenciação sexual.

Portanto, embora o DNA repetitivo tenha sido estudado nos grupos de invertebrados e mamíferos, em peixes, devido ao grande número de espécies descritas, vemos que ainda é limitado o número de informações acerca da sua distribuição e organização genômica (Ferreira *et al.*, 2011b). Logo, estudar estas sequências significa avançarmos no conhecimento sobre a organização genômica e a dinâmica com que estas sequências têm evoluído nestes organismos.

1.4 Cromossomos B em peixes: ênfase no gênero *Astyanax*

Em estudo detalhado, Houben *et al.* (2013) definem os cromossomos B como cromossomos adicionais ao conjunto de cromossomos normais. Estes elementos adicionais apresentam herança não-mendeliana e têm sido amplamente descritos em

milhares de animais, plantas, fungos e outras espécies, mas ainda são um mistério evolutivo desde a sua primeira descoberta, mais de cem anos atrás. São encontrados em alguns indivíduos de uma determinada população, e podem variar em número inter e intra-individualmente. Diferentes tipos morfológicos de cromossomos B podem existir dentro de uma única espécie. Em algumas espécies a sua presença pode até mesmo ultrapassar o número dos cromossomos A.

Inicialmente, e até há pouco tempo, os cromossomos B foram considerados como elementos não-funcionais, e sem deter quaisquer genes essenciais, uma vez que são dispensáveis para crescimento normal de seu portador, ainda, a maioria dos cromossomos B não confere qualquer vantagem sobre os organismos que os mantêm (Houben *et al.*, 2013), podendo ser pensados como parasitas ou elementos egoístas que persistem nas populações (Manrique-Poyato *et al.*, 2013), fazendo uso da maquinaria celular necessária para a herança e a manutenção deste tipo cromossômico (Cabrero *et al.*, 2013). Quando presentes em número reduzido, os supranumerários geralmente têm pouco ou nenhum impacto sobre os portadores. No entanto, aumento do número dos cromossomos B podem causar diferenças fenotípicas e reduzir a fertilidade em alguns casos (Camacho *et al.*, 2000; Jones e Houben, 2003; Camacho, 2005).

Segundo Camacho *et al.* (2000), provavelmente os cromossomos supranumerários teriam surgido de cromossomos presentes no complemento A, porém não seguem o mesmo caminho evolutivo. No reino animal, estes elementos extras já foram observados em 500 espécies (Camacho, 2005), e destas espécies, 38 são peixes neotropicais, correspondendo a 1,5% dos peixes cariotipados nesta região (Oliveira *et al.*, 2009), entretanto, de acordo com Penitente *et al.* (*in prep.*) levantamentos recentes sugerem que estes números podem chegar a casa de 56 espécies de peixes portadoras de

cromossomos supranumerários, com as ordens Characiformes e Siluriformes consideradas as mais representativas.

Em peixes, comumente são reportados morfotipos de cromossomos B, os quais recebem algumas conotações. Em revisão realizada por Moreira-Filho *et al.* (2004), os autores utilizam as expressões B_M, B_m, B_{SM} e B_{micro} para ilustrar o tipo de cromossomos B na espécie *A. scabripinnis*, onde B_M corresponde a um cromossomo B metacêntrico grande, B_m a um cromossomo B metacêntrico pequeno, e assim sucessivamente, com a primeira letra sempre discriminando um cromossomo B, e a segunda discriminando a sua morfologia. Se a segunda letra for maiúscula, significa que refere-se a um cromossomo B de tamanho grande ou médio (chamados de macrocromossomos), entretanto se a segunda letra for minúscula, trata-se de um cromossomo pequeno, também chamados de microcromossomo. Esta conotação em referência à cromossomos supranumerários é atualmente adotada por diversos autores, e muito bem aceita pela comunidade científica.

Em relação ao tamanho, podemos destacar vários exemplos da variação de ocorrência dos supranumerários, como os macrocromossomos B de ocorrência no gênero *Astyanax* (Maistro *et al.*, 1992; Néo *et al.*, 2000; Moreira-Filho *et al.*, 2001, 2004; Daniel *et al.*, 2012), cromossomos B de tamanho médio no gênero *Rhamdia* (Fenocchio *et al.*, 2000), e microcromossomos B no gênero *Prochilodus* (Artoni *et al.*, 2006; Voltolin *et al.*, 2010, 2013; Penitente *et al.*, 2013) entre outros. Em *Astyanax*, pesquisas indicam a incidência destes elementos adicionais em pelo menos oito espécies, as quais correspondem a *A. fasciatus* (Moreira-Filho *et al.*, 2001), *A. altiparanae* (Hashimoto *et al.*, 2008), *A. scabripinnis* (Moreira-Filho *et al.*, 2001), *A. bockmanni* (Hashimoto *et al.*, 2011), *A. schubart* (Moreira-Filho *et al.*, 2001), *A. mexicanus* (Kavalco e Almeida-Toledo, 2007), *A. goyacensis* (Santos *et al.*, 2013) e *A.*

paranae (citado como *Astyanax scabripinnis paranae* em Porto-Foresti *et al.*, 1997). Entretanto, apesar de várias espécies do grupo exibir cromossomos supranumerários em seu genoma, até a pouco tempo um maior número de estudos era direcionado à *A. scabripinnis*, provavelmente devido à elevada recorrência destes elementos em diversas populações desta espécie (Moreira-Filho *et al.*, 2001, 2004). Atualmente, existem vários grupos de pesquisadores dedicados a um maior conhecimento de supranumerários no gênero *Astyanax*.

Dentre os vários tipos de supranumerários reportados em *A. scabripinnis*, a variante B_M , similar ao maior cromossomo do complemento A, é a que apresenta maior distribuição em populações naturais (Moreira-Filho *et al.*, 2004). Provavelmente, este cromossomo corresponda a um morfotipo ancestral nesta espécie, pois também é observado em outras espécies do gênero. Além disso, fortes evidências sugerem que este B_M trata-se de um isocromossomo, com homologia funcional e estrutural entre seus dois braços. As variantes B_{SM} e B_m (um grande submetacêntrico e um pequeno metacêntrico, respectivamente) representam raras ocorrências, provavelmente derivadas de rearranjos estruturais do cromossomo B_M . Adicionalmente, microcromossomos B são encontrados apenas em algumas populações Moreira-Filho *et al.* (2004).

Maistro *et al.* (1999) sugerem que o cromossomo B de *A. scabripinnis paranae* teria surgido pela não disjunção do primeiro par de cromossomos metacêntricos, o que teria gerado um elemento trissômico, e posteriormente seguido um caminho evolutivo independente. Mestriner *et al.* (2000) indicam uma origem dos supranumerários de *A. scabripinnis* a partir de cromossomos A. Através da análise de células meióticas, os autores verificaram que o cromossomo B não segue uma herança mendeliana, formando univalentes durante a fase meiótica por meio do auto-pareamento de seus braços e além disso, mapearam no cromossomo B um tipo de DNA satélite chamado de As-51. A

localização deste DNA satélite em posições simétricas nos braços do cromossomo B, somado ao seu auto-pareamento na meiose, permitiu aos autores proporem que este cromossomo B seria um isocromossomo, formado inclusive, a partir da divisão incorreta e não disjunção das cromátides do par cromossômico 24, rico em sequências As-51. Apesar disso, uma origem a partir de cromossomos autossomos ainda não está completamente elucidada, portanto, não pode ser descartada (Mestriner *et al.*, 2000).

Apesar de diversas populações de *A. bockmanni* já terem sido analisadas e cariotipadas citogeneticamente, até o momento apenas uma população desta espécie foi descrita portando cromossomos supranumerários. De acordo com Daniel *et al.* (2012) são descritos três morfotipos de cromossomos B para *A. bockmanni*, os quais correspondem a um macrocromossomo B (B_M) similar ao primeiro par cromossômico e dois microcromossomos B (B_a e B_m), menores que todos os cromossomos observados no complemento padrão. Esta população revela uma significativa variação numérica e intraindividual destes elementos, com ocorrência dos dois morfotipos de microcromossomos B em uma mesma célula, mas nenhum macrocromossomo B conjuntamente a um microcromossomo. Os autores informam ainda que os microcromossomos B observados revelam uma parcialidade em relação a heterocromatina constitutiva, e o macrocromossomo B esboça um padrão totalmente heterocromático.

1.6 Considerações gerais sobre Microdissecção Cromossômica

A microdissecção cromossômica é uma técnica citogenética molecular muito utilizada hoje em dia nos processos de diferenciação cromossômica. Esta técnica, inicialmente introduzida para estudos em humanos tinha como objetivos a construção de

uma biblioteca do par cromossômico dois, através da aplicação de diversos fragmentos cromossômicos dissecados de metáfases não coradas ou bandeadas (Bates *et al.*, 1986). Alguns anos mais tarde, Ludecke *et al.* (1989) publicaram um procedimento de microdissecção no qual era utilizada a técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) para amplificar pequenas quantidades de DNA dos cromossomos dissecados. Posteriormente, esta prática foi aperfeiçoada, e dissecações de bandas específicas de cromossomos Bandeados através da técnica GTG passaram a ser possíveis (Senger *et al.*, 1990).

No início da década de 90, Meltzer *et al.* (1992) e Deng *et al.* (1992) desenvolveram a técnica de micro-*fish*, que consiste na microdissecção cromossômica e posterior amplificação por meio de uma PCR com *primer* degenerado (DOP - Degenerated Oligonucleotide Primer). O produto desses PCR passou então a ser utilizado como sondas aplicadas na hibridação *in situ* fluorescente (*FISH*). Esta técnica foi um grande alavancador da citogenética molecular, pois permitia a localização cromossômica de regiões de interesse, além de permitir a detecção de anormalidades e “pintura cromossômica” de cromossomos inteiros (Trask, 1991).

Desde então, a metodologia de micro-*fish* tem sido utilizada para a identificação de rearranjos cromossômicos envolvendo, principalmente, os processos evolutivos em primatas (Neusser *et al.*, 2005), entretanto, outras espécies também têm tido um foco especial. É o caso de cervídeos (Li *et al.*, 2005), roedores (Marchal *et al.*, 2004; Trifonov *et al.*, 2013), insetos (Teruel *et al.*, 2010; Cabrero *et al.*, 2013; Manrique-Poyato *et al.*, 2013), plantas (Deng *et al.*, 2013) e peixes (Votolin *et al.*, 2010, 2013; Cioffi *et al.*, 2011). Atualmente, estes estudos estão mais voltados para a construção de bibliotecas cromossômicas banda-específicas e mapeamento físico de determinados

cromossomos de maior interesse, como os cromossomos supranumerários e sexuais (Machado *et al.*, 2011; Cioffi *et al.*, 2011; Milhomen *et al.*, 2013; Voltolin *et al.*, 2013).

Em peixes, a aplicação da técnica de microdissecção aliada à pintura cromossômica tem se mostrado bastante satisfatória e eficiente (Voltolin *et al.*, 2010, 2013; Santos *et al.*, 2013). Híbridões com sondas microdissecadas de cromossomos sexuais de *Hoplias malabaricus* evidenciaram que eles cromossomos evoluíram de forma independente a partir de pares autossômicos não homólogos, expondo, assim, a alta plasticidade sexual e evolução cromossômica nos vertebrados inferiores (Cioffi *et al.*, 2011).

Vicari *et al.* (2011) realizaram microdissecaram um cromossomo B de *A. scabripini*, e através de híbridões *in situ* com a sonda B-específica, revelaram confirmação uma origem por isocromossomo deste supranumerário. Segundo os autores este cromossomo adiciona poderia inclusive, ter surgido a partir de elementos semelhantes presentes no par cromossômico acrocêntrico 24. Na espécie *A. goiyacensis*, Santos *et al.* (2013) isolaram um de seus nove microcromossomos B, observando associações da sonda B-específica em oito microcromossomos B, além de cromossomos autossomos do tipo acrocêntricos marcados. Em trabalho similar, entretanto, com uma sonda do cromossomo B de *Prochilodus lineatus*, Voltolin *et al.* (2013) realizaram a hibridação e Zoo-FISH em cinco espécies deste gênero, e os resultados permitiram aos autores inferir uma origem comum destes elementos em duas espécies do gênero.

Portanto, marcadores genéticos têm sido amplamente utilizados na identificação de espécies, em estudos filogenéticos, evolutivos, construção de mapas gênicos, e mapeamento de genes e sequências de DNA de interesse através da microdissecção cromossômica associada à técnica de FISH e micro-fish. Por outro lado, tanto as metodologias citogenéticas quanto as genético-moleculares, têm suas indicações,

vantagens e desvantagens de acordo com o problema biológico em questão, sendo que o uso destes marcadores em conjunto pode proporcionar informações complementares bem interessantes (Siljak-Yakovlev *et al.*, 2014). Em espécies do grupo *Astyanax*, o uso conjunto destas metodologias têm gerado informações importantes para o entendimento de mecanismos relacionados a processos evolutivos, origem, rearranjos e diferenciação de cromossomos B e sexuais.

2 OBJETIVOS

Tendo-se em vista que muitos aspectos relacionados aos cromossomos B ainda necessitam ser investigados no genoma de peixes, e para uma caracterização citogenética da espécie *Astyanax bockmanni* oriundas de populações diversas, objetivamos neste trabalho:

- 1) Caracterizar citogeneticamente exemplares da espécie *A. bockmanni* provenientes de diferentes localidades por meio de marcadores citogenéticos clássicos;
- 2) Mapear a distribuição e localização cromossômica de genes pertencentes a diferentes famílias de DNA repetitivo;
- 3) Obter sondas B-específicas de *A. bockmanni* através da microdissecção cromossômica associada à *FISH* e *Zoo-FISH* em exemplares de *A. bockmanni*, *A. fasciatus* e *A. paranae*; verificando os graus de homologia revelados entre a sonda e seus cromossomos B e padrão;

Pretendemos com os objetivos propostos, contribuir com informações sobre as relações cromossômicas e os processos de diversificação cariotípica existentes em *A. bockmanni*, bem como subsídios que auxiliem no entendimento da origem, estrutura e evolução de cromossomos supranumerários em diferentes espécies do grupo *Astyanax*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

Visando mapear cromossomicamente a espécie *Astyanax bockmanni* e seus cromossomos B, foram coletados 169 exemplares provenientes de seis populações e duas Bacias hidrográficas distintas (Figura 1, Tabela 1). Após a coleta, os animais foram triados, identificados, e catalogados. Posteriormente, estes animais foram fixados em formol 10%, e posteriormente conservados em álcool 70%, encontrando-se depositados na coleção de peixes do Laboratório de Genética de Peixes - LaGenPe, Departamento de Biologia da Faculdade de Ciências, Unesp/Bauru. Todas as coletas foram realizadas sob autorização dos órgãos MMA/IBAMA/ICMBio/SISBIO – 18884-1, com registro no IBAMA nº 2567470.



Figura 1: Imagem do espécime *Astyanax. Bockmanni*.

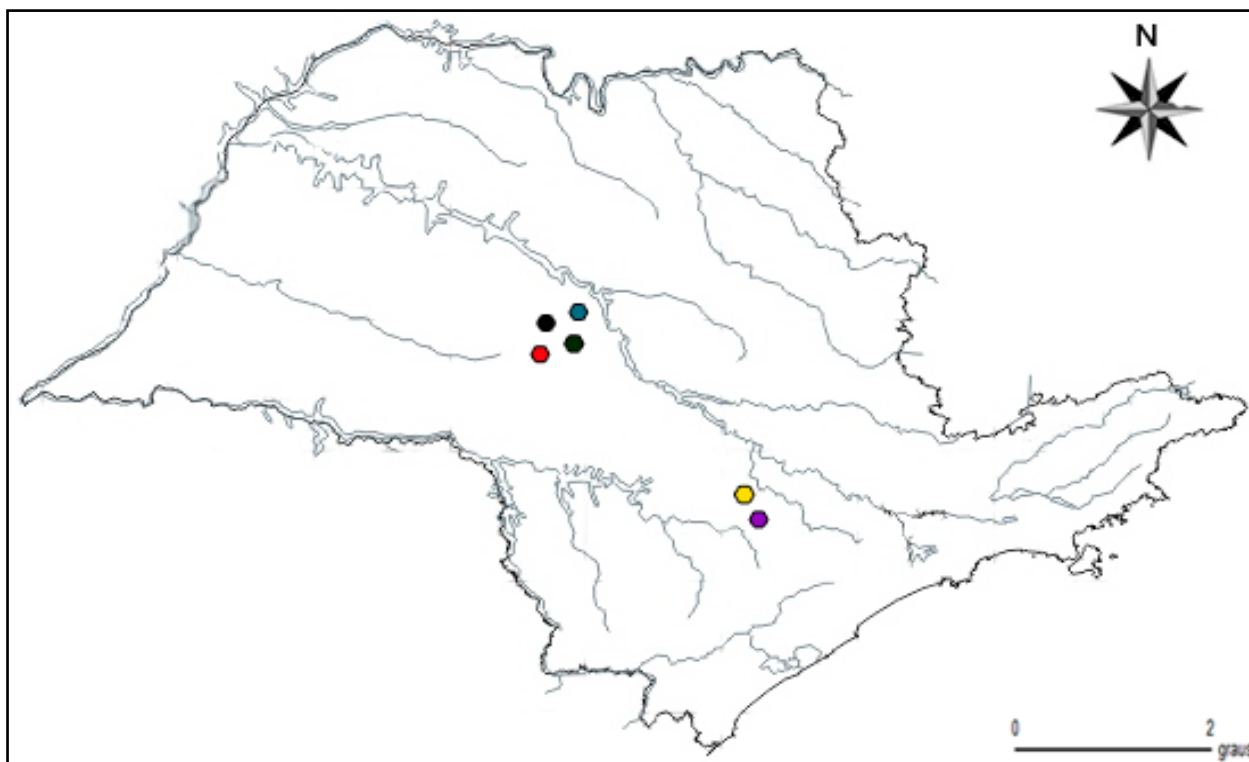


Figura 2: Mapa hidrográfico do estado de São Paulo. Os pontos coloridos indicam as respectivas localizações dos locais onde ocorreram as coletas dos exemplares. Rio Alambari/Paranapanema (vermelho), Rio Batalha/Tiete (preto), Rio Campo Novo/Tiete (verde), Rio Barra Seca/Tiete (azul), Rio Capivara/Tietê (amarelo); Cachoeira Vêu Noiva/Tietê (roxo).

Tabela 1: Relação dos locais e indivíduos amostrados:

Localização	Bacia hidrográfica	N amostral	Coordenadas
córrego Alambari – Piratininga/Brasília Pta./SP	Paranapanema	89	22°18'50,26" S, 48°53'21,26" W
Cachoeira Vêu noiva – Botucatu/SP	Paranapanema	11	22°59'25" S, 48°25'40" W
Rio Batalha – Bauru/SP	Tietê	17	22°6'40,92" S, 49°16'5,81" W
córrego Campo Novo – Bauru/Agudos/SP	Tietê	15	22°23'8,35" S, 49°55'63" W
córrego Barra Seca – Bauru/Jaú/SP	Tietê	21	22°27'6,12" S, 48°53'44,34" W
Rio Capivara – Botucatu/SP	Tietê	16	22°53'57" S, 48°23'11" W

3.2 MÉTODOS

Para a análise citogenética das amostras, foram utilizados os métodos de estimulação de mitoses (Oliveira *et al.*, 1988), preparações diretas de células renais *in vivo* (Foresti *et al.*, 1981), coloração das regiões organizadoras de nucléolo (RONS) com nitrato de Prata (Howell e Black, 1980) e Bandamento C (Sumner, 1972). As técnicas citogenética-moleculares utilizadas foram a hibridação *in situ* fluorescente (Pinkel *et al.*, 1986) com sondas dos genes ribossomais 5S (Pendás *et al.*, 1994) e 18S (Hatanaka e Galetti Jr, 2004), histona H1 (Hashimoto *et al.*, 2011), elementos transponíveis *Rex1*, *Rex3* (Volff *et al.*, 1999, 2000), e microdissecção e pintura cromossômica (Mühlmann *et al.*, 1995). A montagem dos cariótipos, seguiu o protocolo proposto por Levan *et al.* (1964).

3.2.1 Estimulação de Mitoses

Para a obtenção das preparações cromossômicas, foi adotada a técnica de estimulação de divisão celular, que consiste na inserção de uma solução de fermento biológico na cavidade abdominal do animal, descrita por Oliveira *et al.* (1988) para peixes. O procedimento utilizado consiste em:

- 1) preparar uma solução de fermento biológico (Fleischmann) na seguinte proporção: 0,5g de fermento, 0,5g de açúcar e 7mL de água destilada;
- 2) incubar a solução em uma estufa (37° C) por cerca de 30 min;
- 3) injetar a solução na região dorso-lateral do peixe, na proporção de 1mL para cada 100 g de peso do animal. A dose administrada pode ser realizada em duas doses, dividida e aplicada em um período de 48 hs;

- 4) manter o animal em aquário bem aerado.

3.2.2 Obtenção de cromossomos metafásicos *in vivo*

A técnica utilizada para obtenção de cromossomos metafásicos *in vivo* foi a descrita por Foresti *et al.* (1981), utilizada com algumas adaptações. Essa técnica envolve consiste na inibição da polimerização dos microtúbulos através da ação da colchicina, seguida consequentemente de uma hipotonização das células em suspensão, seguindo-se a fixação celular através de uma mistura de metanol/ácido acético.

O procedimento consiste em:

- 1) injetar, na região intra-abdominal, solução aquosa de colchicina (0,025%) na proporção de aproximadamente 1mL para cada 100g de peso do animal;
- 2) deixar o peixe em aquário bem aerado, por um período aproximado de 50 min;
- 3) sacrificar o animal, e retirar o rim anterior, posterior e por algumas ocasiões parte das brânquias. Transferir o material para uma pequena cuba de vidro, contendo 7mL de uma solução hipotônica de KCL (0,075M);
- 4) dissociar o material com o auxílio de pinças de dissecação, complementando esse processo com o auxílio de uma pipeta Pasteur, até que se obtenha uma solução aquosa homogênea;
- 5) transferir a solução obtida para um tubo de centrífuga e depositar este no interior de uma estufa a 37°C por 21 min;
- 6) retirar o tubo da estufa, colocando 7 gotas de fixador gelado (metanol e ácido acético na proporção de 3:1 respectivamente); agitar levemente a mistura com uma pipeta Pasteur e deixar repousar por 5 min à temperatura ambiente;

- 7) adicionar cerca de 6mL de fixador e novamente agitar a mistura; levar à centrífuga (900 ± 100 rpm) por 10 min;
- 8) retirar o sobrenadante, e logo após ressuspender o material precipitado em 7mL de fixador; centrifugar por 7 min a 900 ± 100 rpm;
- 9) repetir o item 8 por duas ou três vezes, para uma boa lavagem e completa fixação uma das células em suspensão;
- 10) pingar o material em lâminas previamente tratadas em solução de HCL 10%;
- 11) deixar secar ao ar.

3.2.3 Detecção da Região Organizadora de Nucléolo (RON) por meio de Impregnação com Nitrato de Prata (Ag-NO₃)

O procedimento utilizado baseou-se na técnica descrita originalmente por Howell e Black (1980), sendo utilizadas duas soluções:

Solução A (solução coloidal reveladora): Composta por: 1g de gelatina bem dissolvida em 50mL de água destilada. Acrescentam-se 0,5mL de ácido fórmico a esta solução.

Solução B (solução de nitrato de Prata): Composta por 1g de Ag-NO₃ dissolvida em 2mL de água destilada. Depois de preparadas, ambas as soluções devem ser reservadas em frascos escuros, e mantidas a uma temperatura de 4°C.

O procedimento para a coloração das RONS está descrito como segue:

- 1) hidrolisar o material contido nas lâminas por 3 min em HCl 1N a 60°C;
- 2) secar as lâminas. Pingar uma gota da solução A e duas gotas da solução B sobre o material na lâmina, cobrindo imediatamente após com uma lamínula;

- 3) deixar as lâminas sobre um suporte no interior de um banho-maria a 60°C. Em alguns minutos (aproximadamente 4), a mistura das soluções, em consequência de reações químicas, torna-se marrom dourada;
- 4) lavar a lâmina em água destilada, retirando a lamínula e deixar secar;
- 5) corar com Giemsa na proporção de 1:30 em tampão fosfato (pH = 6,7) por aproximadamente 10-15 seg;
- 6) deixar secar ao ar.

3.2.4 Caracterização da Heterocromatina Constitutiva (Banda C)

Para a caracterização da heterocromatina constitutiva (banda C), foi utilizada a técnica descrita inicialmente por Sumner (1972) com algumas modificações, e caracteriza-se pela ação sequencial de ácido, base e solução salina para eliminar seletivamente o DNA cromossômico, permanecendo intactas somente regiões de heterocromatina, mais compactadas.

A técnica consiste em:

- 1) hidrolisar o material contido nas lâminas por 30 minutos em HCl 0,2N em temperatura ambiente, e posteriormente lavar com água destilada, retirando todo o excesso restante de HCL;
- 2) passar por uma solução de BaOH₂ a 5% por cerca de 5-15 segundos e posteriormente lavar com água destilada;
- 3) banhar em HCl 1N a 60°C, e logo em seguida lavar novamente com água destilada;
- 4) incubar por 30 minutos em 2xSSC (pH=6,8) a 60°C e lavar com água destilada;

5) corar por aproximadamente 30 minutos com Giemsa a 7,5% em tampão fosfato (pH=6,7).

3.2.5 Extração do DNA genômico total

O DNA genômico total da espécie *Astyanax bockmanni* foi isolado com base no protocolo do kit comercial “Wizard Genomic DNA Purification Kit – Promega”, com algumas adaptações, uma vez que os tecidos utilizados foram nadadeiras. A integridade das amostras de DNA extraído foi analisada através de eletroforese em gel de agarose 1%, corado com SYBR® Safe DNA (0,015µL/mL), e visualizadas em transluminador ultravioleta (UV). Para quantificação do DNA foram utilizadas comparações diretas com um marcador padrão de peso e concentração moleculares conhecidos (Low DNA Mass Ladder - Invitrogen), configurando um padrão de banda que nos permitiu inferir que o DNA extraído era de boa qualidade. Todos os tecidos utilizados encontram-se preservados/armazenados em etanol 100% no banco de tecidos do Laboratório de Genética de Peixes (LaGenPe).

3.2.6 Preparação das sondas para a Hibridação *in situ* Fluorescentes (FISH)

Para realização da técnica de hibridação *in situ* com sondas fluorescentes, inicialmente o DNA foi marcado com Biotina-16-dUTP (Roche Applied Science) ou Digoxigenina-11-dUTP (Roche Applied Science) através de PCR, segundo as instruções do fabricante (Bionick™ Labelling System-Gibco.BRL), e a detecção dos sinais amplificados realizada pela ação dos agentes antidigoxigenina-rodamina

(Roche®) e avidina-FITC (SigmaAldrich, Buchs, SG, Switzerland). Logo após, procedeu-se a técnica descrita por Oliveira e Wright (1998).

3.2.6.1 Preparação das sondas de DNAr 5S e 18S

As sondas de DNAr 5S e 18S foram obtidas por PCR (Polymerase Chain Reaction) a partir do DNA genômico total de *Astyanax bockmanni*, usando os *primers* 5S A (5'-TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3') e 5S B (5'-TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGGAATCA-3') (Pendás *et al.*, 1994), 18S A (5'-TACGCCCCGATCTCGTCCGATC-3') e 18S B (5'-CAGGCTGGTATGGCCGTAAGC-3') (Hatanaka e Galetti Jr., 2004). Os parâmetros para marcação das sondas foram: DNAr 5S: 15,5µl de água Mili-Q; 2,5µl de tampão da enzima Taq polimerase (10X); 0,75µl de MgCl₂ (25mM); 2,0µl de dNTPs mix (2mM); 0,5µl de Digoxigenina-11-dUTP ou Biotina-16-dUTP; 1,0µl de cada primer (10mM); 0,2µl de Taq polimerase (5U/µL) e 1,5µl de DNA genômico total. Para o gene 18S foram utilizados 15,8µl de água Mili-Q; 2,5µl de tampão da enzima Taq polimerase (10X); 0,75µl de MgCl₂ (25mM); 3,0µl de dNTPs mix (2mM); 0,5µl de Digoxigenina-11-dUTP ou Biotina-16-dUTP; 1,0µl de cada primer (10mM); 0,15µl de Taq polimerase (5U/µL) e 1,0µl de DNA genômico, com volume final de 25µl para ambas as sondas. Os programas de PCR utilizados apresentaram as seguintes condições: para DNAr 5S:

	95°C-----5 min.
35 ciclos	60°C----- $\left\{ \begin{array}{l} 95^\circ\text{C}-----45 \text{ seg.} \\ 30 \text{ seg.} \\ 72^\circ\text{C}-----1 \text{ min.} \end{array} \right.$
	72°C-----7 min.
	15°C-----manutenção

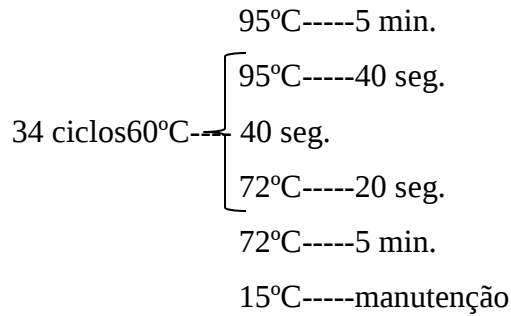
Para o DNAr 18S, o programa utilizado foi o seguinte:

95°C-----5 min.
 34 ciclos $\left\{ \begin{array}{l} 95^{\circ}\text{C}-----45 \text{ seg.} \\ 60^{\circ}\text{C}-----30 \text{ seg.} \\ 72^{\circ}\text{C}-----1 \text{ min.} \end{array} \right.$
 72°C-----7 min.
 15°C-----manutenção

3.2.6.2 Preparação das sondas dos genes para a Histona H1 e H3

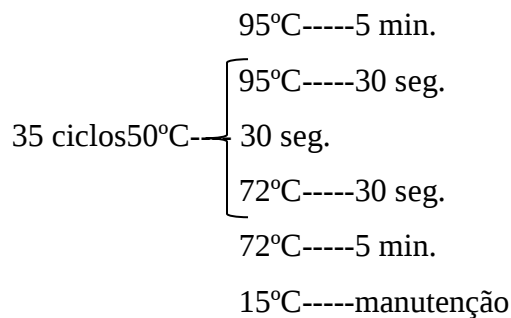
Para o isolamento e amplificação de sequências parciais do gene histona H1, foram utilizados os *primers* degenerados H1 F (5'-ATGGCAGAARYCGCMCCAGC-3') e H1 R (5'-TACTTCTTCTTGGGSGCTGC-3'), segundo Hashimoto *et al.* (2011). A sonda H3 foi obtida a partir do *primer* H3 F (5'-ATGGCTCGTACCAAGCAGACVGC-3') e H3 R (5'-ATATCCTTRGGCATRGTGAC-3') (Colgan *et al.*, 1998). Para a histona H1, os parâmetros para marcação das sondas foram: 15,96µl de água Mili-Q; 2,5µl de tampão da enzima Taq polimerase (10X); 0,75µl de MgCl₂ (25mM); 1,5µl de dNTPs mix (2mM); 0,4µl de Digoxigenina-11-dUTP ou Biotina-16-dUTP; 1,0µl de cada *primer* (10mM); 0,2µl de Taq polimerase (5U/µL) e 1,5µl de DNA genômico. Para histona H3 foram utilizados 15,95µl de água Mili-Q; 2,5µl de tampão da enzima Taq polimerase (10X); 0,75µl de MgCl₂ (25mM); 1,5µl de dNTPs mix (2mM); 0,5µl de Digoxigenina-11-dUTP ou Biotina-16-dUTP; 1,0µl de cada *primer* (10mM); 0,2µl de Taq polimerase (5U/µL) e 1,5µl de DNA genômico, com volume final de 25µl para ambas as sondas.

O programa utilizado para as histonas H1 e H3 apresentou as seguintes condições:



3.2.6.3 Preparação das sondas para os elementos transponíveis *Rex1*, *Rex3* e *Rex6*

Os *primers* utilizados para a marcação dos elementos transponíveis foram: RTX1-F1 (5'-TTCTCCAGTGCCTTCAACACC-3') e RTX1-R1 (5'-TTCCTTAAAAATAGAGTCTGCTC-3') para *Rex1* (Volff *et al.*, 1999, 2000), RTX3-F1 (5'-TACGGAGAAAACCCATTTTCG-3') e RTX3-R1 (5'-AAAGTTCCTCGGTGGCAAGG-3') para *Rex3* (Volff *et al.*, 1999, 2000). Rex6 F (5'-TAAAGCATACATGGAGCGCCAC-3') e Rex6 R (5'-GGTCCTCTACCAGAGGCCTGGG-3') (Volf *et al.*, 2001) para o transposon *Rex6*, onde os parâmetros para marcação das sondas *Rex1* e *Rex3* foram: 16,7µl de água Milli-Q; 2,5µl de tampão da enzima Taq polimerase (10X); 0,75µl de MgCl₂ (25mM); 1,0µl de dNTPs mix (2mM); 0,6µl de Digoxigenina-11-dUTP ou Biotina-16-dUTP; 1,0µl de cada primer (10mM); 0,2µl de Taq polimerase (5U/µL) e 1,5µl de DNA genômico. O programa de PCR utilizado para a produção das duas sondas foi:



Para a sonda do elemento transponível *Rex6*, os parâmetros para marcação foram: 16,5µl de água Mili-Q; 2,5µl de tampão da enzima Taq polimerase (10X); 0,75µl de MgCl₂ (25mM); 1,5µl de dNTPs mix (2mM); 0,6µl de Digoxigenina-11-dUTP ou Biotina-16-dUTP; 1,0µl de cada primer (10mM); 0,2µl de Taq polimerase (5U/µL) e 1,5µl de DNA genômico. Os padrões utilizados no programa foram:

	95°C-----5 min.
34 ciclos	95°C-----30 seg.
	55°C-----30 seg.
	72°C-----20 seg.
	72°C-----7 min.
	15°C-----manutenção

Os produtos gerados de todas as sondas marcadas foram checados em gel de agarose 1%.

3.2.7 Microdissecção Cromossômica

3.2.7.1 Agulhas/Micropipetas

Foram utilizados capilares de borosilicato com aproximadamente 1mm de diâmetro, estes, foram colocados em um “pulley” (Narishige PC-10) e posteriormente sofreram um aquecimento previamente conhecido, formando a ponta da agulha a ser utilizada. De acordo com o tamanho de cada cromossomos a ser pinçado, esta temperatura poderia ser maior ou menor, para um melhor ajuste do calibre da agulha a ser utilizada. Após a preparação das agulhas, elas foram armazenadas em local protegido para evitar a contaminação.



Figura 3. Equipamento utilizado na obtenção de agulhas para a realização da microdissecção cromossômica.

3.2.8 Preparação do material a ser microdissecado

Em parceria com o Laboratório de Biologia e Genética de Peixes Unesp/Botucatu, coordenado pelos Profs. Dr. Fausto Foresti e Dr. Cláudio de Oliveira, foram microdissecados 10 microcromossomos B acrocêntricos (B_a) da população de *Astynax bockmanni* do Rio Alambari, a única população onde foram observados estes elementos. Para a realização da técnica de microdissecção, preparações cromossômicas de *A. bockmanni* contendo cromossomos B foram utilizadas, onde, após a fixação, estes materiais foram mantidos em metanol 100%, e armazenados em freezer a T° C aproximadamente a -4°C. No momento da utilização, as células foram centrifugadas e ressuspensas em fixador (metanol gelado + ácido acético na proporção de 3:1) gotejadas em uma lamínula lavada com água e sabão, deixada secar ao ar, e posteriormente coradas com Giemsa 5%.

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

- 1) Diluir uma alíquota da suspensão celular final no fixador (metanol: ácido acético na proporção 3:1), respectivamente;

- 2) Pingar a suspensão em lamínulas. Secar o material ao ar e, posteriormente corá-lo com solução de Giemsa diluída a 5% em tampão fosfato (KH_2PO_4 0,06M e Na_2HPO_4 0,449M, pH 6.8) durante 5 minutos;
- 3) Lavar as lamínulas com sabão líquido neutro, enxaguar em água destilada, e deixar secar ao ar;
- 4) Com auxílio de uma pipeta, pingar 16ul da preparação na lamínula previamente aquecida “no bafo” em banho-maria;
- 5) Colocar a lamínula contendo a preparação celular num microscópio invertido (Axiovert 100 – Zeiss) e proceder a microdissecção dos cromossomos com o auxílio de uma agulha de vidro ligada a um micromanipulador mecânico (Eppendorf);
- 6) Colocar os cromossomos microdissecados em um microtubo de PCR.

3.2.7.3 Kit GenomePlex® Single Cell Whole Genome Amplification (WGA4–Sigma)

A reação de amplificação consistiu na fragmentação aleatória não enzimática do DNA genômico seguida pela ligação de adaptadores com os dois locais de iniciação de PCR específicos para ambas extremidades de cada fragmento conforme proposto por Marshall *et al.* (2004).

Etapa 1 - Fragmentação:

- 1) Adicionar 1ul da solução *Lysis and Fragmentation Buffer* (0,5ul de proteinase K + 8ul de tampão 10x) a um tubo de microcentrífuga contendo os cromossomos microdissecados;

- ### *Etapa 2 – Preparação da Biblioteca:*

- 14 ciclos
- | | | |
|------|-------|------------|
| 16°C | ----- | 20 min. |
| 24°C | ----- | 20 min. |
| 37°C | ----- | 20 min. |
| 75°C | ----- | 5 min. |
| 15°C | ----- | manutenção |

Na sequência, foi realizada uma reação de amplificação, adicionando um mix contendo 48,5µl de água ultrapura, 7,5µl de *10x Amplification Master Mix* e 5,0µl de *WGA DNA polimerase*. A amostra foi submetida ao seguinte programa:

- 31

3.2.7.4 Reamplificação do material microdissecado

Para cada reação de amplificação foi preparado o seguinte mix de reação: 15,0µl de água livre de nuclease; 2,5µl 10x Amplification Master Mix; 1,7µl WGA DNA polimerase; 1,0µl dNTP (2mM cada); 0,3µl dTTP (2mM); 0,7µl Digoxigenina dUTP (1mM); 2,0µl DNA amplificado

Os produtos das amostras obtidas foram submetidos ao seguinte programa:

95°C-----3 min.
 14 ciclos $\left\{ \begin{array}{l} 94^{\circ}\text{C}-----15 \text{ seg.} \\ 65^{\circ}\text{C}-----5 \text{ min.} \end{array} \right.$
 4°C-----manutenção

3.2.7.5 PCR de marcação da sonda do DNA isolado do cromossomo B com o Kit GenomePlex® Single Cell Whole Genome Amplification (WGA3–Sigma)

Na PCR de marcação foram utilizados os reagentes descritos abaixo, com volume final de 50µL.

30,7µL de água Mili-Q; 5,0µL de tampão (10X); 1,5µL de MgCl₂ (50mM), 1,0µL de dATP, dCTP, dGTP e 0,6µL de dTTP (2mM cada); 0,7µL de Digoxigenina-11-dUTP (1mM); 5,0µL de primer (10µM); 0,5ml de Taq (5U/µL) e 2,0µL de DNA produto 2ª PCR.

As condições de amplificação estão descritas abaixo:

90°C-----3 min.
 14 ciclos $\left\{ \begin{array}{l} 90^{\circ}\text{C}-----1:30 \text{ min.} \\ 56^{\circ}\text{C}-----1:30 \text{ min.} \\ 75^{\circ}\text{C}-----1:30 \text{ min.} \end{array} \right.$
 4°C-----manutenção

A sonda criada a partir do B_a isolado de *A. bockmanni* foi denominada B_{abock}, e checada em gel de agarose 1% (figura 3).

3.3 Hibridação *in situ* fluorescente (*FISH*) e *Zoo-FISH*

O mapeamento das sondas de DNAr 5S e 18S, histona H1 e H3, elementos transponíveis *Rex1*, *Rex3*, e *Rex6*, e da sonda B_{abock} em cromossomos metafásicos foi realizado por hibridação fluorescente *in situ* de acordo com o procedimento estabelecido por Pinkel *et al.* (1986), com algumas modificações.

3.3.1 Preparação, limpeza, e detecção dos sinais da *FISH* (*FISH*) e *Zoo-FISH*

A realização da *FISH* e *Zoo-FISH* compreenderam duas etapas, as quais estão descritas abaixo:

Etapas 1: Preparação das lâminas:

- 1) Lavar as lâminas a serem utilizadas inicialmente em solução PBS 1x (7,58g NaCl + 1L H₂O destilada) por 5 minutos à temperatura ambiente;
- 2) Em seguida, desnaturar em série alcoólica (70, 85 e 100%) a -20°C por 5 minutos cada.
- 3) Aplicar solução de RNase (0,4mL RNase + 96mL de solução 2xSSC), e cobrir com uma lamínula de vidro (24x60mm);
- 4) Deixar as lâminas em câmara úmida e escura a 37°C por uma hora;
- 5) Após este tempo, remover cuidadosamente a lamínula passar a lâmina por uma solução de formamida 70% a 72°C por 5 minutos;
- 6) Logo após, passar as lâminas imediatamente em etanol 70%;

- 7) Em seguida, desidrata-las em série alcoólica (70, 85 e 100%) a -20°C;
- 8) Diluir para cada lâmina, 3µL de sonda + 12µL de solução de hibridação (10% sulfato dextrano, 50% formamida e 20xSSC e H₂O destilada), com volume final de 15µL para cada gota;
- 9) Desnaturada esta solução foi em um termociclador a 90°C por 10 minutos;
- 10) Logo após, aplicar 15µL da solução contendo a sonda marcada em cada gota nas lâminas;
- 11) Cobrir a lâmina com lamínula de vidro (24x40mm), e incubar a mesma em câmara úmida e escura a 37°C *overnight*.

Etapas 2: Lavagem das lâminas e detecção dos sinais correspondentes:

- 1) Após o período de hibridação, remover cuidadosamente as lamínulas e lavar 2x em solução de estringência 15% (30mL de Formamida 100% + 30mL de 2xSSC + 150mL H₂O destilada) a 42°C por 5 minutos cada;
- 2) Em seguida, lavar as lâminas três vezes em solução de 0,1xSSC a 60°C por 5 minutos cada;
- 3) Posteriormente, lavar as lamínulas em solução Tween 0,5% (200mL 20xSSC + 0,5mL Tween 100% + 899,5mL H₂O destilada) à T°C ambiente por 5 minutos;
- 4) Após as lavagens, aplicar sobre as lâminas 25µL de solução tampão de bloqueio (5g leite em pó desnatado + 20mL 20xSSC + 80mL H₂O Miliq), e cobrir com lamínula de vidro (24x40mm);
- 5) Incubar o material em câmara úmida e escura por 15 minutos a 37°C;
- 6) Logo após o período de incubação, lavar as lâminas 2x em Tween 0,5% à T°C ambiente;

- 7) Incubar por 45 minutos em câmara úmida e escura a 37°C com 20µL de solução tampão de bloqueio + anticorpo (14µL de solução de bloqueio + 6µL de antidigoxigenina-rodamina ou avidina conjugada com FITC);
- 8) Após este período, lavar novamente as lâminas 3x com Tween 0,5% por 5 minutos cada;
- 9) Desidratar em série de alcoólica 70%, 85% e 100% por 5 minutos e deixar secar ao ar;
- 10) Em seguida, aplicar 12µL do contra corante DAPI (4',6-diamino-2-phenylindole, Vector Laboratories) em cada gota e cobrir com lamínula de vidro (24x40mm);
- 11) As lâminas tiveram então suas extremidades lacradas com esmalte transparente, reservadas em câmara escura, e armazenadas em freezer a -20°C por aproximadamente 3 horas;
- 12) Após este período de incubação final, as lâminas foram analisadas em um fotomicroscópio de fluorescência (BX50, Olympus) e as imagens capturadas por uma câmera digital refrigerada Qcolor5, através do Software QCapture Pro 5.1.1.14.

3.4 Estudos cariotípicos

A partir dos dados obtidos através das análises e contagens dos cromossomos em cerca de 30 metáfases em cada indivíduo estudado, procurou-se estabelecer um número diploide modal para os exemplares da espécie em questão. Desta forma, As imagens foram capturadas por uma câmera digital refrigerada Olympus Qcolor5, acoplada a um fotomicroscópio de fluorescência (BX50, Olympus), com auxílio do Software QCapture Pro 5.1.1.14.

3.5 Montagem dos Cariótipos

Os cromossomos foram inicialmente arranjados com o Software Adobe Photoshop versão CS5 de acordo com seu tamanho e morfologia, sendo classificados como metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a), emparelhados com seus prováveis homólogos, e dispostos em ordem decrescente de tamanho para a organização final do cariótipo, conforme proposto por Levan *et al.* (1964).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As informações obtidas através dos estudos genéticos efetuados nas diferentes populações da espécie *Astyanax bockmanni* reportadas, são apresentados a seguir na forma de três capítulos, caracterizados como artigos científicos.

Capítulo 1

Caracterização citogenética de populações de *Astyanax bockmanni* (TELEOSTEI, CHARACIFORMES) das bacias hidrográficas dos rios Tiete e Paranapanema, SP

Capítulo 2

Organização e distribuição cromossômica de genes histônicos e transposons da família *Rex* no genoma de *Astyanax bockmanni* (TELEOSTEI, CHARACIFORMES)

Capítulo 3

Associações entre cromossomos supranumerários de diferentes espécies do gênero *Astyanax*: inferências por Zoo-FISH

CAPÍTULO 1

**Caracterização citogenética de populações de *Astyanax bockmanni*
(TELEOSTEI, CHARACIFORMES) das bacias hidrográficas dos rios
Tiete e Paranapanema, SP**

Resumo

O gênero *Astyanax* é caracterizado por apresentar, em sua maioria, número modal conservado de $2n=50$ cromossomos na maioria das espécies, inclusive *A. bockmanni*, que adicionalmente, apresenta em seu conjunto genômico polimorfismos de Ag-NOR, heterocromatina constitutiva, e presença de diferentes morfotipos de cromossomos B. Entretanto, poucos estudos foram dedicados às relações existentes entre as diferentes populações desta espécie. Assim, objetivamos averiguar as relações cariotípicas, cromossômicas e o comportamento de genes ribossomais em seis populações providas de duas bacias hidrográficas do estado de São Paulo. No presente estudo vimos que as seis populações de *A. bockmanni* estudadas apresentaram $2n=50$ cromossomos, com a presença de supranumerários apenas na população do córrego Alambari. Estes supranumerários apresentaram morfologia, tamanho e padrões de heterocromatina completamente particulares. Adicionalmente, as seis populações apresentaram divergências dos padrões de heterocromatina constitutiva e RONS múltiplas, com exceção da população do rio Capivara, que apresentou RONS simples. A *FISH* do DNAr 5S mostrou um padrão de distribuição conservado deste gene, localizado apenas em dois pares cromossômicos nas seis populações. Por outro lado, o gene ribossomal 18S apresentou marcações múltiplas e polimórficas inter e intra individuais, conforme previamente constatado pela Ag-NOR. Portanto, vimos que há uma conservação cromossômica de *A. bockmanni* nas duas bacias analisadas. Ainda, as populações Campo Novo, Barra Seca e Batalha (pertencentes à bacia do Tietê) apresentaram, além do conservadorismo cromossômico e DNAr 5S, compartilharam algumas características peculiares, como mesma fórmula e distribuição cariotípica, RONS, heterocromatina e DNAr 18S múltiplos. Acreditamos ainda, que questões geográficas, modo de vida (normalmente restritos a cabeceiras de rios e riachos) e processos de especiação estão associadas às diferenças cariotípicas e cromossômicas observadas entre as duas bacias hidrográficas.

Introdução

Os peixes representam o grupo de organismos mais diversificado dentre os vertebrados, apesar disso, as espécies que apresentam cromossomos morfologicamente diferenciados demonstram uma grande variabilidade de sistemas, principalmente os peixes Neotropicais (Oliveira *et al.*, 2006). Embora as diferenças morfológicas aparentes sejam reduzidas em muitos casos, características observadas nos padrões de comportamento (Gilbert e Walsh, 2005), estrutura cariotípica (Moreira-Filho e Bertollo, 1991; Amaro *et al.*, 2012), variações de proteínas (Fong e Garthwaite, 1994) ou ainda sequências de DNA (Pansonato-Alves *et al.*, 2013a,b) são muitas vezes utilizadas, e permitem uma primeira abordagem segura na identificação de espécies.

No gênero *Astyanax* reportamos a ocorrência de 141 espécies já bem definidas morfologicamente (Lucena *et al.*, 2013), entretanto, uma grande parcela de populações destas espécies ainda carecem de informações citogenéticas básicas, o que ressalta a necessidade de estudos dessa natureza no grupo, pois grande parte destas características cariotípicas são ainda muitas vezes subestimadas devido à falta de maiores investigações entre as diversas espécies e populações do gênero. Aliado à citogenética clássica, o mapeamento físico de sequências de DNA e genes específicos têm sido outra importante ferramenta, (Vicari *et al.*, 2011; Hashimoto *et al.*, 2011; Daniel *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2013; Pansonato-Alves *et al.*, 2013a), principalmente no que diz respeito ao mapeamento do DNAr 5S e 18S, o que tem gerado informações significativas acerca da estrutura, organização e evolução destas sequências no genoma destes animais.

Outra importante característica observada em algumas espécies de *Astyanax* é a presença de Cromossomos B, que em sua maioria, são facilmente identificados, principalmente devido ao seu padrão completamente heterocromático (Moreira-Filho *et*

al., 2001; Artoni *et al.*, 2006; Hashimoto *et al.*, 2008; Machado *et al.*, 2012). Também, Daniel *et al.* (2012) relataram que na espécie *A. bockmanni* cromossomos B podem apresentar frequência variável de 0-2 cromossomos, diferentes padrões de heterocromatina, polimorfismos de tamanho, ou ainda morfotipos, B_M, B_m e B_a.

Assim, o objetivo do atual trabalho foi caracterizar e mapear citogeneticamente seis populações de *Astyanax bockmanni* aplicando bandamentos cromossômicos clássicos (Giemsa, Ag-NOR e Banda C) e *FISH* com sondas de DNAr 5S e 18S, que podem auxiliar no entendimento dos processos envolvidos na diferenciação e diversificação cariotípica entre populações e bacias hidrográficas desta e outras espécies do gênero.

Material e métodos

Foram analisados indivíduos de *A. bockmanni* amostrados de seis populações das bacias hidrográficas dos rios Tietê e Paranapanema. Os animais foram anestesiados e após o seu sacrifício, um pedaço da nadadeira caudal de cada indivíduo foi subtraída e conservada em etanol 100%, e posteriormente realizada a extração de DNA genômico total. Após, estes exemplares foram inicialmente fixados em formol a 10%, conservados em álcool 70%, e depositados na coleção do Laboratório de Genética de Peixes da Faculdade de Ciências de Bauru. Os cromossomos mitóticos foram obtidos por meio de tecido renal seguindo-se a técnica referida em Foresti *et al.* (1981). A marcação das RONS pelo nitrato de Prata seguiu a técnica proposta por Howell e Black (1980) e o bandamento C, o protocolo descrito por Sumner (1972).

Para a amplificação e marcação das sondas de DNAr foram utilizados os *primers* 5S A (5'-TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3') e 5S B (5'-

TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGGAATCA-3') (Pendás *et al.*, 1994), e 18S A (5'-TACGCCCCGATCTCGTCCGATC-3') e 18S B (5'-CAGGCTGGTATGGCCGTAAGC-3') (Hatanaka e Galetti Jr., 2004). As informações sobre a quantidade, concentração e parâmetros para amplificação e marcação das sondas encontram-se detalhadas no tópico 3 desta dissertação.

A *FISH* com sondas dos sítios de DNAr 5S e 18S realizada de acordo com Pinkel *et al.* (1986), com estringência de 77%, e algumas adequações. As sondas foram marcadas por reação de PCR (Polymerase Chain Reaction) com os agentes biotina 14-dATP e digoxigenina 11-dUTP (Roche Applied Science), e os sinais de hibridação detectados pela ação da Avidina-fluoresceína conjugada (FITC) e anti-digoxigenina-rodamina. As lâminas foram contracoradas com o agente DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride).

As imagens foram capturadas por uma câmera digital refrigerada Olympus Qcolor5, acoplada a um fotomicroscópio de fluorescência (BX50, Olympus), com auxílio do Software QCapture Pro 5.1.1.14. A montagem dos cariótipos, manutenção de brilho e contraste das imagens foram realizados em um programa de edição de imagens (Adobe Photoshop CS5), e posteriormente arranjados em ordem decrescente, de acordo com seu tamanho e morfologia, conforme proposto por Levan *et al.* (1964).

Resultados e discussão

Os estudos citogenéticos em exemplares de *Astyanax bockmanni* provenientes de seis populações e duas bacias hidrográficas revelaram uma conservação do número diplóide igual a 50 cromossomos, característico da espécie, e observado até o momento em todas as populações analisadas (Kavalco *et al.*, 2009; Hashimoto e Porto-Foresti,

2010; Fernandes *et al.*, 2010; Hashimoto *et al.*, 2011; Daniel *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2013), porém, diferenças na fórmula cariotípica e no número fundamental foram encontradas entre as duas bacias hidrográficas, revelando uma variabilidade na macroestrutura cariotípica, provavelmente devido a eventos como inversões pericêntricas, comuns neste grupo de peixes.

Entretanto, apesar do conservadorismo aparente do número diploide nesta espécie, outras espécies do gênero podem apresentar números diploides distintos em uma mesma população. São exemplos disso os casos já bem documentados das espécies *A. fasciatus* (Artoni *et al.*, 2006; Ferreira-Neto *et al.*, 2009, 2012; Pansonato-Alves *et al.*, 2013) e *A. scabripinnis* (Moreira-Filho e Bertollo, 1991). Além do número diploide distinto, estas espécies apontam ainda variação quanto ao número de cromossomos em indivíduos vivendo em simpatria.

Todas as populações reportadas apresentaram cariótipos constituídos por cromossomos dos tipos metacêntricos, submetacêntricos, subtelocêntricos e acrocêntricos, com as seguintes fórmulas cariotípicas: $8m+8sm+18st+16a$ (população Alambari), $6m+14sm+14st+18a$ (população Campo Novo), $6m+14sm+14st+18a$ (população Barra Seca), e $6m+14sm+14st+18a$ (população Batalha) (figura 1). As populações Batalha e Véu de Noiva apresentaram fórmula cariotípica composta por $6m+14sm+16st+14a$ e $4m+7sm+8st+6a$, respectivamente (figuras 1c, f). Estes são os primeiros dados citogenéticos divulgados para ambas as populações. A população Alambari, além do número diploide de $2n=50$ cromossomos, apresentou ainda, 0-2 microcromossomos B em seu genoma, os quais apresentaram morfologia acrocêntrica e metacêntrica, assim como Hashimoto *et al.* (2011) e Daniel *et al.* (2012), que observaram as mesmas morfologias de cromossomos B nesta espécie.

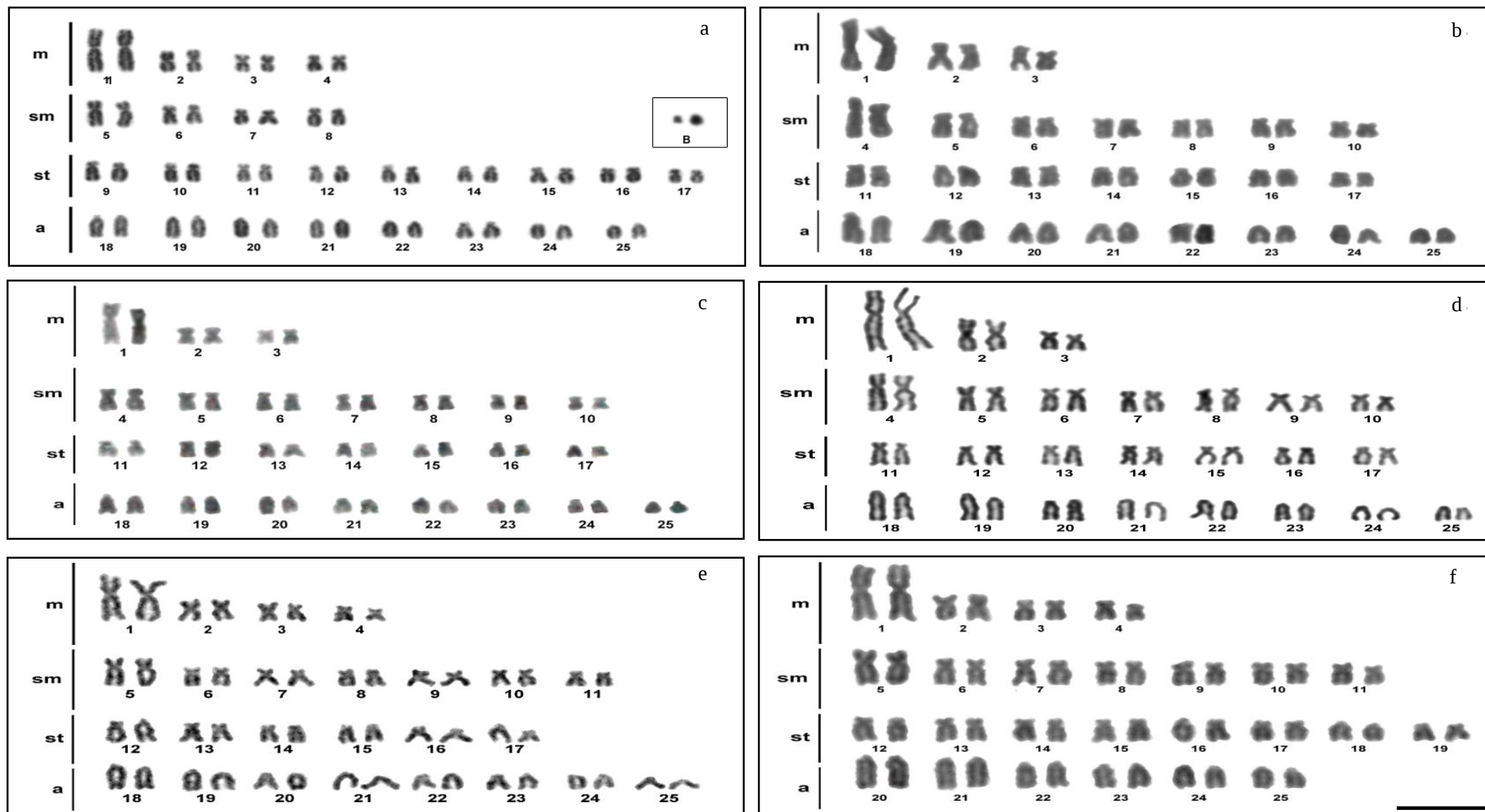


Figura 1: Cariótipos de *Astyanax bockmanni* após coloração convencional Giemsa. Em a população córrego Alambari, b córrego Campo Novo, c córrego Barra Seca, d rio Batalha, e córrego Capivara, f cachoeira Véu de Noiva. Bar 10 µm.

Após análise dos cariótipos, percebemos que as populações Campo Novo, Barra Seca e Batalha (componentes da bacia hidrográfica do rio Tietê e proximamente relacionadas) apresentaram a mesma fórmula e composição cariotípica, indicando que estes citótipos não sofreram rearranjos cromossômicos significativos, mantendo-se conservados nestas populações (figura 1a-c). Dados semelhantes relacionados ao conservadorismo entre populações de uma mesma espécie também são reportados em *A. altiparanae* (Ferreira-Neto *et al.*, 2009), *A. aff. bimaculatus* (Kavalco *et al.*, 2011) e *A. scabripinnis* (Santos *et al.*, 2012). Da mesma forma, outros autores indicam que populações distantes de uma mesma espécie também apresentam distribuição cariotípica distintas (Fernandes e Martins-Santos, 2005; Kavalco *et al.*, 2011; Pansonato-Alves *et al.*, 2013).

Contrariamente, a população Capivara apresentou um cariótipo distinto das demais (figura 1d). O fato de esta população estar mais distante geograficamente das populações Barra Seca, Campo Novo e Batalha, todas da bacia do Tietê (vide figura 1 e tabela 1 no tópico geral de material e metodologia) poderia ter influenciado na diferenciação de sua macroestrutura cromossômica, diferindo das demais que estão mais próximas entre si. Segundo Mayr (1977), alterações cromossômicas tendem a ocorrer independentemente em populações separadas geograficamente.

Nas duas populações da bacia do Paranapanema observamos diferenças sutis em suas constituições cariotípicas (figuras 1a, f). Notadamente há uma maior incidência de cromossomos acrocêntricos na população Véu de Noiva comparados à população Alambari, que apresenta uma maior incidência de cromossomos subtelocêntricos. Rearranjos cromossômicos dos tipos fissão ou translocação robertsoniana poderiam explicar estes eventos. Assim, diferentemente das populações analisadas da bacia do rio

Tietê, estas populações da bacia do rio Paranapanema tendem a um sentido de separação para unidades evolutivas independentes.

O bandamento C aplicado nas populações das duas bacias hidrográficas revelou a presença de blocos heterocromáticos em posição terminal de até dez cromossomos, com uma maior incidência de marcações em cromossomos do tipo acrocêntrico (figura 2). Daniel *et al.* (2012) também observaram um padrão múltiplo de banda C positivas em uma população da bacia do Paranapanema de *A. bockmanni*. Um número elevado de blocos heterocromáticos distribuídos em diversos cromossomos também foram diagnosticados por Kavalco *et al.* (2008) e Silva *et al.* (2013) em outras três populações desta espécie, duas do Paranapanema, e uma do Tietê. De forma contrária, Hashimoto e Porto-Foresti, (2010) reportaram apenas um par de cromossomos banda C positivas em outras duas populações, Barra Seca e Campo Novo, ambas pertencentes à Bacia do rio Tietê.

O padrão de distribuição da heterocromatina evidenciado em *A. bockmanni* assemelha-se aos observados para outras espécies do gênero. Mantovani *et al.* (2000) observaram um polimorfismo inter individual da distribuição da heterocromatina em duas populações de *A. scabripinnis* dos rios Marrecas e Centenário (afluentes da bacia do Paranapanema). De acordo com Ohno (1970), a instabilidade da heterocromatina pode ser resultado da duplicação de um segmento heterocromático, por um *crossing-over* desigual, ou por uma translocação não recíproca, originando assim, dois tipos de gametas portando diferentes quantidades de cromatina. Esta teoria poderia responder os diferentes padrões observados em populações de *A. bockmanni* reportadas por diferentes autores, bem como no atual trabalho.

Em relação aos microcromossomo B, encontrados apenas na população Alambari, estes apresentaram um padrão parcialmente (B_a) e totalmente

heterocromático (B_m) (figura 1a), padrões também observados por Daniel *et al.* (2012) para a mesma espécie e outras espécies do grupo (Porto-Foresti *et al.*, 1997; Moreira-Filho *et al.*, 2001; Ferro *et al.*, 2003; Hashimoto *et al.*, 2008).

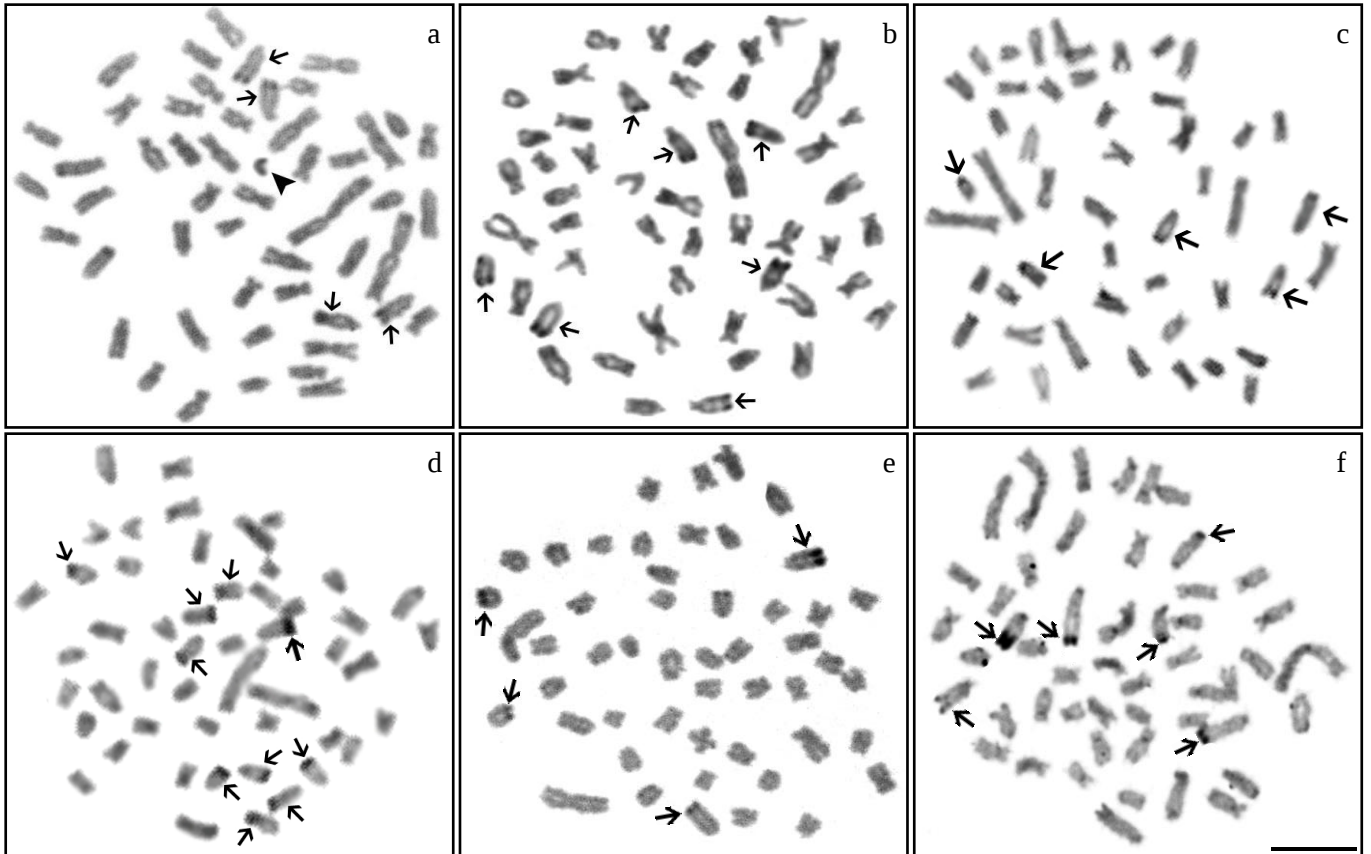


Figura 2: Análise da distribuição da heterocromatina constitutiva através de bandamento C em células metafásicas de *Astyanax bockmanni*. Em **a** população córrego Alambari, **b** córrego Campo Novo, **c** córrego Barra Seca, **d** rio Batalha, **e** córrego Capivara, **f** cachoeira Veu de Noiva. Bar 10 μ m.

Através da impregnação com nitrato de Prata, vários sítios Ag-NORs foram detectados nas seis populações analisadas, predominando um sistema de RONS múltiplas e variação inter e intraindividual, com exceção da população do córrego Capivara, que apresentou apenas um par de cromossomos portando RONS. Estas marcações concentram-se principalmente nas regiões terminais dos cromossomos, e em alguns casos inclusive, não correspondendo ao seu homólogo (figura 3). Dessa forma, aparentemente, as informações levantadas convergem para um padrão de distribuição múltiplo e variável das RONS em populações de *A. bockmanni*. A impregnação com

nitrito de Prata não indicou atividades nucleolares em nenhum dos dois supranumerários reportados para esta espécie.

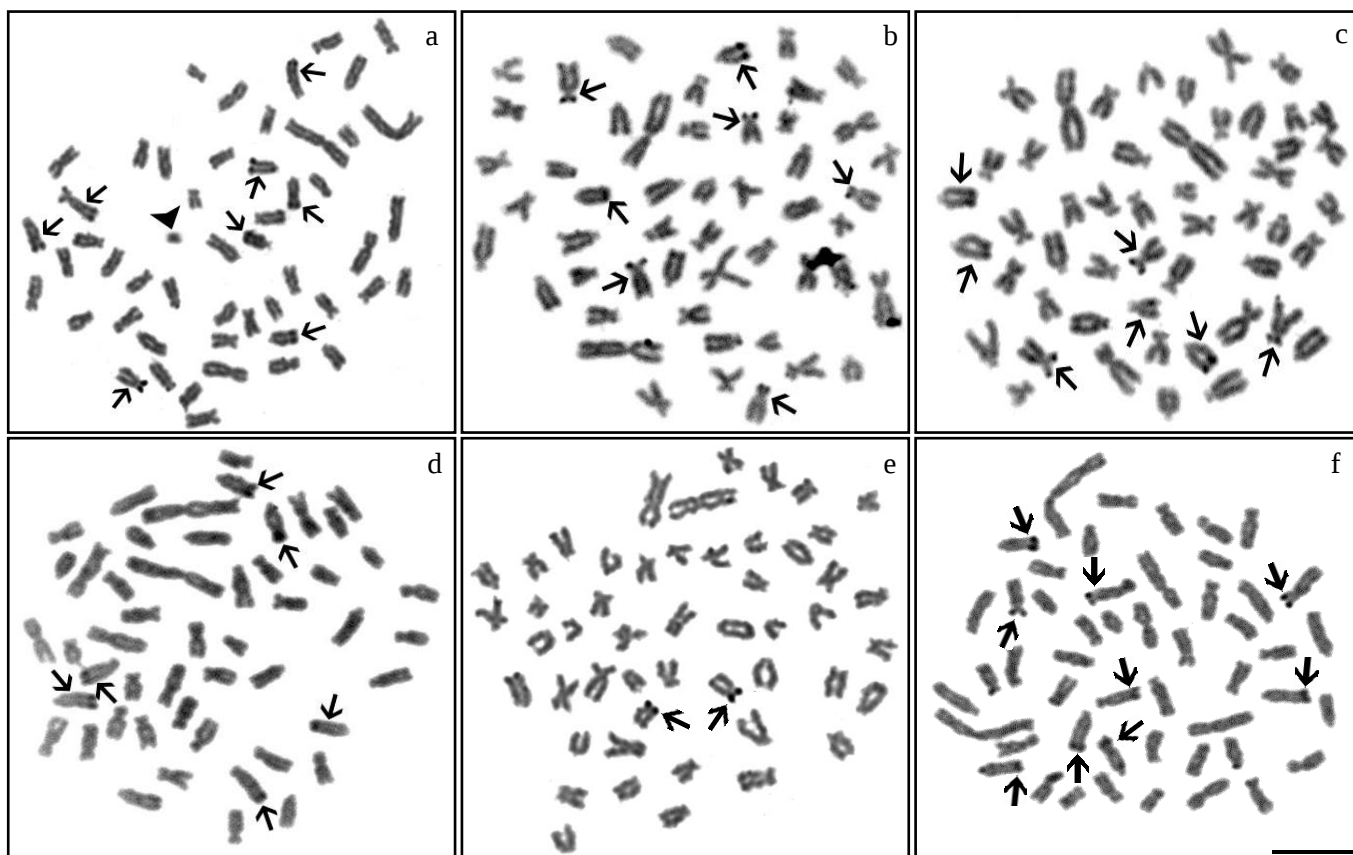


Figura 3: Células metafásicas de *Astyanax bockmanni* submetidas à impregnação com nitrato de Prata (Ag-NOR). Em **a** população córrego Alambari, **b** córrego Campo Novo, **c** córrego Barra Seca, **d** rio Batalha, **e** córrego Capivara, **f** cachoeira Veu de Noiva. Bar 10 µm.

Em outras espécies de *Astyanax*, a ocorrência de RONS distribuídas em múltiplos pares também é frequentemente diagnosticada. Em *A. altiparanae* são observados 4-7 sítios de RONS (Daniel-Silva e Almeida-Toledo, 2001; Fernandes e Martins-Santos, 2006). *A. scabripinnis* apresenta entre 4-14 marcações (Mantovani *et al.*, 2000, 2005; Fernandes e Martins-Santos, 2005). Em *A. fasciatus* são encontrados até quatro sítios (Daniel-Silva e Almeida-Toledo, 2001; Pazza *et al.*, 2006). A espécie *A. laticeps* apresenta três marcações (Rosa *et al.*, 2009), além de *A. giton* com 10 marcações (Kavalco e Moreira-Filho, 2003), e *A. intermedius* com 12 pequenas marcações ao longo dos cromossomos (Kavalco e Moreira-Filho, 2003). Aparentemente

esta não é uma característica restrita apenas para *A. bockmanni*, mas extrapolada para o gênero *Astyanax*.

Para uma melhor investigação sobre o posicionamento dos genes associados às regiões organizadoras de nucléolo, realizamos a Hibridação *in situ* com o gene ribossomal 18S, que evidenciou a presença de 6-11 marcações ao longo dos cromossomos, confirmando o padrão polimórfico desses sítios, previamente observados pela Ag-NOR (figura 4). Estas marcações foram identificadas predominantemente em regiões terminais dos cromossomos, indicando que rearranjos estruturais podem estar envolvidos na dinâmica evolutiva destes sítios em *A. bockmanni*. Daniel *et al.* (2012) e Silva *et al.* (2013) visualizaram até oito sítios de DNAr 18S em outras três populações desta espécie, reforçando a ideia de que na espécie *A. bockmanni* sítios e localização do DNAr 18S costumam ser múltiplos e variáveis.

Somado a isso, Mantovani *et al.* (2005) afirmam que em espécies de *Astyanax* sítios de DNAr 18S são comumente descritos como múltiplos, e podem ainda, apresentar variações entre populações de uma mesma espécie, além de ser mais frequentemente observado em regiões terminais ou em posição intersticial (Almeida-Toledo *et al.*, 2002). No entanto, apesar de ser mais frequente o diagnóstico de múltiplos sítios de DNAr 18S no genoma de espécies de *Astyanax*, Santos *et al.* (2013) observaram apenas dois cromossomos marcados, padrão incomum ao gênero. Assim, a combinação dos resultados de Ag-NOR e *FISH* do DNAr 18S levantados no atual trabalho parece de fato indicar um caráter múltiplo destes sítios nesta espécie, pois esta característica foi observada em todas as populações analisadas.

Enquanto que variações inter e intra populacionais são frequentemente reportadas para sítios de DNAr 18S, a localização e distribuição de DNAr 5S mostram uma série de evidências homólogas e conservadas entre espécies e populações do

gênero *Astyanax* (Ferreira-Neto *et al.*, 2009; Hashimoto *et al.*, 2011; Daniel *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2013). Da mesma forma, no presente trabalho, verificamos que o DNAr 5S está localizado na região intersticial do braço curto de dois pares cromossômicos, um metacêntrico e outro subtelocêntrico (figura 4).

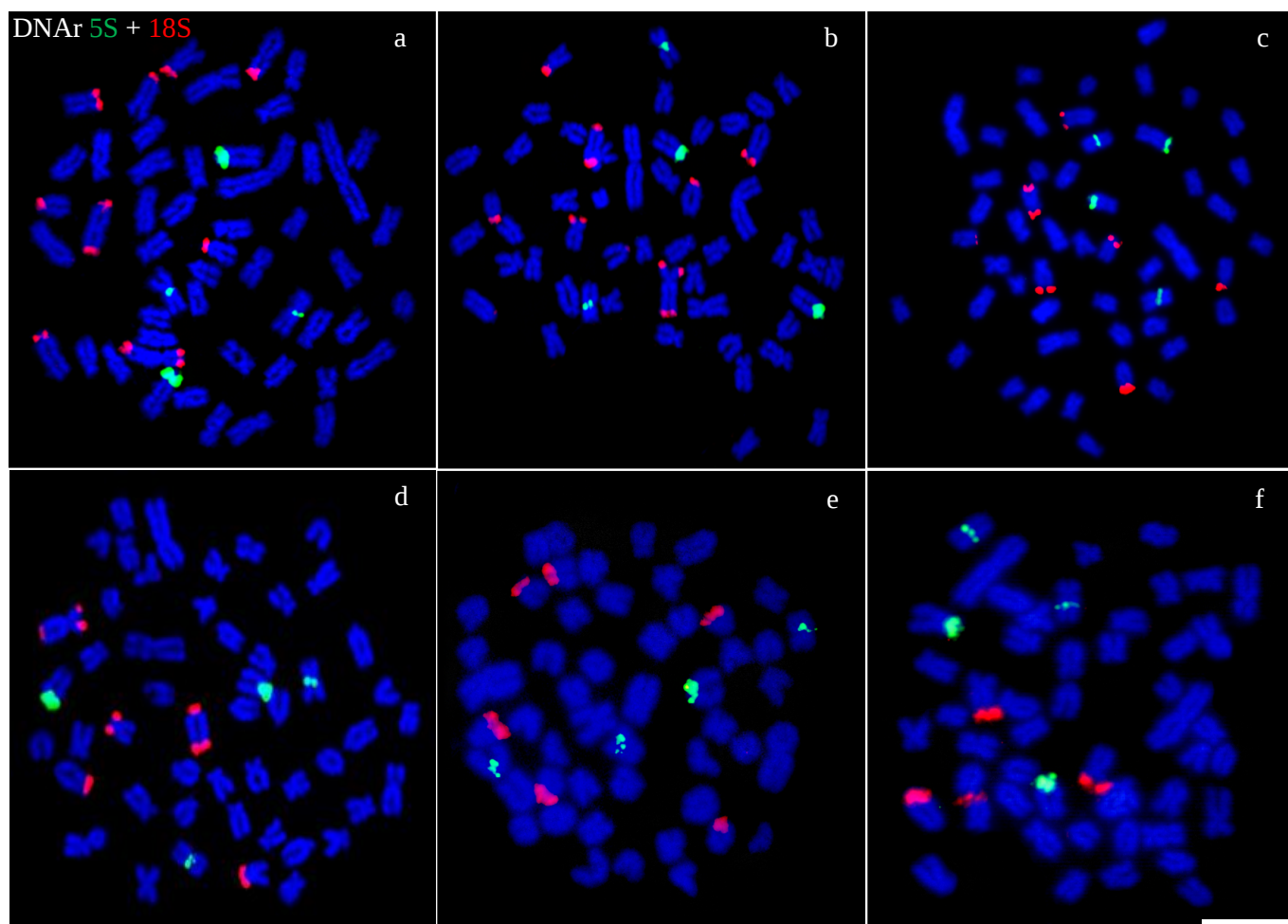


Figura 4: Células metafásicas de exemplares de *Astyanax bockmanni* submetidas à dupla *FISH* com sondas de DNAr 5S e 18S. Em a população córrego Alambari, b córrego Campo Novo, c córrego Barra Seca, d rio Batalha, e córrego Capivara, f cachoeira Véu de Noiva. Em verde DNAr 5S, em vermelho DNAr 18S. Bar 10 μ m.

Adicionalmente, em *Astyanax sp.* e *A. janeiroensis*, os sítios de DNAr 5S são localizados exclusivamente em um par de cromossomos acrocêntricos (Kantek *et al.*, 2007). Padrões semelhantes também foram observados em *A. scabripinnis* (Vicari *et al.*, 2008). Estas marcações são similares às encontradas na maioria das espécies de peixes que tiveram este gene mapeado em seu genoma (Kavalco *et al.*, 2009; Hashimoto *et al.*,

2011). Por outro lado, a ocorrência de sítios de DNAr 5S dispersos também têm sido detectada em peixes (Fujiwara *et al.*, 1998).

Assim, acreditamos que o padrão do DNAr 5S reportado possa indicar um papel importante desempenhado por estas sequências nos processos de manutenção cariotípica em *A. bockmanni*, uma vez que o mesmo padrão de distribuição e localização destes sítios foram diagnosticados nas seis populações analisadas, e são reportadas em diversas outras espécies desta mesma espécie (Kavalco *et al.*, 2009; Hashimoto *et al.*, 2011; Daniel *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2013). Mantovani *et al.* (2005) também acreditam na importância evolutiva destas sequências ribossômicas no genoma de peixes. Segundo os autores, o padrão conservado do DNAr 5S e propõe em *A. scabripinnis* pode estar relacionado à localização destes sítios nos cromossomos que os carregam (regiões intersticiais e terminais), onde este gene estaria mais bem “protegido” de eventos de dispersão, eventos estes, muito recorrentes com DNAr 45S.

Apesar de estarmos avançando de forma contundente em estudos genéticos e citogenéticos de peixes, vemos que muitas populações e espécies de diversos gêneros ainda carecem de informações básicas, como seu número diploide, fórmulas cariotípicas, distribuição cromossômica, e bandamentos cromossômicos clássicos (Ag-NOR e bandamento C).

Assim, os resultados obtidos no presente estudo representam uma importante contribuição à citogenética do gênero *Astyanax*, em especial *A. bockmanni*. Ainda, mesmo pertencendo a bacias hidrográficas diferentes, as populações desta espécie possuem características macroestruturais conservadas, principalmente no que diz respeito ao número diploide. Entretanto, fatores microestruturais (padrões das RONS, heterocromatina constitutiva e disposição de genes ribossomais) ficam bem evidentes em populações de bacias diferentes, mesmo em curtas distâncias. Pelo observado, estes

fatores tendem a seguir um mesmo caminho evolutivo, e mostram-se conservados quando em relacionados a populações de uma mesma bacia hidrográfica e que estejam relativamente próximas.

Ao contrário, quando estas populações pertencem a bacias hidrográficas distintas, ou ainda a mesma bacia hidrográfica, mas de localidades distantes, estas populações tendem a seguir caminhos evolutivos independentes. Esta característica fica à mostra quando comparamos os dados levantados para as populações das bacias hidrográficas dos rios Tietê e Paranapanema.

Referências bibliográficas

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

CAPÍTULO 2

**Organização e distribuição cromossômica de genes histônicos e
transposons da família *Rex* no genoma de *Astyanax bockmanni*
(TELEOSTEI, CHARACIFORMES)**

Resumo

Uma importante característica da maioria dos organismos eucariotos é a quantidade significativa de diferentes tipos de segmentos de DNA repetitivo em seu genoma, característica não observada em organismos procariotos. Por conta disso, estas sequências são consideradas componentes chave na compreensão dos mecanismos evolutivos e diferenciação cariotípica do grupo. Assim, objetivamos mapear fisicamente genes histônicos e transposons da família *Rex* em seis populações da espécie *Astyanax bockmanni*. A *FISH* com a histona H1 evidenciou *clusters* localizados em dois pares cromossômicos homólogos entre as seis populações. Por outro lado, em cinco, das seis populações analisadas, a histona H3 concentrou grandes blocos em quatro cromossomos, alguns inclusive, não homólogos entre si. Diferentemente, a população Alambari apresentou este gene em até sete cromossomos. Os transposons *Rex1* e *Rex6* exibiram pequenos sítios dispersos ao longo da maioria dos cromossomos de todas as populações. Já o elemento *Rex3* hibridou um grande bloco concentrado em um único cromossomo acrocêntrico nas populações Barra Seca e Batalha. As populações Capivara e Véu de Noiva apresentaram grandes blocos deste elemento concentrados em alguns cromossomos. Adicionalmente, as populações Alambari e Campo Novo indicaram pequenos sítios do transposon *Rex3* distribuídos ao longo da maioria dos cromossomos. Sinais conspícuos dos elementos transponíveis *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* foram evidenciados no microcromossomo B, encontrado apenas na população Alambari. Assim, os resultados indicam que mecanismos distintos estão conduzindo a propagação de sequências de DNA repetitivo no genoma de *A. bockmanni*. Ainda, vimos que sequências repetitivas da mesma família gênica podem se organizar de diferentes modos nesta espécie, podendo inclusive, ter participação ativa na origem e manutenção de seus cromossomos B.

Introdução

Os genomas de organismos eucariontes são caracterizados por carregar grande quantidade de segmentos de DNA repetitivo (Bueno *et al.*, 2013). Estas sequências são conhecidas por conter alta variabilidade em relação à sua composição nucleotídica, número de cópias, função e forma de distribuição e organização no genoma (Charlesworth *et al.*, 1994). A grande maioria dos estudos que utilizam a técnica de *FISH* envolve a localização de sondas produzidas a partir de segmentos de DNA repetitivo. Estas sequências podem ser classificadas em três classes principais: 1) repetições *in tandem*: inclui os DNAs satélites, minissatélites e microsatélites; 2) elementos transponíveis (TEs): englobam os elementos transposons e retrotransposons; e 3) famílias multigênicas, representadas por sequências repetidas codificadoras, como os genes ribossomais e histônicos (Nagoda *et al.*, 2005).

A natureza das sequências repetitivas é o que qualifica este material como ideal ou não para a construção das sondas, permitindo a determinação e localização destas sequências nos cromossomos. Estudos sobre a organização e mapeamento físico deste tipo de sequência têm permitido um avanço significativo na caracterização da biodiversidade e evolução ictiofaunística (Vicari *et al.*, 2010), além de um maior conhecimento sobre a organização, diversificação, evolução e função dos DNAs repetitivos no genoma de vertebrados (Gursel *et al.*, 2003). Apesar disso, grande parte dos estudos de mapeamento gênico são direcionados à localização de sítios de DNAr, acarretando em poucas informações sobre outros tipos de sequências, incluindo as famílias das histonas e transposons (Cioffi *et al.*, 2010; Ferreira *et al.*, 2011a, b; Valente *et al.*, 2011).

Dessa forma, estudar estas sequências significa conhecer mais a organização genômica dos peixes, bem como a dinâmica evolutiva destes organismos. Assim, o presente trabalho reporta um estudo comparativo realizado em seis populações da espécie *A. bockmanni* através do mapeamento por *FISH* de DNAs repetitivos da família das histonas e transposons, buscando informações sobre o padrão de distribuição, homologias e relações evolutivas entre estes elementos no genoma de *A. bockmanni*.

Materiais e métodos

As análises citogenéticas foram realizadas através de estimulação de mitoses (Oliveira *et al.*, 1988), preparações diretas de células renais *in vivo* (Foresti *et al.*, 1981), e bandamento C (Sumner, 1972). A morfologia cromossômica foi determinada pela relação do tamanho dos braços cromossômicos e classificados como metacêntricos (m), submetacêntrico (sm), subtelocêntricos (st), e acrocêntricos (a), dispostos no cariótipo em ordem decrescente de tamanho, de acordo com o proposto por Levan *et al.* (1964).

Para o isolamento e amplificação de sequências parciais dos genes para a histona H1 e H3, foram utilizados os *primers* degenerados H1 F (5'-ATGGCAGAARYCGCMCCAGC-3') e H1 R (5'-TACTTCTTCTTGGGSGCTGC-3') (Hashimoto *et al.*, 2011), H3 F (5'-ATGGCTCGTACCAAGCAGACVGC-3') e H3 R (5'-ATATCCTTRGGCATRGTGAC-3') (Colgan *et al.*, 1998). Os *primers* dos elementos transponíveis foram: RTX1-F1 (5'-TTCTCCAGTGCCTTCAACACC-3') e RTX1-R1 (5'-TTCCTTAAAAAATAGAGTCTGCTC-3'), para o elemento *Rex1* (Volf *et al.*, 1999, 2000). RTX3-F1 (5'-TACGGAGAAAACCCATTTTCG-3') RTX3-R1 (5'-AAAGTTCCTCGGTGGCAAGG-3') para *Rex3* (Volf *et al.*, 1999, 2000), e Rex6-F (5'-TAAAGCATACATGGAGCGCCAC-3') e Rex6-R (5'-

GGTCCTCTACCAGAGGCCTGGG-3') (Volf *et al.*, 2001) para o transposon *Rex6*. Informações adicionais sobre os procedimentos adotados para a marcação das sondas estão disponíveis no tópico 3 (material e metodologia) desta dissertação.

A *FISH* com sondas dos sítios de DNAr 5S e 18S realizada de acordo com Pinkel *et al.* (1986), com estringência de 77%, e algumas adequações. As sondas foram marcadas por reação de PCR (Polymerase Chain Reaction) com os agentes biotina 14-dATP e digoxigenina 11-dUTP (Roche Applied Science), e os sinais de hibridação detectados pela ação da Avidina-fluoresceína conjugada (FITC) e anti-digoxigenina-rodamina. As lâminas foram contracoradas com o agente DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride).

As imagens foram capturadas por uma câmera digital refrigerada Olympus Qcolor5, acoplada a um fotomicroscópio de fluorescência (BX50, Olympus), com auxílio do Software QCapture Pro 5.1.1.14. Para a manutenção de brilho e contraste das imagens foi realizado um programa de edição de imagens (Adobe Photoshop CS5).

Resultados e discussão

Análises citogenéticas por meio de coloração convencional com Giemsa evidenciaram a ocorrência de um número diploide modal de $2n=50$ cromossomos em todos os indivíduos das seis populações analisadas de *A. bockmanni*, com seus cariótipos constituídos por cromossomos dos tipos metacêntricos, submetacêntricos, subtelocêntricos e acrocêntricos, conforme observado por Kavalco *et al.* (2009), Fernandes *et al.* (2010), Hashimoto e Porto-Foresti (2010), Hashimoto *et al.* (2011), Daniel *et al.* (2012), e Silva *et al.* 2013) em distintas populações desta espécie. Padrões

semelhantes também são observados em outras espécies do gênero (Pansonato-Alves *et al.*, 2013a).

A aplicação da *FISH* com o gene histônico H1 apresentou dois pares cromossômicos marcados nas seis populações, com o predomínio de um par do tipo metacêntrico entre elas (figura 1). Esta recorrência, bem como o número constante de quatro marcações diagnosticadas, poderiam indicar uma conservação destas sequências gênicas no genoma de diversas populações desta espécie, conforme previamente observados por Hashimoto *et al.* (2011) e Silva *et al.* (2013).

Hashimoto *et al.* (2011) visualizaram um par cromossômico do tipo metacêntrico com sítios de histona H1 sempre associados ao gene ribossomal 5S em *A. bockmanni*, *A. fasciatus* e *A. altiparanae*. Resultados semelhantes foram reportados em outras populações de *A. bockmanni*, e de *A. fasciatus* (Silva *et al.*, 2013; Pansonato-Alves *et al.*, 2013a,b), respectivamente. Segundo estes autores, estas características convergem para uma ancestralidade comum e conservada nesta espécie. Esta hipótese já havia sido proposta por Hashimoto *et al.* (2011), e foi posteriormente corroborada e fortalecida por Silva *et al.* (2013) e Pansonato-Alves *et al.* (2013a, b). A ideia de que estes genes evoluíram conjuntamente também é reportada em espécies de outro grupo de peixes (Hashimoto *et al.*, 2012). Logo, apesar de não verificarmos esta associação nas populações analisadas, o mesmo padrão apresentado pela histona H1 foi observado, reforçando a hipótese de sua evolução conjunta ao grupo.

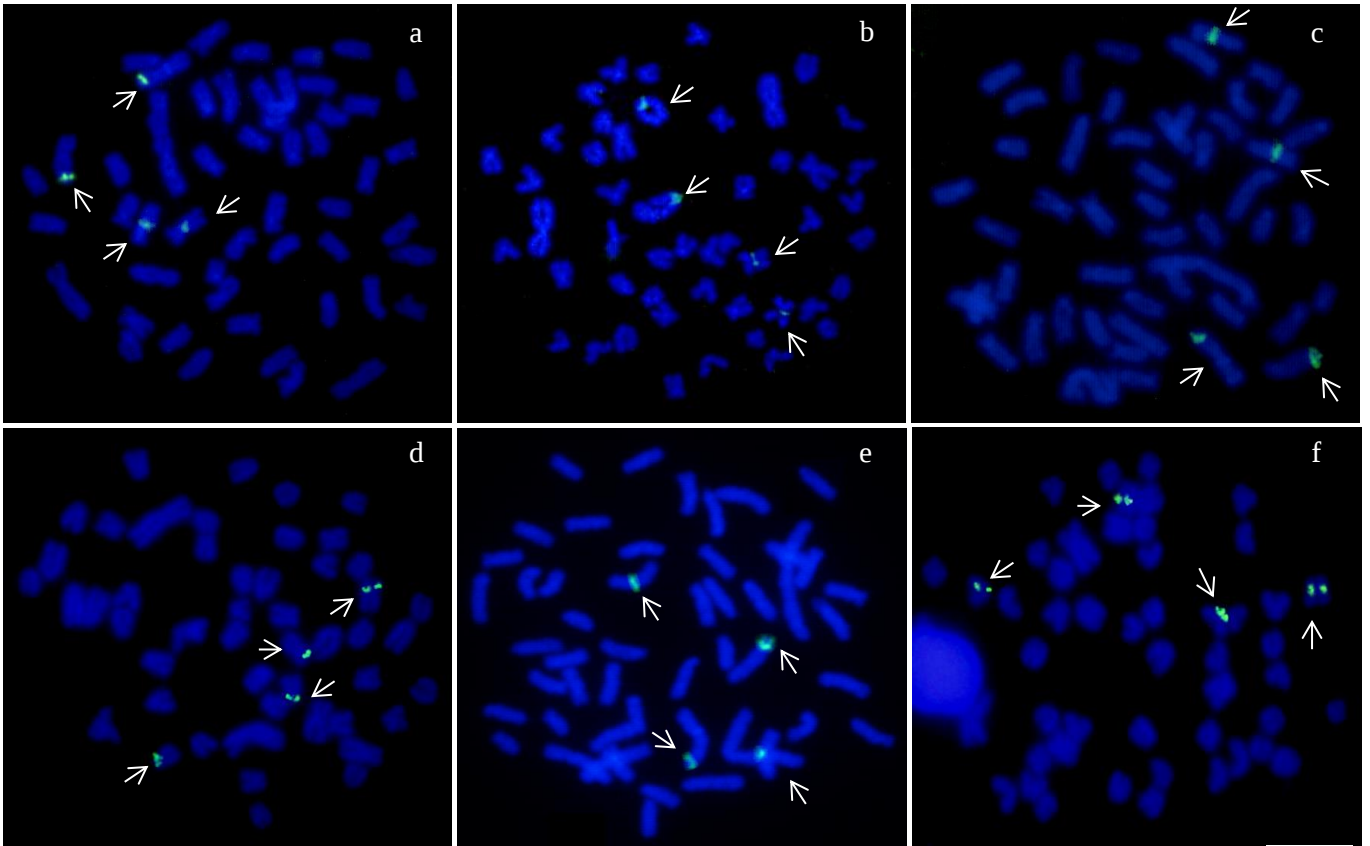


Figura 1: Distribuição do gene para a histona H1 em populações de *A. bockmanni*. Em **a** população pertencente ao córrego Alambari; **b**, córrego Campo Novo; **c**, córrego Barra Seca; **d**, Rio Batalha; **e**, rio Capivara; **f**, cachoeira Véu Noiva. As setas indicam os cromossomos marcados pela sonda H1. Bar equivale a 10µm.

Em relação à histona H3, nossos resultados indicaram que o gene para a histona H3 apresenta-se em dois pares nas populações Campo Novo, Barra Seca, Batalha, Capivara e Véu Noiva (figura 2). De forma contrária, a população Alambari exibiu sete cromossomos hibridados da histona H3 em seu genoma (figura 2a). Esta distribuição cromossômica contrasta fortemente com o padrão conservado das demais populações desta espécie. Similarmente, sítios múltiplos ao longo de diversos cromossomos são reportados no peixe *Hypostomus nigromaculatus* (Pansonato-Alves *et al.*, 2013b) e nos gafanhotos *Abracris flavolineata* (Bueno *et al.*, 2013) e *Rhammatocerus brasiliensis* (Oliveira *et al.*, 2011), sendo considerado polimórfico para estas espécies. Associações entre estes dois genes histônicos são reportados por Silva *et al.* (2013) e Pansonato-Alves *et al.* (2013a,b) em populações distintas de *A. bockmanni* e *A. fasciatus*. Segundo

os autores, foram observados pares cromossômicos carregando genes em sintenia das histonas H1, H3 e DNAr 5S. Silva *et al.* (2013) ainda verificaram que o gene histônico H4 também encontra-se aglomerado na mesma região que os demais genes mencionados. Somados ao atual trabalho, estes são as únicas investigações sobre o mapeamento físico da histona H3 e H4 de forma simultânea em peixes.

Apesar de estudos envolvendo o mapeamento físico de genes histônicos, principalmente a histona H3, serem raros em peixes, entre os invertebrados, estudos desta natureza são relativamente comuns (Cabrero *et al.*, 2009; Bouily *et al.*, 2010; Cabral-de-Mello *et al.*, 2011a,b,c), onde a recorrência de dois pares cromossômicos marcados são os padrões mais comuns para a maioria das espécies (Zhang *et al.*, 2007; Bouily *et al.*, 2010), entretanto, algumas espécies podem apresentar diversos cromossomos marcados, incluindo cromossomos supranumerários e sexuais (Oliveira *et al.*, 2011).

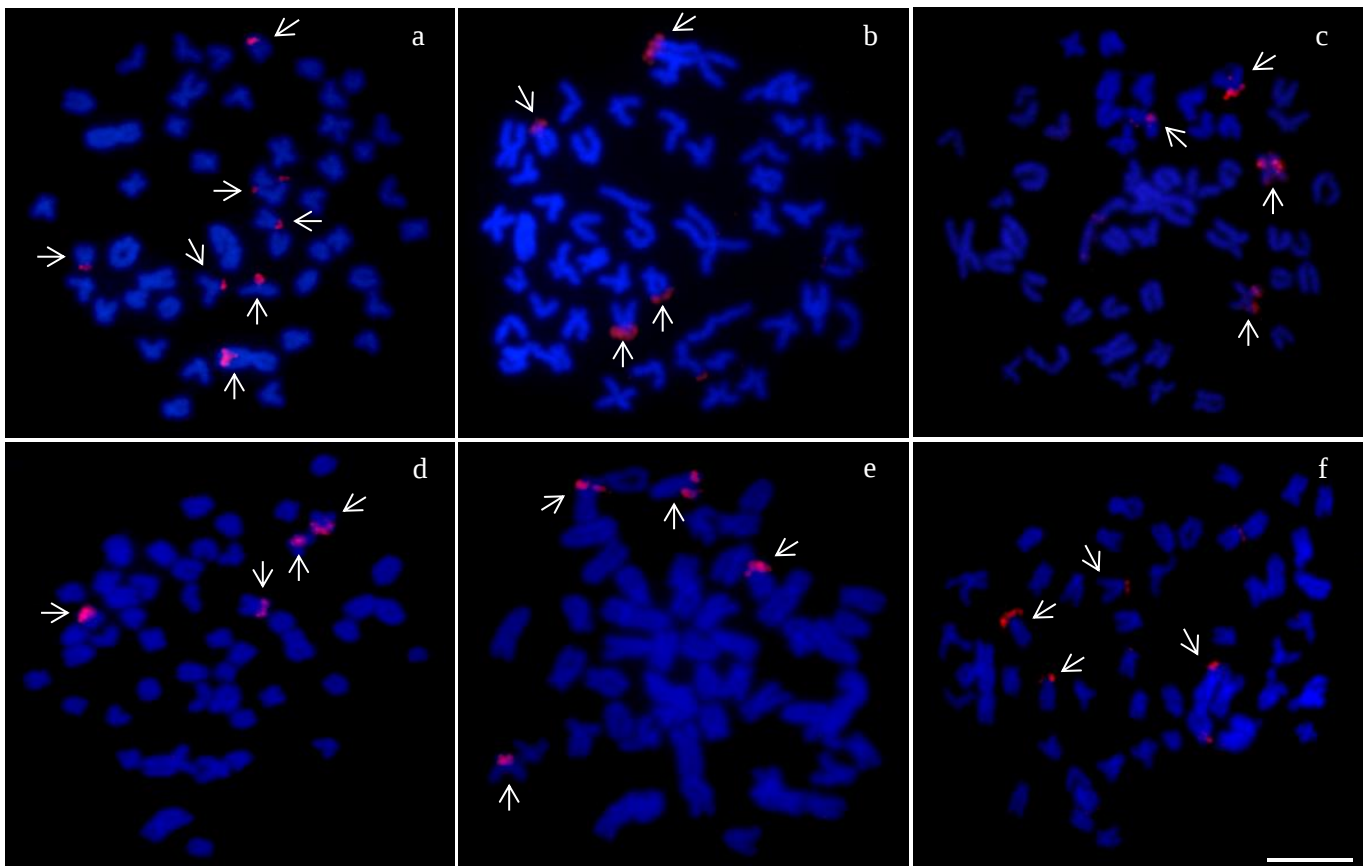


Figura 2: Mapeamento físico do gene para a histona H3 em *A. bockmanni*. Em **a** população pertencente ao córrego Alambari; **b**, córrego Campo Novo; **c**, córrego Barra Seca; **d**, Rio Batalha; **e**, rio Capivara; **f**, cachoeira Véu Noiva. As setas indicam os cromossomos marcados pela sonda. Bar equivale a 10um.

Assim como o gene histônico H1, a histona H3 apresenta-se bem conservado em *A. bockmanni*. Cabrero *et al.* (2009) propõe que a conservação significativa dos genes histônicos H3 e H4 datariam antes mesmo da diferenciação das espécies de gafanhotos do gênero *Acrididae*, o que é reforçado através de análises de *clusters* de H3 em gafanhotos da família Proscopiidae (Cabral-de-Melo *et al.*, 2011a,b,c). Para as populações de *A. bockmanni* de diferentes bacias analisadas, esta seria uma resposta plausível, pois um mesmo padrão de distribuição foi mantido entre as seis populações reportadas, mesmo algumas destas populações se encontrarem há mais de cem quilômetros de distância das demais.

Outra classe intrigante de DNAs repetitivos é a dos elementos transponíveis, em especial os compreendem a família *Rex*, que em peixes organizam-se de forma distinta em diferentes espécies, podendo estar compartimentalizado em regiões heterocromáticas, ou disperso por todo o genoma. Em nossos resultados, vimos que os elementos *Rex1* e *Rex6* apresentam-se de forma dispersa ao longo do genoma de todas as populações analisadas (figuras 3 e 5). Outra característica observada em *A. bockmanni*, foi a presença de grandes blocos destes transposons que alguns cromossomos apresentaram, pintando-os quase que completamente, enquanto que outros cromossomos carregavam apenas pequenos sítios. Em espécies de *Hypostomus nigromaculatus*, Pansonato-Alves *et al.* (2013b) visualizaram resultados próximos aos do atual trabalho, onde este elemento apresenta grandes blocos concentrados em apenas três cromossomos, e disperso em todo o restante do genoma.

De forma semelhante, o transposon *Rex3* também apresentou marcações dispersas na maioria dos cromossomos das populações Alambari e Campo Novo (figura 4a-b). A população Capivara indicou que este elemento está concentrado em blocos nos cromossomos, entretanto, pequenos sítios também foram evidenciados (figura 4e). Já as

populações Barra Seca, Batalha, Capivara e Véu de Noiva apresentaram grandes blocos deste transposon alocado nos cromossomos (figura 4c-f), adicionalmente, um grande bloco de *Rex3* foi concentrado apenas em um cromossomo acrocêntrico nas populações Barra Seca e Batalha (figuras 4c-d). A população Batalha ainda apresentou sítios menores dispersos. Em outras duas populações distintas de *A. bockmanni*, Silva *et al.* (2013) observaram uma distribuição dispersa do elemento *Rex3* na maioria dos cromossomos. Em revisão, Ferreira *et al.* (2011b) evidenciam estas características em 32 espécies de peixes, dentre eles, organismos Hypostomatinae (Ferreira *et al.*, 2011a), *Erythrinus* (Cioffi *et al.*, 2010), *Astyanax* (Silva *et al.*, 2013; Pansonato-Alves *et al.*, 2013a), espécies do gênero *Hypostomus* (Pansonato-Alves *et al.*, 2013b) ciclídeos (Fantinatti *et al.*, 2012), peixes da Antártida (Ozouf-Costaz *et al.*, 2004), entre outros.

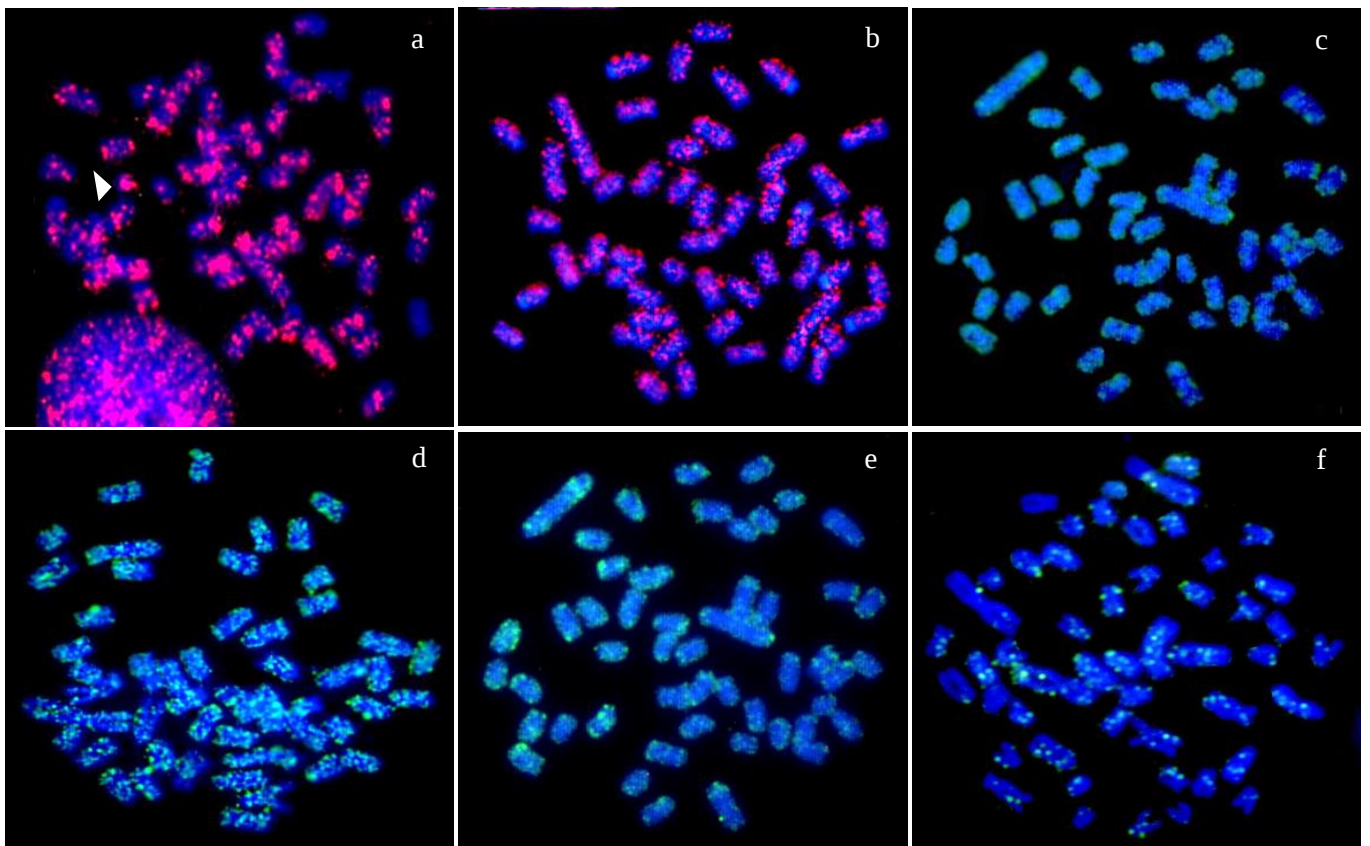


Figura 3: Mapeamento do elemento transponível *Rex1* em seis populações da espécie *A. bockmanni*. Em **a** população pertencente ao córrego Alambari; **b**, córrego Campo Novo; **c**, córrego Barra Seca; **d**, Rio Batalha; **e**, rio Capivara; **f**, cachoeira Véu Noiva. O cromossomo B é indicado pela ponta de seta. Bar equivale a 10um.

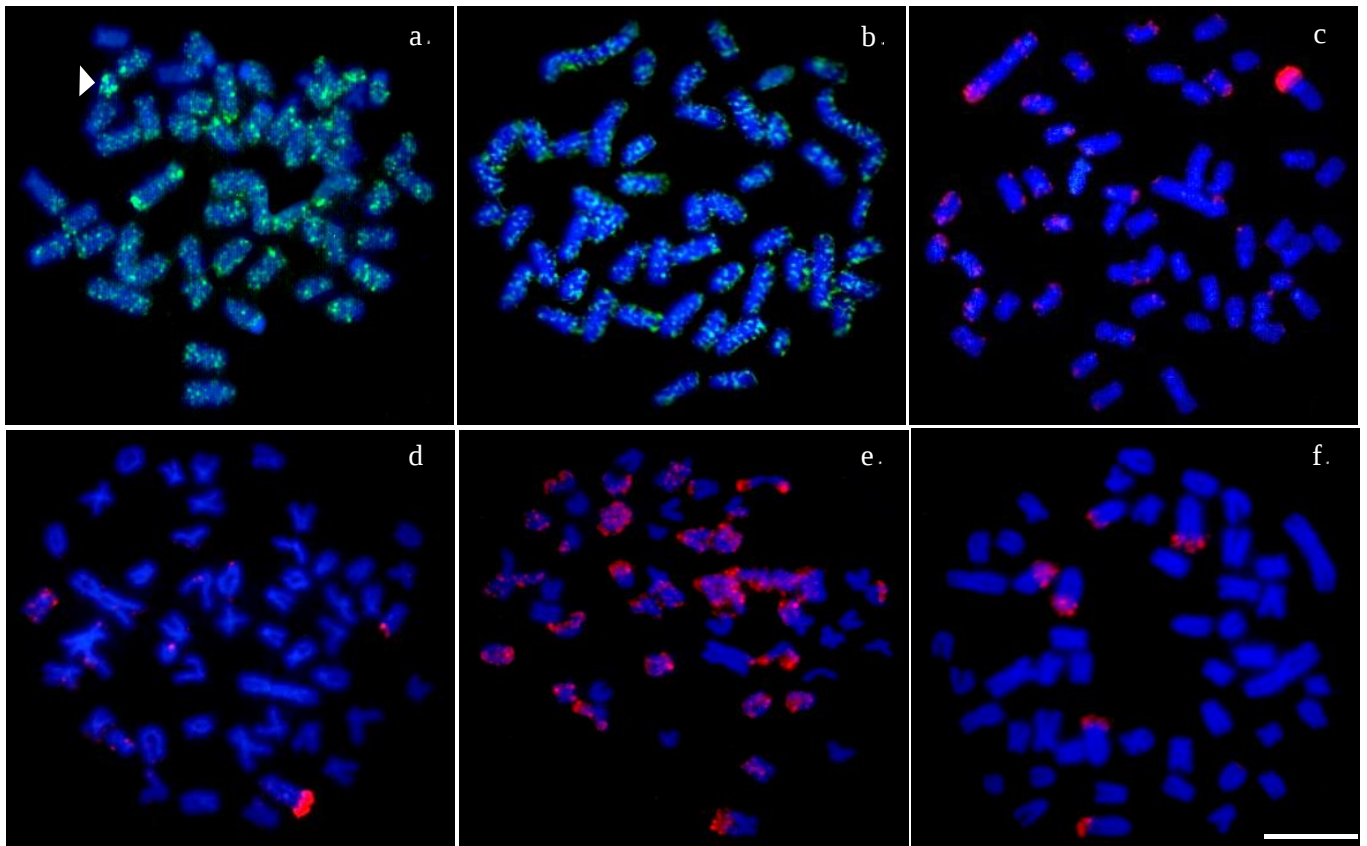


Figura 4: Mapeamento físico do transposon *Rex3* em células metafásicas de *A. bockmanni*. Em **a** população pertencente ao córrego Alambari; **b**, córrego Campo Novo; **c**, córrego Barra Seca; **d**, Rio Batalha; **e**, rio Capivara; **f**, cachoeira Vêu Noiva. A ponta de seta indica o cromossomo B. Bar equivale a 10µm.

Assim, vemos a grande elasticidade e variedade destes elementos de se incorporarem no genoma das espécies. Em *A. bockmanni* estes elementos ainda não mantêm um padrão bem definido, incorporando-se de maneiras distintas entre as populações analisadas. Tal capacidade pode originar alterações estruturais (Ozouf-Costaz *et al.*, 2004) acarretando em polimorfismos e resultando em variabilidade numérica de cópias intra e inter espécies, o que pode levar à grandes mudanças na estrutura e expressão gênicas (Capy, 1998; Ferreira *et al.*, 2011a), contribuindo significativamente para a evolução do grupo (Ozouf-Costaz *et al.*, 2004).

A similaridade da distribuição de elementos da família *Rex* no genoma de peixes, bem como nas populações de *A. bockmanni* analisadas, nos dá subsídios para supor uma origem por transferência horizontal destes transposons no grupo. Vários

exemplos de transferência horizontal são reportados em diferentes animais, dentre eles, os mais bem estudados são organismos *Drosophilidae* (revisão em Loreto *et al.*, 2008) e *Drosophila melanogaster* (Kidwel *et al.*, 1977; Fisher *et al.*, 2004). O processo de transferência horizontal corresponde a uma transferência de matéria genética, sem que necessariamente, ocorra transmissão sexual entre as espécies relacionadas (Loreto *et al.*, 2008).

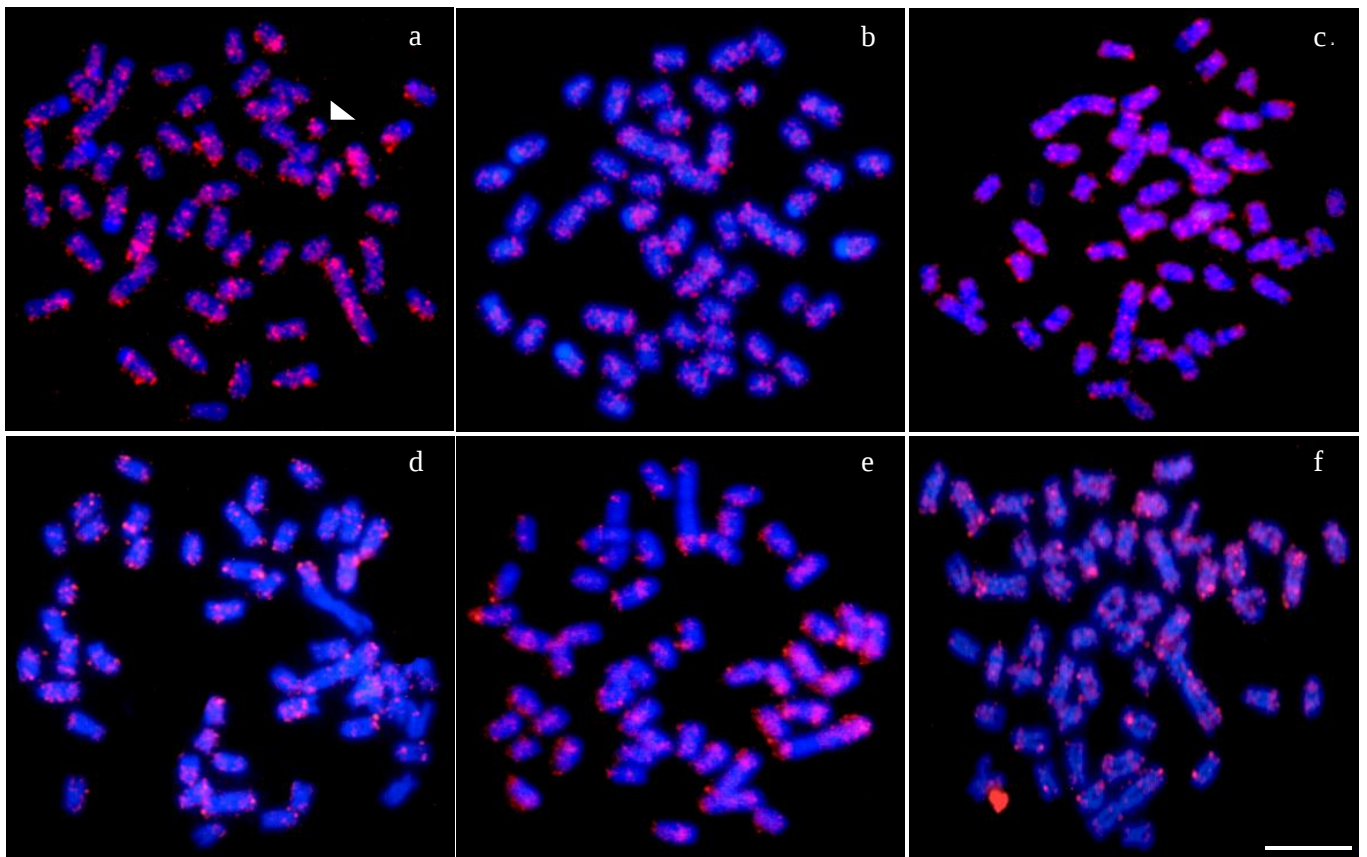


Figura 5: Células metafásicas de *A. bockmanni* após procedimento de hibridação com sonda do transposon *Rex6*. Em a população pertencente ao córrego Alambari; b, córrego Campo Novo; c, córrego Barra Seca; d, Rio Batalha; e, rio Capivara; f, cachoeira Véu Noiva. O cromossomo B está indicado pela ponta de seta. Bar equivale a 10µm.

Ainda, elementos transponíveis estão presentes na maioria dos seres vivos, e isso nos remete a ideia de que sua existência possa ser bem antiga, onde outras formas ativas destes elementos poderiam ter persistido em genomas de seus hospedeiros durante longos períodos, provavelmente por meio de transmissão horizontal. Alguns autores sugerem ainda, que a inserção de transposons em seres vivos possa ter ocorrido antes

mesmo do processo de especiação que originou cada uma das espécies (Aparício *et al.*, 2002). Ferreira *et al.* (2010a) sugerem que estas sequências estariam evoluindo conjuntamente, ou ainda, através de um mesmo mecanismo evolutivo.

Por estarem acumulados em quase todos os cromossomos, os elementos *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* estão distribuídos quase que homogeneamente em regiões eucromáticas e heterocromáticas nas populações de *A. bockmanni* estudadas. Segundo Valente *et al.* (2011), elementos transponíveis tendem a se acumular de forma semelhante em cromossomos de uma mesma espécie ou populações de um grupo. Gross *et al.* (2009) visualizaram co-localizações de regiões heterocromáticas e *Rex3* em três espécies de *Symphysodon*. Ozouf-Costaz *et al.* (2004) sugerem que em *Notothenia coriiceps* esta co-localização exerce uma participação efetiva na estruturação e organização destas regiões cromossômicas. Assim sendo, estes elementos seriam mais bem tolerados nestas regiões cromossômicas com baixa densidade gênica, onde normalmente, novas inserções de transposons são deletérias e, portanto, exibem grande tendência a ser alvo de heterocromatinização (Dimitri *et al.*, 1997).

Também visualizamos *clusters* de *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* no cromossomo supranumerário de *A. bockmanni* (figuras 4a, 5a e 6a) da população Alambai. Recentemente, Fantinatti *et al.* (2012) verificaram que os elementos transponíveis *Rex1* e *Rex6* distribuem-se no genoma e no cromossomo B de *Astatotilapia latifasciata*. Em *Alburnus alburnus*, o elemento Gypsy/Ty3 localiza-se exclusivamente no cromossomo B desta espécie (Ozouf-Costaz *et al.*, 2004). Da mesma forma, acreditamos que a presença dos três transposons *Rex* no cromossomo supranumerário de *A. bockmanni*, poderia sugerir algum papel que estes elementos poderiam exercer nos processos de fusão, diferenciação molecular ou desenvolvimento de cromossomos B nesta espécie.

Trabalhos associando elementos transponíveis à diferenciação sexual também são reportados em *Chionodraco hamatus*, onde aparentemente o transposon *Rex3* encontra-se acumulado no braço longo do cromossomo sexual Y, e pode ter um papel fundamental na sua diferenciação sexual (Ziegler *et al.*, 2003). Logo, os transposons parecem desempenhar um papel importante na evolução genômica de seus hospedeiros, colaborando ativamente com a diversidade biológica destes organismos.

Portanto, os resultados apresentados fornecem novas informações sobre a evolução cromossômica de sequências repetitivas em peixes. Em seis populações de duas bacias hidrográficas um conservadorismo entre genes histônicos e destruição similares entre elementos transponíveis *Rex1* e *Rex6* foram revelados. Ao contrário, o transposon *Rex3* apresentou um dinamismo particular, expondo diferentes padrões de distribuição entre as populações. Deste modo, estudos desta natureza contribuem para a ampliação do conhecimento e entendimento da distribuição e organização dos genes das histonas H1, H3 e dos transposons *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* no genoma de peixes, além de dados a respeito da composição cromossômica do supranumerário de *A. bockmanni*, em suma, transposons da família *Rex*.

Referências bibliográficas

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

CAPÍTULO 3

**Descendência comum de Cromossomos B em duas espécies de peixes
do gênero *Astyanax* (TELEOSTEI, CHARACIFORMES)**

Resumo

Cromossomos B são elementos adicionais dispensáveis, entretanto, possuem ampla ocorrência nos mais variados grupos. Atualmente, estudos são dedicados à compreensão da origem dos supranumerários em espécies que compreendem os peixes, em especial o grupo *Astyanax*, pois apresentam grande diversidade em nível de sequência, morfologia e tamanho cromossômicos, e pouco ainda se sabe sobre estas questões. Acerca disso, isolamos por meio de microdissecção cromossômica e obtivemos uma sonda do cromossomo B_a de *Astyanax bockmanni*, denominada B_{abock}. A partir disso, objetivamos analisar possíveis homologias entre a sonda B_{abock} e os cromossomos B e padrão de *A. bockmanni* e de outras espécies do gênero como *A. paranae* e *A. fasciatus* através da aplicação da *FISH* e *Zoo-FISH*. A aplicação da *FISH* em *A. bockmanni* revelou uma pintura cromossômica total de seus supranumerários, além de marcações em alguns cromossomos padrão. Sinais de hibridação também foram observados no cromossomo B_{st} de *A. fasciatus*, bem como alguns sítios em cromossomos padrão desta espécie. Não foram observadas homologias nos cromossomos A e supranumerários da espécie *A. paranae*. Dessa forma, inferimos uma possível origem dos supranumerários de *A. bockmanni* e *A. fasciatus* a partir de um cromossomo B ancestral, que após sua origem nas diferentes espécies, teriam sofrido fatores evolutivos de forma intensa e independente, os quais determinaram profundas modificações em suas sequências de DNA, acarretando assim, em cromossomos B de diferentes morfologias, observados nas duas espécies.

Introdução

Cromossomos B, também conhecidos como supranumerários ou elementos extras, são cromossomos adicionais dispensáveis, presentes na maioria dos indivíduos de determinadas espécies (Camacho *et al.*, 2000; Bueno *et al.*, 2013; Cabrero *et al.*, 2013). Estes elementos são encontrados em quase todos os grupos taxonômicos de plantas e animais (Camacho, 2005; Vujosevic *et al.*, 2013; Houben *et al.*, 2013) e não seguem as leis de transmissão mendeliana (Votolin *et al.*, 2010, 2013; Penitente *et al.*, 2013; Houben *et al.*, 2013). Outra característica destes cromossomos é a de não possuírem homólogos, ou seja, nunca se emparelham entre si e nem com os cromossomos do complemento A (Camacho, 2005; Sampaio *et al.*, 2011; Houben *et al.*, 2013). São encontrados em organismos diplóides e poliplóides, com frequência variável entre populações inter e intra-individualmente (Foresti *et al.*, 1989; Machado *et al.*, 2012; Penitente *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2013). No entanto, dados acerca destes elementos ainda são completamente particulares nos diferentes grupos, e seus estudos ainda são pouco conclusivos.

Quanto à sua origem, existem muitas teorias, entretanto, duas hipóteses gerais têm sido propostas. A primeira diz respeito à origem intraespecífica, onde os cromossomos B teriam surgido a partir de cromossomos do complemento padrão, porém seguindo caminhos evolutivos de forma independente (Camacho *et al.*, 2000; Teruel *et al.*, 2010). Na segunda hipótese, de origem interespecífica, os cromossomos B teriam surgido a partir de processos de hibridização (frutos de acasalamentos interespecíficos) (Camacho *et al.*, 2000; Perfectti e Werren, 2001).

Na busca do entendimento dos mecanismos sobre origem e evolução dos cromossomos supranumerários, vários estudos concernentes à análise das sequências de

seu DNA têm sido realizados em diferentes organismos (Fernandes *et al.*, 2011; Martins *et al.*, 2012; Houben *et al.*, 2013; Cabrero *et al.*, 2013). A maioria dos estudos suporta uma origem dos cromossomos B a partir de elementos provenientes dos cromossomos do complemento A (McAllister e Werren, 1997), entretanto, podem ainda originarem-se a partir de cromossomos sexuais (Fantinatti *et al.* 2011) ou de forma interespecífica (frutos de hibridização) (Camacho *et al.*, 2000).

Nos últimos anos, com o aperfeiçoamento de técnicas citogenéticas e moleculares, teorias sobre a origem de cromossomos B em peixes obtiveram grande avanço, em especial no gênero *Astyanax*. Neste cenário, Vicari *et al.* (2011) estudaram a origem do cromossomo B em *A. scabripinnis* utilizando sondas específicas do cromossomo B, DNA repetitivo As51, DNAr 5S e 18S. De acordo com os autores a origem intraespecífica do B nesta espécie seria a mais plausível. Mestriner *et al.* (2000), Jesus *et al.* (2003), Artoni *et al.* (2006) e Daniel *et al.* (2012) sugeriram a origem dos cromossomos B por isocromossomos em algumas espécies de peixes.

Assim, mediante a variabilidade em nível de tamanho e morfologia cromossômica evidenciada, frequência inter e intra individuais variadas, e composição das sequências de DNA, nos possibilita gerar uma série de especulações sobre a origem e os mecanismos evolutivos responsáveis por esta diversidade. Portanto, devido às problemáticas acerca da origem destes elementos, objetivamos mapear possíveis ligações existentes entre os cromossomos B e cromossomos A entre diferentes populações proximalmente relacionadas do gênero *Astyanax*.

Materiais e Métodos

Foram analisados exemplares das espécies *Astyanax bockmanni*, *A. fasciatus* e *A. paranae* provenientes de diferentes localidades (tabela 1). Para as análises citogenéticas, foram utilizados os métodos de estimulação de mitoses (Oliveira *et al.*, 1988), preparações diretas de células renais *in vivo* (Foresti *et al.*, 1981), e bandamento C (Sumner, 1972). A morfologia cromossômica foi determinada pela relação do tamanho dos braços cromossômicos e classificados como metacêntricos (m), submetacêntrico (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a), dispostos no cariótipo em ordem decrescente de tamanho, de acordo com Levan *et al.* (1964).

Tabela 1: Espécies e populações que apresentaram cromossomos B e suas respectivas morfologias.

Espécie	Morfotipo de B	Localização	Coordenadas
* <i>Astyanax bockmanni</i>	B _a , B _m	córrego Alambari	22°18'50,26" S, 48°53'21,26" W
<i>Astyanax fasciatus</i>	B _{ST}	córrego Alambari	22°18'50,26" S, 48°53'21,26" W
<i>Astyanax fasciatus</i>	B _A	córrego Campo Novo	22°23'8,35" S, 49°55'63" W
<i>Astyanax fasciatus</i>	B _{ST}	córrego Barra Seca	22°27'6,12" S, 48°53'44,34" W
<i>Astyanax fasciatus</i>	B _M	ribeirão Água da Madalena	22°59'23" S, 48°25'31" W
<i>Astyanax paranae</i>	B _M	rio Capivara	22°53'57" S, 48°23'11" W
<i>Astyanax paranae</i>	B _M	córrego Cascatinha	22°53'30"S 48°28'36" W

*as demais populações da espécie *A. bockmanni* que não apresentaram cromossomos B estão inseridas na tabela 1 do tópico material e métodos.

A técnica de microdissecção dos cromossomos B foi realizada conforme estabelecido por Mühlmann *et al.* (1995) utilizando-se suspensões de células de *A. bockmanni*, cujas metáfases possuíam microcromossomos B acrocêntricos (B_a). Estes supranumerários foram facilmente identificados devido ao tamanho reduzido e

morfologia distinta (figura 1). As suspensões celulares foram gotejadas em lamínulas de vidro 24 mm x 60 mm, coradas com solução de Giemsa a 5% por 5 minutos, e então procedeu-se à técnica de microdissecção com auxílio de um micromanipulador (5171 - Eppendorf) acoplado a um microscópio invertido (Axiovert 100 - Zeiss).

Cerca de dez cromossomos B foram microdissecados e transferidos para um microtubo de centrífuga (0,2 mL) contendo 9,0 uL de água ultrapura. Em seguida, o DNA do material microdissecado foi amplificado utilizando-se o Kit comercial GenomePlex® Single Cell Whole Genome Amplification (WGA4-Sigma), e o produto checado em gel de agarose 1%. Por meio de uma reação de reamplificação deste DNA através do Kit GenomePlex® WGA Reamplification Kit (WGA3-Sigma) associado à digoxigenina-11-dUTP (Roche Applied Science) foi então criada uma sonda B-específica do DNA total do cromossomo B (denominada B_{abock}).

O procedimento adotado para a realização da hibridação *in situ* seguiu o protocolo estabelecido por Pinkel *et al.* (1986), com estringência de 77%. As lâminas foram contracoradas com o agente DAPI (4_6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride), e a detecção do sinal de hibridação realizada através da ação da anti-digoxigenina-rodamina (Roche Applied Science) e Avidina-fluoresceína conjugada (FITC). Como forma de controle, quando efetuada a Zoo-FISH com a sonda B_{abock} realizada em cromossomos B das demais espécies, conjuntamente, o mesmo procedimento era adotado com lâminas da espécie *A. bockmanni*, a fim de obtermos maior credibilidade quanto às marcações observadas. As imagens foram capturadas por uma câmera digital refrigerada Olympus Qcolor5, acoplada a um fotomicroscópio de fluorescência (BX50, Olympus) e auxílio do Software QCapture Pro 5.1.1.14. A montagem dos cariótipos, manutenção de brilho e contraste das imagens foram feitas no programa Adobe Photoshop CS5.

Resultados e discussão

Através da análise de células metafásicas de exemplares das espécies *Astyanax bockmanni* e *A. paranae* identificamos um número diploide modal de 50 cromossomos para ambas as espécies e de 46 cromossomos para *A. fasciatus*, encontrando-se de acordo com o descrito na literatura acerca do número diploide modal para estas espécies (Porto-Foresti *et al.*, 1997; Ferreira-Neto *et al.*, 2009; Hashimoto *et al.*, 2011; Daniel *et al.*, 2012; Pansonato-Alves *et al.*, 2013). O bandamento C indicou um padrão de heterocromatina parcial dos supranumerários B_a (*A. bockmanni*) (figura 1a), B_{ST} e B_M (*A. fasciatus*) (figura 1c, 1e-f), e um padrão totalmente heterocromático para os supranumerários B_m (*A. bockmanni*) (figura 1b), B_A (*A. fasciatus*) (figura 1d) e B_M (*A. paranae*) (figura 1g-h).

Assim como nas espécies reportadas no atual trabalho, diferentes padrões de bandas também são observados em outras espécies de peixes. Em *Moenkhausia sanctaefilomenae*, os supranumerários apresentam-se geralmente heterocromáticos, ou ainda, parcialmente e eucromáticos (Foresti *et al.*, 1989; Dantas *et al.*, 2007). Em algumas espécies do gênero *Astyanax* estes elementos normalmente apresentam-se heterocromáticos (Porto-Foresti *et al.*, 1997; Moreira-Filho *et al.*, 2001; Ferro *et al.*, 2003; Hashimoto *et al.*, 2008; Daniel *et al.*, 2012), apesar de trabalhos relatarem padrões parciais ou eucromáticos (Néo *et al.*, 2000; Moreira-Filho *et al.*, 2001; Kavalco *et al.*, 2007; Daniel *et al.*, 2012; Machado *et al.*, 2012). Estas variações indicam que estes elementos estão constantemente reorganizando-se geneticamente.

Moreira-Filho *et al.* (2001) propõe uma hipótese fundamentada na similaridade dos supranumerários no gênero *Astyanax*, e sugerem que a origem destes elementos precede a diferenciação das espécies no grupo. Em revisão sobre cromossomos B,

Moreira-Filho *et al.* (2004) postulam que morfotipos destes elementos são frequentemente observados em espécies de *Astyanax*, entretanto, a variante B_M (semelhante ao primeiro par cromossômico) é a que apresenta maior distribuição em populações naturais. Como a variante B_M ocorre em outras populações de *Astyanax*, é plausível que esta variante corresponda a um cromossomo B ancestral (revisão em Moreira-Filho *et al.*, 2004). Outras variantes podem ser derivadas de rearranjos estruturais do cromossomo B_M .

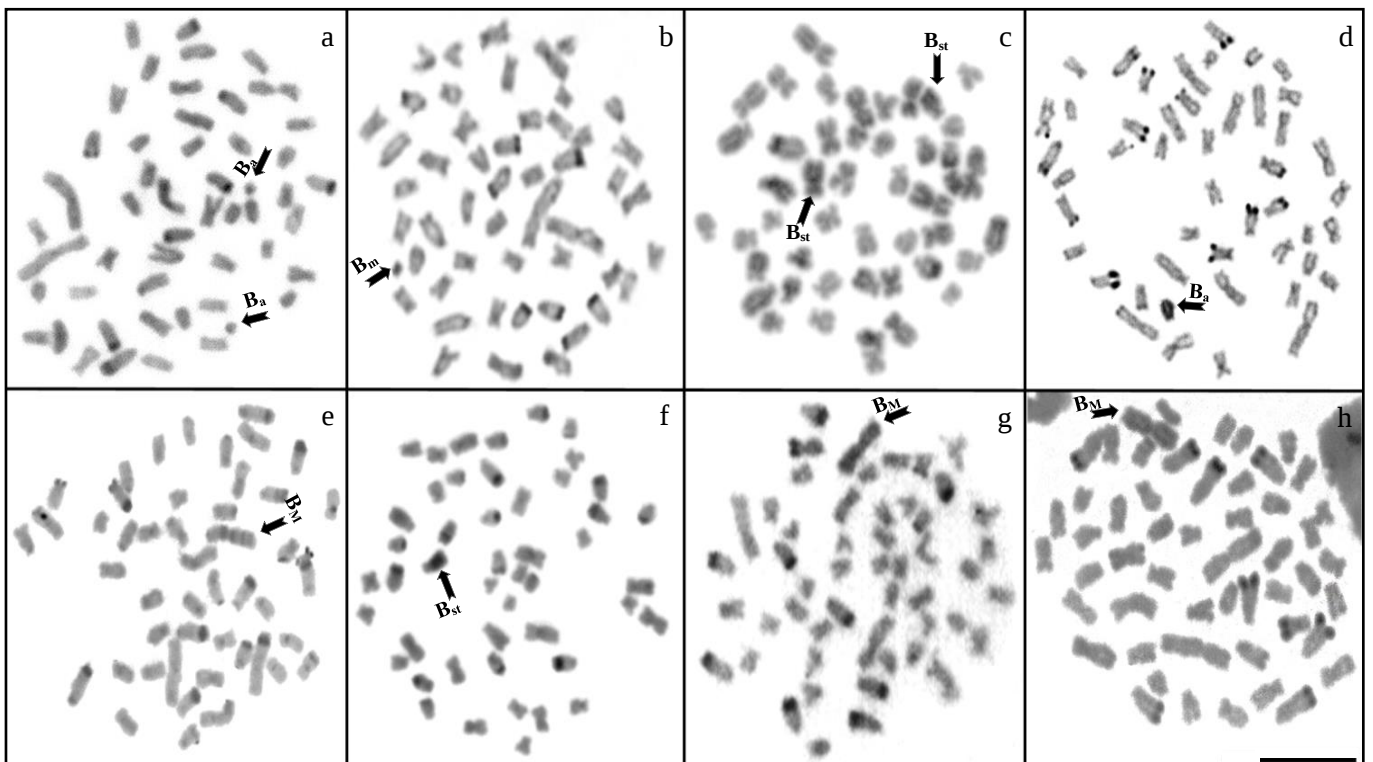


Figura 1: Células metafásicas de das espécies *A. bockmanni* (a,b), *A. fasciatus* (c,d,e, f) e *A. paranae* (g, h) submetidas à técnica de bandamento C. As setas indicam os cromossomos Supranumerários. Bar 10 μ m.

Através de hibridação *in situ* com a sonda B-específica B_{abock} observamos uma pintura cromossômica total dos morfotipos B_a e B_m na espécie *A. bockmanni* (figuras 2a,b), além de grandes blocos concentrados nas regiões terminais dos braços curtos e longos do cromossomo B_{st} de *A. fasciatus* (figura 2d), sugerindo que estes elementos adicionais poderiam de fato compartilhar um ancestral comum, sustentando a hipótese de um cromossomo B ancestral em *Astyanax*, como proposto por Moreira-Filho *et al.*

(2001). Em *A. goyacensis*, Santos *et al.* (2013) constataram sinais de uma sonda B-específica em cromossomos padrão e na maioria dos cromossomos B visualizados. Os resultados sugerem que os cromossomos B podem ter se originado a partir de dois pares de cromossomos acrocêntricos. Padrões similares de heterocromatina entre estes cromossomos e cromossomos B reforçam esta ideia. Os autores reportam ainda a presença de até nove cromossomos B no genoma desta espécie, fato inédito entre as espécies deste gênero.

Em busca de informações sobre a origem de supranumerários no gênero *Prochilodus*, Voltolin *et al.* (2013) isolaram e marcaram uma sonda a partir de um de seus cromossomo B e com a aplicação da *Zoo-FISH*, constataram uma grande homologia entre o DNA isolado e os supranumerários de *P. nigricans*. As similaridades apresentadas entre estes cromossomos B seriam indícios suficientes para hipotetizar uma origem comum destes elementos em ambas as espécies. Similarmente, Cabrero *et al.* (2013) utilizando sondas de DNAr e satDNA isolados de cromossomos B, mapearam uma possível origem destes elementos em 17 populações do gafanhoto *Eyprepocnemis plorans* e observaram que todas as populações apresentavam homologia com o DNA isolado do B. Dessa forma, aparentemente a ideia de ancestralidade pode não restringir-se apenas ao grupo *Astyanax*, mas extrapolada, inclusive, para outros grupos animais portadores desses elementos extras.

Teruel *et al.* (2009) abordaram a microdissecção cromossômica para entender a origem do cromossomo B em insetos. Os autores microdissecaram e marcaram sondas específicas dos cromossomos X e B24 do gafanhoto *Eyprepocnemis plorans*. Após aplicação da *Zoo-FISH* com estas sondas, observaram um compartilhamento de sequências repetitivas entre estes dois cromossomos, especificamente o DNAr 45S e DNAs repetitivos em tandem contendo 180 pb. Segundo os autores, os resultados

levantados sugerem uma origem dos cromossomos B nesta espécie a partir do cromossomo sexual X.

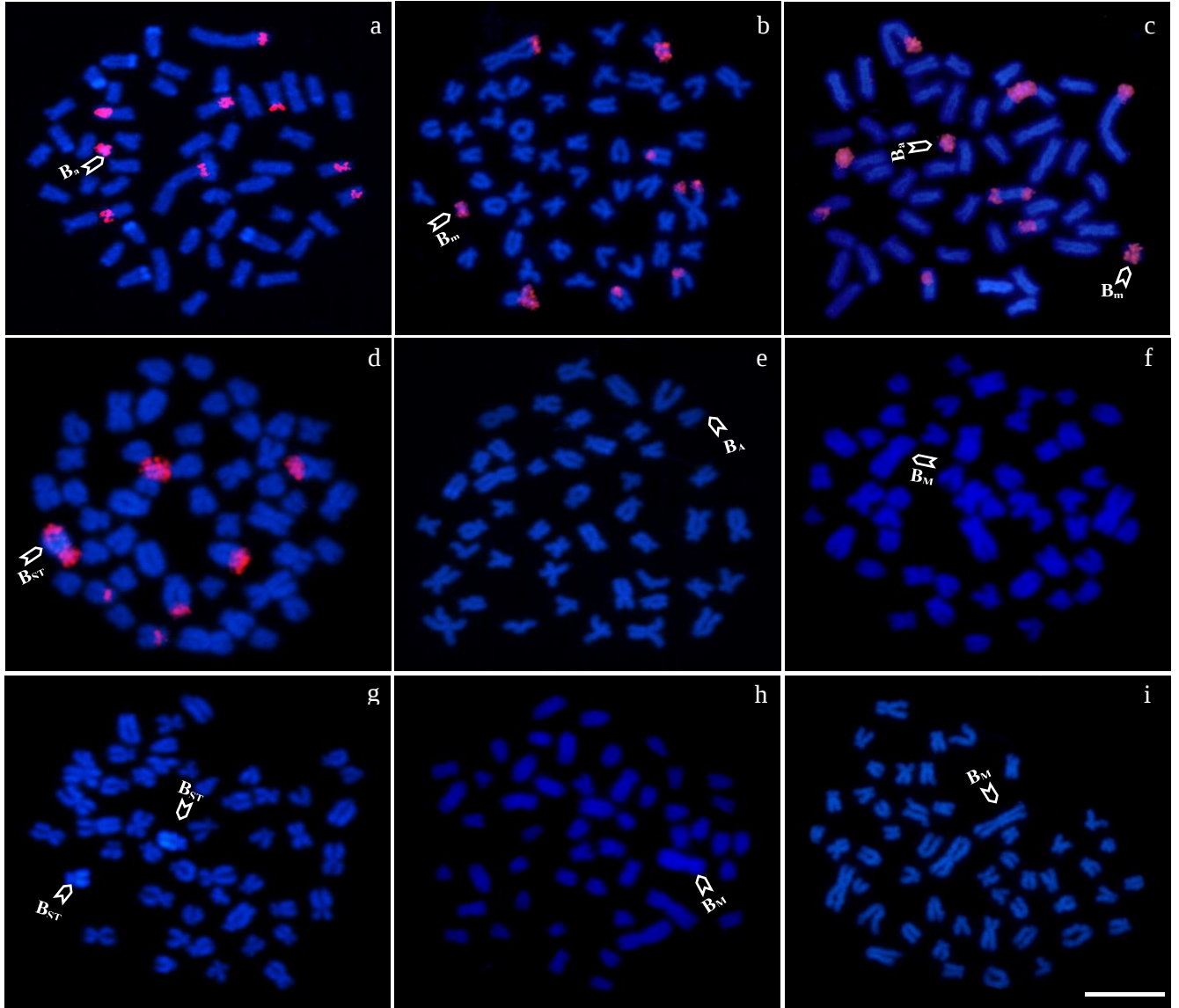


Figura 2: Células metafásicas portando cromossomos supranumerários após *FISH* com sonda B-específica B_{abock} . Em a, b e c *Astyanax bockmanni*; em d, e, f, g *A. fasciatus*; h, i *A. paranae*. As setas indicam os Cromossomos B. Bar 10 μ m.

Adicionalmente, marcações bem evidentes da sonda B_{abock} foram observadas em cromossomos A de duas populações de *A. bockmann* (figura 3a-b) e uma população de *A. fasciatus* (figura 2d). Jesus *et al.* (2003) dispendo de duas famílias de DNA satélite, SATH1 e SATH2 estudaram as sequências de DNA repetitivo presentes nos cromossomos B da espécie *Prochilodus lineatus*. A localização cromossômica destas

famílias de DNA repetitivo indicou grande similaridade entre o DNA satélite SATH1 e todos os cromossomos B desta espécie, além de sítios conspícuos na região pericentromérica de cromossomos do complemento padrão. Mestriner *et al.* (2000) por meio da sonda As51, detectaram a presença de sequências repetitivas nos dois braços do cromossomo B de *A. scabripinnis*, semelhante ao par de cromossomos 24. Acerca dos resultados levantados, Mestriner *et al.* (2000) e Jesus *et al.* (2003) atribuíram formação por isocromossomo dos cromossomos B em ambas as espécies.

Artoni *et al.* (2006) em estudos envolvendo sondas das mesmas famílias de DNA satélite (SATH1 e SATH2) em duas populações de *Prochilodus lineatus* (rio Mogi-Guaçu/SP e lagoa Dourada/PR), observaram uma homologia completa entre o SATH1 e três de quatro supranumerários do rio Mogi-Guaçu, com o outro B se apresentando parcialmente marcado. Todavia, na população da lagoa Dourada dois dos três cromossomos B mostraram sinais fluorescentes parciais da sonda, enquanto que o cromossomo B restante não apresentou marcações de SATH1. Os autores postulam que a diferente distribuição da SATH1 nestas duas populações de *P. lineatus* pode revelar um processo de evolução independente dos supranumerários das localidades amostradas, e atribuem uma origem por isocromossomos destes cromossomos B.

Camacho *et al.* (2000) postulam que a caracterização molecular de sequências de DNA repetitivo específica de cromossomos B que são compartilhadas com seus cromossomos A da própria espécie, bem como compartilhadas com supranumerários e cromossomos padrão de outras espécies, fornecem uma série de subsídios que reforçam a hipótese de uma origem comum destes elementos adicionais.

Observamos ainda em nossos resultados que alguns cromossomos B de *A. fasciatus* e *A. paranae* não apresentaram qualquer homologia com a sonda B_{abock}. Isso poderia ser fruto da alta incidência de mutações que cromossomos B sofrem, abrindo

dessa forma novos caminhos evolutivos e polimorfismo destes elementos, uma vez que algumas das novas variantes encontradas nas diferentes espécies e populações registram maiores taxas de transmissão comparadas ao seu B ancestral, e assim, podem facilmente substituí-lo (Cabrero *et al.*, 2013).

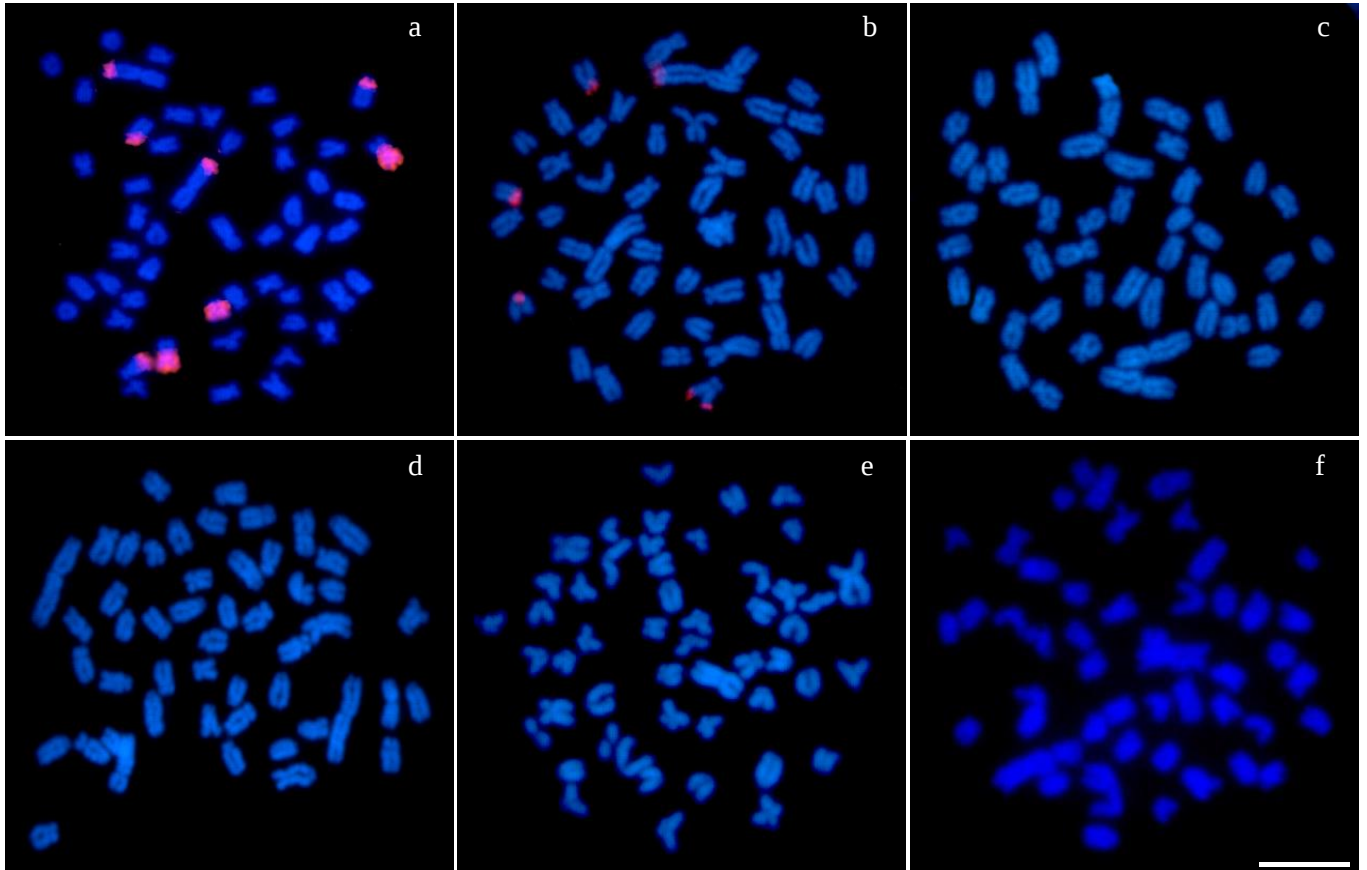


Figura 3: Células metafásicas da espécie *A. bockmanni* que não apresentaram Cromossomos B em seu conjunto genômico. Em **a**, população do córrego Alambari; **b**, córrego Barra Seca; **c**, córrego Campo Novo; **d**, rio Batalha; **e**, rio Capivara; **f**, cachoeira Véu Noiva. Bar 10 μ m.

Segundo Cabrero *et al.* (2013), as sequências contidas em cromossomos B têm uma taxa de mutação bem mais elevada comparada ao restante do genoma, e podem portanto, diferenciar-se de seus "progenitores", fatos muito bem documentados em populações de gafanhotos *Eyprepocnemis plorans*, com ocorrência de pelo menos outras 50 variantes de supranumerários a partir de um B ancestral. Pesquisas recentes indicam que esses cromossomos após sua origem modificam rapidamente sua estrutura genética em poucas gerações (Manrique-Poyato *et al.*, 2013), impedindo a sinapse com

seu possível DNA “progenitor” seguindo suas próprias vias evolutivas e isolando-se do restante do genoma que o teria originado (Camacho *et al.*, 2000).

Portanto, propomos uma origem comum dos supranumerários de *A. bockmanni* (B_a e B_m) e *A. fasciatus* (B_{st}) aqui reportados, uma vez que a sonda B_{abock} revelou grande homologia entre ambos, bem como alguns de seus cromossomos padrão, inclusive em populações que não indicaram a presença de cromossomos B, o que reforça a hipótese de que em algum momento evolutivo e geográfico, estas populações compartilharam de um ancestral comum portador de supranumerários, ou ainda, este cromossomo B poderia estar em fase de invasão nesta população. Todavia, sabemos que supranumerários em peixes podem não apresentar um modelo único de origem. Por conta disso, seria imprescindível isolar e criar sondas B-específicas das outras duas espécies estudadas. Estes estudos certamente poderão reforçar esta teoria, e mostrar inclusive que não só estas três espécies podem estar associadas a um cromossomo B ancestral, mas também outras espécies do grupo que são proximamente relacionadas.

Referências Bibliográficas

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

CAPÍTULO 3

**Descendência comum de Cromossomos B em duas espécies de peixes
do gênero *Astyanax* (TELEOSTEI, CHARACIFORMES)**

Resumo

Cromossomos B são elementos adicionais dispensáveis, entretanto, possuem ampla ocorrência nos mais variados grupos. Atualmente, estudos são dedicados à compreensão da origem dos supranumerários em espécies que compreendem os peixes, em especial o grupo *Astyanax*, pois apresentam grande diversidade em nível de sequência, morfologia e tamanho cromossômicos, e pouco ainda se sabe sobre estas questões. Acerca disso, isolamos por meio de microdissecção cromossômica e obtivemos uma sonda do cromossomo B_a de *Astyanax bockmanni*, denominada B_{abock}. A partir disso, objetivamos analisar possíveis homologias entre a sonda B_{abock} e os cromossomos B e padrão de *A. bockmanni* e de outras espécies do gênero como *A. paranae* e *A. fasciatus* através da aplicação da *FISH* e *Zoo-FISH*. A aplicação da *FISH* em *A. bockmanni* revelou uma pintura cromossômica total de seus supranumerários, além de marcações em alguns cromossomos padrão. Sinais de hibridação também foram observados no cromossomo B_{st} de *A. fasciatus*, bem como alguns sítios em cromossomos padrão desta espécie. Não foram observadas homologias nos cromossomos A e supranumerários da espécie *A. paranae*. Dessa forma, inferimos uma possível origem dos supranumerários de *A. bockmanni* e *A. fasciatus* a partir de um cromossomo B ancestral, que após sua origem nas diferentes espécies, teriam sofrido fatores evolutivos de forma intensa e independente, os quais determinaram profundas modificações em suas sequências de DNA, acarretando assim, em cromossomos B de diferentes morfologias, observados nas duas espécies.

Introdução

Cromossomos B, também conhecidos como supranumerários ou elementos extras, são cromossomos adicionais dispensáveis, presentes na maioria dos indivíduos de determinadas espécies (Camacho *et al.*, 2000; Bueno *et al.*, 2013; Cabrero *et al.*, 2013). Estes elementos são encontrados em quase todos os grupos taxonômicos de plantas e animais (Camacho, 2005; Vujosevic *et al.*, 2013; Houben *et al.*, 2013) e não seguem as leis de transmissão mendeliana (Votolin *et al.*, 2010, 2013; Penitente *et al.*, 2013; Houben *et al.*, 2013). Outra característica destes cromossomos é a de não possuírem homólogos, ou seja, nunca se emparelham entre si e nem com os cromossomos do complemento A (Camacho, 2005; Sampaio *et al.*, 2011; Houben *et al.*, 2013). São encontrados em organismos diplóides e poliplóides, com frequência variável entre populações inter e intra-individualmente (Foresti *et al.*, 1989; Machado *et al.*, 2012; Penitente *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2013). No entanto, dados acerca destes elementos ainda são completamente particulares nos diferentes grupos, e seus estudos ainda são pouco conclusivos.

Quanto à sua origem, existem muitas teorias, entretanto, duas hipóteses gerais têm sido propostas. A primeira diz respeito à origem intraespecífica, onde os cromossomos B teriam surgido a partir de cromossomos do complemento padrão, porém seguindo caminhos evolutivos de forma independente (Camacho *et al.*, 2000; Teruel *et al.*, 2010). Na segunda hipótese, de origem interespecífica, os cromossomos B teriam surgido a partir de processos de hibridização (frutos de acasalamentos interespecíficos) (Camacho *et al.*, 2000; Perfectti e Werren, 2001).

Na busca do entendimento dos mecanismos sobre origem e evolução dos cromossomos supranumerários, vários estudos concernentes à análise das sequências de

seu DNA têm sido realizados em diferentes organismos (Fernandes *et al.*, 2011; Martins *et al.*, 2012; Houben *et al.*, 2013; Cabrero *et al.*, 2013). A maioria dos estudos suporta uma origem dos cromossomos B a partir de elementos provenientes dos cromossomos do complemento A (McAllister e Werren, 1997), entretanto, podem ainda originarem-se a partir de cromossomos sexuais (Fantinatti *et al.* 2011) ou de forma interespecífica (frutos de hibridização) (Camacho *et al.*, 2000).

Nos últimos anos, com o aperfeiçoamento de técnicas citogenéticas e moleculares, teorias sobre a origem de cromossomos B em peixes obtiveram grande avanço, em especial no gênero *Astyanax*. Neste cenário, Vicari *et al.* (2011) estudaram a origem do cromossomo B em *A. scabripinnis* utilizando sondas específicas do cromossomo B, DNA repetitivo As51, DNAr 5S e 18S. De acordo com os autores a origem intraespecífica do B nesta espécie seria a mais plausível. Mestriner *et al.* (2000), Jesus *et al.* (2003), Artoni *et al.* (2006) e Daniel *et al.* (2012) sugeriram a origem dos cromossomos B por isocromossomos em algumas espécies de peixes.

Assim, mediante a variabilidade em nível de tamanho e morfologia cromossômica evidenciada, frequência inter e intra individuais variadas, e composição das sequências de DNA, nos possibilita gerar uma série de especulações sobre a origem e os mecanismos evolutivos responsáveis por esta diversidade. Portanto, devido às problemáticas acerca da origem destes elementos, objetivamos mapear possíveis ligações existentes entre os cromossomos B e cromossomos A entre diferentes populações proximalmente relacionadas do gênero *Astyanax*.

Materiais e Métodos

Foram analisados exemplares das espécies *Astyanax bockmanni*, *A. fasciatus* e *A. paranae* provenientes de diferentes localidades (tabela 1). Para as análises citogenéticas, foram utilizados os métodos de estimulação de mitoses (Oliveira *et al.*, 1988), preparações diretas de células renais *in vivo* (Foresti *et al.*, 1981), e bandamento C (Sumner, 1972). A morfologia cromossômica foi determinada pela relação do tamanho dos braços cromossômicos e classificados como metacêntricos (m), submetacêntrico (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a), dispostos no cariótipo em ordem decrescente de tamanho, de acordo com Levan *et al.* (1964).

Tabela 1: Espécies e populações que apresentaram cromossomos B e suas respectivas morfologias.

Espécie	Morfotipo de B	Localização	Coordenadas
* <i>Astyanax bockmanni</i>	B _a , B _m	córrego Alambari	22°18'50,26" S, 48°53'21,26" W
<i>Astyanax fasciatus</i>	B _{ST}	córrego Alambari	22°18'50,26" S, 48°53'21,26" W
<i>Astyanax fasciatus</i>	B _A	córrego Campo Novo	22°23'8,35" S, 49°55'63" W
<i>Astyanax fasciatus</i>	B _{ST}	córrego Barra Seca	22°27'6,12" S, 48°53'44,34" W
<i>Astyanax fasciatus</i>	B _M	ribeirão Água da Madalena	22°59'23" S, 48°25'31" W
<i>Astyanax paranae</i>	B _M	rio Capivara	22°53'57" S, 48°23'11" W
<i>Astyanax paranae</i>	B _M	córrego Cascatinha	22°53'30"S 48°28'36" W

*as demais populações da espécie *A. bockmanni* que não apresentaram cromossomos B estão inseridas na tabela 1 do tópico material e métodos.

A técnica de microdissecção dos cromossomos B foi realizada conforme estabelecido por Mühlmann *et al.* (1995) utilizando-se suspensões de células de *A. bockmanni*, cujas metáfases possuíam microcromossomos B acrocêntricos (B_a). Estes supranumerários foram facilmente identificados devido ao tamanho reduzido e

morfologia distinta (figura 1). As suspensões celulares foram gotejadas em lamínulas de vidro 24 mm x 60 mm, coradas com solução de Giemsa a 5% por 5 minutos, e então procedeu-se à técnica de microdissecção com auxílio de um micromanipulador (5171 - Eppendorf) acoplado a um microscópio invertido (Axiovert 100 - Zeiss).

Cerca de dez cromossomos B foram microdissecados e transferidos para um microtubo de centrífuga (0,2 mL) contendo 9,0 uL de água ultrapura. Em seguida, o DNA do material microdissecado foi amplificado utilizando-se o Kit comercial GenomePlex® Single Cell Whole Genome Amplification (WGA4-Sigma), e o produto checado em gel de agarose 1%. Por meio de uma reação de reamplificação deste DNA através do Kit GenomePlex® WGA Reamplification Kit (WGA3-Sigma) associado à digoxigenina-11-dUTP (Roche Applied Science) foi então criada uma sonda B-específica do DNA total do cromossomo B (denominada B_{abock}).

O procedimento adotado para a realização da hibridação *in situ* seguiu o protocolo estabelecido por Pinkel *et al.* (1986), com estringência de 77%. As lâminas foram contracoradas com o agente DAPI (4_6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride), e a detecção do sinal de hibridação realizada através da ação da anti-digoxigenina-rodamina (Roche Applied Science) e Avidina-fluoresceína conjugada (FITC). Como forma de controle, quando efetuada a Zoo-FISH com a sonda B_{abock} realizada em cromossomos B das demais espécies, conjuntamente, o mesmo procedimento era adotado com lâminas da espécie *A. bockmanni*, a fim de obtermos maior credibilidade quanto às marcações observadas. As imagens foram capturadas por uma câmera digital refrigerada Olympus Qcolor5, acoplada a um fotomicroscópio de fluorescência (BX50, Olympus) e auxílio do Software QCapture Pro 5.1.1.14. A montagem dos cariótipos, manutenção de brilho e contraste das imagens foram feitas no programa Adobe Photoshop CS5.

Resultados e discussão

Através da análise de células metafásicas de exemplares das espécies *Astyanax bockmanni* e *A. paranae* identificamos um número diploide modal de 50 cromossomos para ambas as espécies e de 46 cromossomos para *A. fasciatus*, encontrando-se de acordo com o descrito na literatura acerca do número diploide modal para estas espécies (Porto-Foresti *et al.*, 1997; Ferreira-Neto *et al.*, 2009; Hashimoto *et al.*, 2011; Daniel *et al.*, 2012; Pansonato-Alves *et al.*, 2013). O bandamento C indicou um padrão de heterocromatina parcial dos supranumerários B_a (*A. bockmanni*) (figura 1a), B_{ST} e B_M (*A. fasciatus*) (figura 1c, 1e-f), e um padrão totalmente heterocromático para os supranumerários B_m (*A. bockmanni*) (figura 1b), B_A (*A. fasciatus*) (figura 1d) e B_M (*A. paranae*) (figura 1g-h).

Assim como nas espécies reportadas no atual trabalho, diferentes padrões de bandas também são observados em outras espécies de peixes. Em *Moenkhausia sanctaefilomenae*, os supranumerários apresentam-se geralmente heterocromáticos, ou ainda, parcialmente e eucromáticos (Foresti *et al.*, 1989; Dantas *et al.*, 2007). Em algumas espécies do gênero *Astyanax* estes elementos normalmente apresentam-se heterocromáticos (Porto-Foresti *et al.*, 1997; Moreira-Filho *et al.*, 2001; Ferro *et al.*, 2003; Hashimoto *et al.*, 2008; Daniel *et al.*, 2012), apesar de trabalhos relatarem padrões parciais ou eucromáticos (Néo *et al.*, 2000; Moreira-Filho *et al.*, 2001; Kavalco *et al.*, 2007; Daniel *et al.*, 2012; Machado *et al.*, 2012). Estas variações indicam que estes elementos estão constantemente reorganizando-se geneticamente.

Moreira-Filho *et al.* (2001) propõe uma hipótese fundamentada na similaridade dos supranumerários no gênero *Astyanax*, e sugerem que a origem destes elementos precede a diferenciação das espécies no grupo. Em revisão sobre cromossomos B,

Moreira-Filho *et al.* (2004) postulam que morfotipos destes elementos são frequentemente observados em espécies de *Astyanax*, entretanto, a variante B_M (semelhante ao primeiro par cromossômico) é a que apresenta maior distribuição em populações naturais. Como a variante B_M ocorre em outras populações de *Astyanax*, é plausível que esta variante corresponda a um cromossomo B ancestral (revisão em Moreira-Filho *et al.*, 2004). Outras variantes podem ser derivadas de rearranjos estruturais do cromossomo B_M .

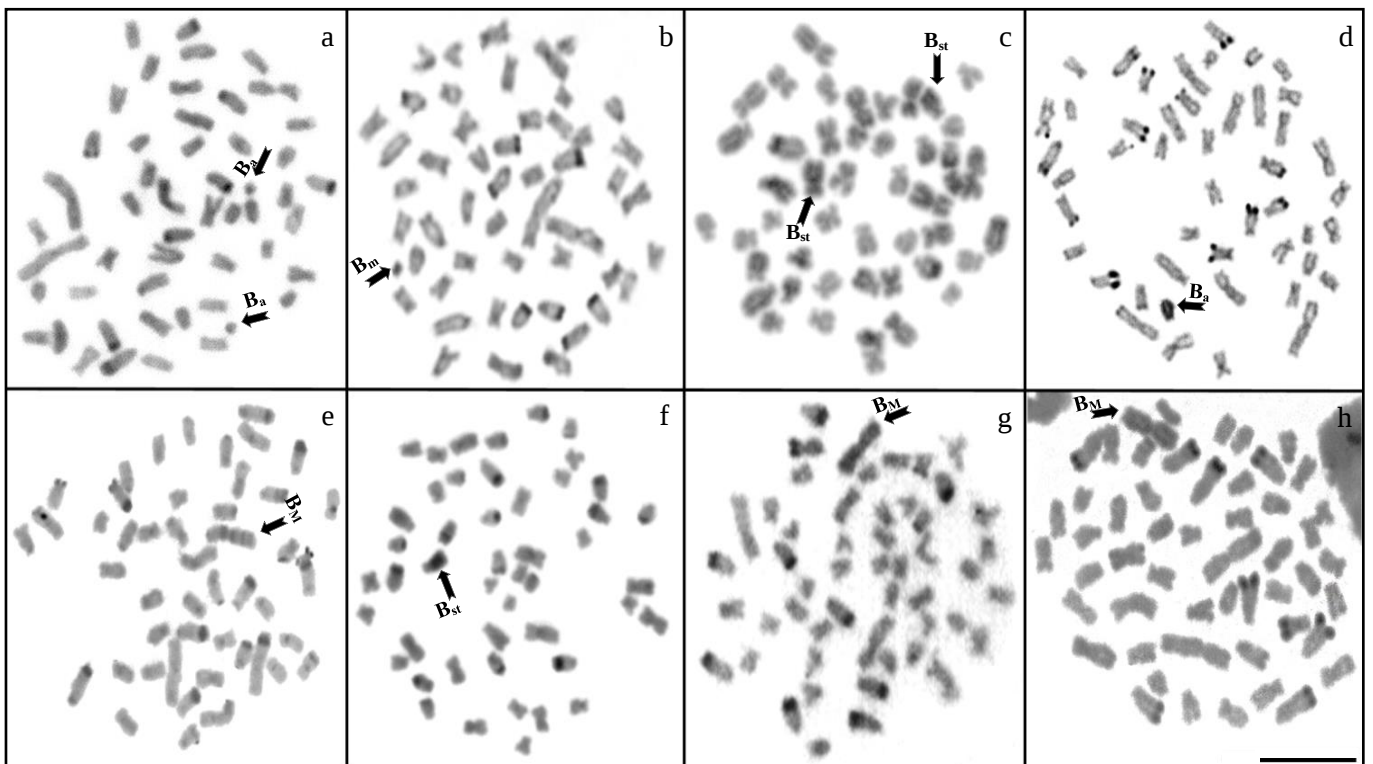


Figura 1: Células metafásicas de das espécies *A. bockmanni* (a,b), *A. fasciatus* (c,d,e, f) e *A. paranae* (g, h) submetidas à técnica de bandamento C. As setas indicam os cromossomos Supranumerários. Bar 10 μ m.

Através de hibridação *in situ* com a sonda B-específica B_{abock} observamos uma pintura cromossômica total dos morfotipos B_a e B_m na espécie *A. bockmanni* (figuras 2a,b), além de grandes blocos concentrados nas regiões terminais dos braços curtos e longos do cromossomo B_{st} de *A. fasciatus* (figura 2d), sugerindo que estes elementos adicionais poderiam de fato compartilhar um ancestral comum, sustentando a hipótese de um cromossomo B ancestral em *Astyanax*, como proposto por Moreira-Filho *et al.*

(2001). Em *A. goyacensis*, Santos *et al.* (2013) constataram sinais de uma sonda B-específica em cromossomos padrão e na maioria dos cromossomos B visualizados. Os resultados sugerem que os cromossomos B podem ter se originado a partir de dois pares de cromossomos acrocêntricos. Padrões similares de heterocromatina entre estes cromossomos e cromossomos B reforçam esta ideia. Os autores reportam ainda a presença de até nove cromossomos B no genoma desta espécie, fato inédito entre as espécies deste gênero.

Em busca de informações sobre a origem de supranumerários no gênero *Prochilodus*, Voltolin *et al.* (2013) isolaram e marcaram uma sonda a partir de um de seus cromossomo B e com a aplicação da *Zoo-FISH*, constataram uma grande homologia entre o DNA isolado e os supranumerários de *P. nigricans*. As similaridades apresentadas entre estes cromossomos B seriam indícios suficientes para hipotetizar uma origem comum destes elementos em ambas as espécies. Similarmente, Cabrero *et al.* (2013) utilizando sondas de DNAr e satDNA isolados de cromossomos B, mapearam uma possível origem destes elementos em 17 populações do gafanhoto *Eyprepocnemis plorans* e observaram que todas as populações apresentavam homologia com o DNA isolado do B. Dessa forma, aparentemente a ideia de ancestralidade pode não restringir-se apenas ao grupo *Astyanax*, mas extrapolada, inclusive, para outros grupos animais portadores desses elementos extras.

Teruel *et al.* (2009) abordaram a microdissecção cromossômica para entender a origem do cromossomo B em insetos. Os autores microdissecaram e marcaram sondas específicas dos cromossomos X e B24 do gafanhoto *Eyprepocnemis plorans*. Após aplicação da *Zoo-FISH* com estas sondas, observaram um compartilhamento de sequências repetitivas entre estes dois cromossomos, especificamente o DNAr 45S e DNAs repetitivos em tandem contendo 180 pb. Segundo os autores, os resultados

levantados sugerem uma origem dos cromossomos B nesta espécie a partir do cromossomo sexual X.

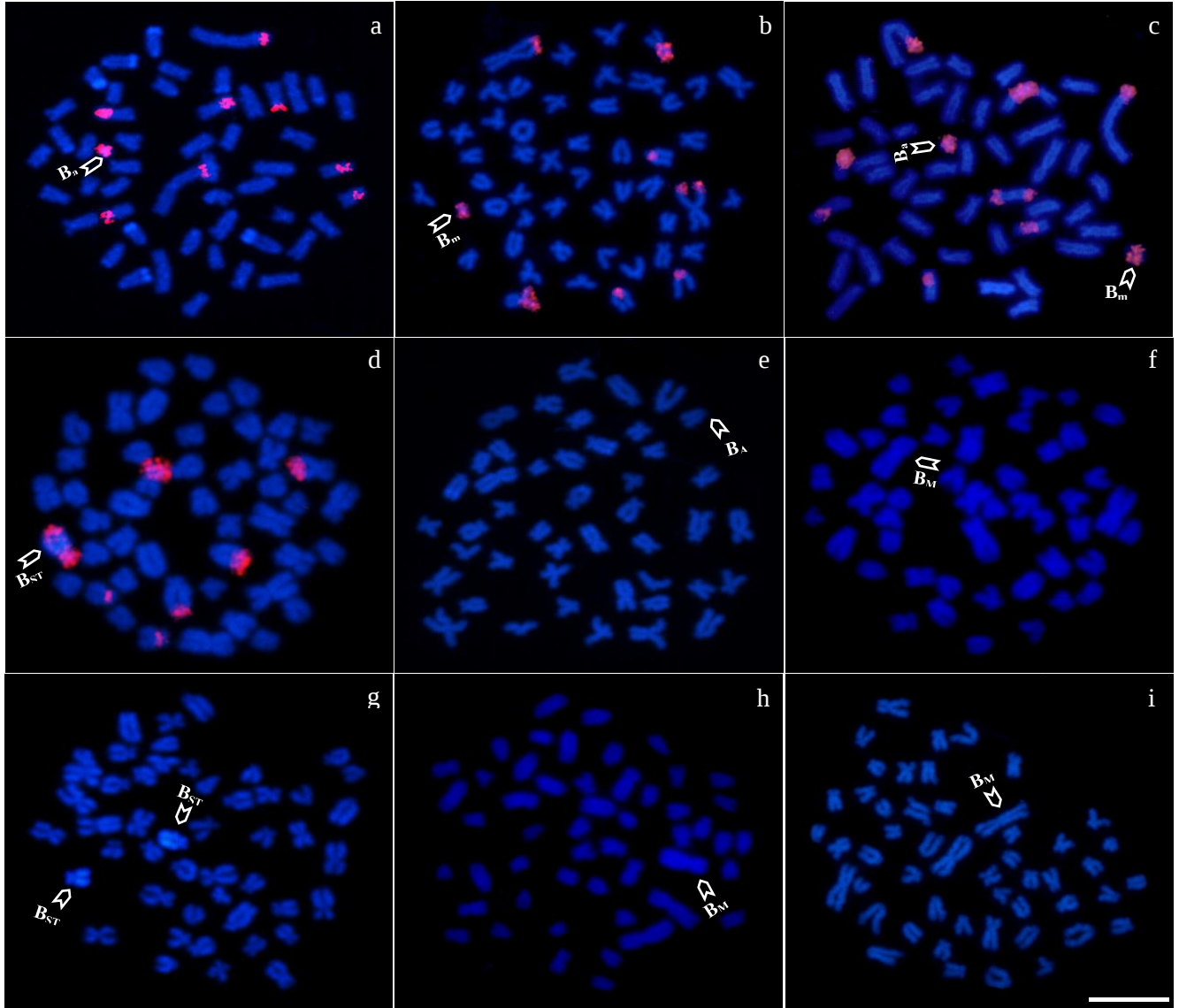


Figura 2: Células metafásicas portando cromossomos supranumerários após *FISH* com sonda B-específica B_{abock} . Em a, b e c *Astyanax bockmanni*; em d, e, f, g *A. fasciatus*; h, i *A. paranae*. As setas indicam os Cromossomos B. Bar 10 μ m.

Adicionalmente, marcações bem evidentes da sonda B_{abock} foram observadas em cromossomos A de duas populações de *A. bockmann* (figura 3a-b) e uma população de *A. fasciatus* (figura 2d). Jesus *et al.* (2003) dispendo de duas famílias de DNA satélite, SATH1 e SATH2 estudaram as sequências de DNA repetitivo presentes nos cromossomos B da espécie *Prochilodus lineatus*. A localização cromossômica destas

famílias de DNA repetitivo indicou grande similaridade entre o DNA satélite SATH1 e todos os cromossomos B desta espécie, além de sítios conspícuos na região pericentromérica de cromossomos do complemento padrão. Mestriner *et al.* (2000) por meio da sonda As51, detectaram a presença de sequências repetitivas nos dois braços do cromossomo B de *A. scabripinnis*, semelhante ao par de cromossomos 24. Acerca dos resultados levantados, Mestriner *et al.* (2000) e Jesus *et al.* (2003) atribuíram formação por isocromossomo dos cromossomos B em ambas as espécies.

Artoni *et al.* (2006) em estudos envolvendo sondas das mesmas famílias de DNA satélite (SATH1 e SATH2) em duas populações de *Prochilodus lineatus* (rio Mogi-Guaçu/SP e lagoa Dourada/PR), observaram uma homologia completa entre o SATH1 e três de quatro supranumerários do rio Mogi-Guaçu, com o outro B se apresentando parcialmente marcado. Todavia, na população da lagoa Dourada dois dos três cromossomos B mostraram sinais fluorescentes parciais da sonda, enquanto que o cromossomo B restante não apresentou marcações de SATH1. Os autores postulam que a diferente distribuição da SATH1 nestas duas populações de *P. lineatus* pode revelar um processo de evolução independente dos supranumerários das localidades amostradas, e atribuem uma origem por isocromossomos destes cromossomos B.

Camacho *et al.* (2000) postulam que a caracterização molecular de sequências de DNA repetitivo específica de cromossomos B que são compartilhadas com seus cromossomos A da própria espécie, bem como compartilhadas com supranumerários e cromossomos padrão de outras espécies, fornecem uma série de subsídios que reforçam a hipótese de uma origem comum destes elementos adicionais.

Observamos ainda em nossos resultados que alguns cromossomos B de *A. fasciatus* e *A. paranae* não apresentaram qualquer homologia com a sonda B_{abock}. Isso poderia ser fruto da alta incidência de mutações que cromossomos B sofrem, abrindo

dessa forma novos caminhos evolutivos e polimorfismo destes elementos, uma vez que algumas das novas variantes encontradas nas diferentes espécies e populações registram maiores taxas de transmissão comparadas ao seu B ancestral, e assim, podem facilmente substituí-lo (Cabrero *et al.*, 2013).

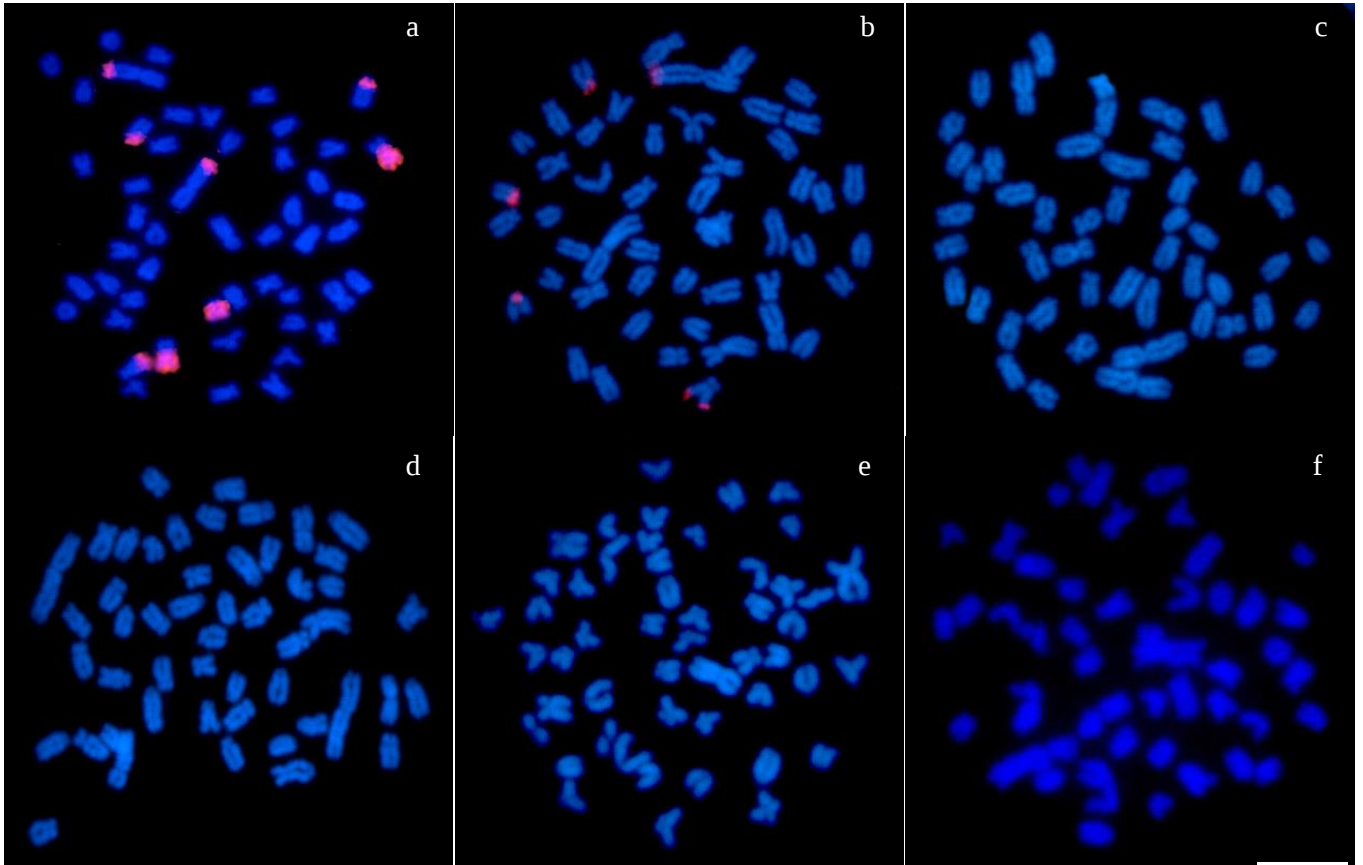


Figura 3: Células metafásicas da espécie *A. bockmanni* que não apresentaram Cromossomos B em seu conjunto genômico. Em **a**, população do córrego Alambari; **b**, córrego Barra Seca; **c**, córrego Campo Novo; **d**, rio Batalha; **e**, rio Capivara; **f**, cachoeira Véu Noiva. Bar 10 µm.

Segundo Cabrero *et al.* (2013), as sequências contidas em cromossomos B têm uma taxa de mutação bem mais elevada comparada ao restante do genoma, e podem portanto, diferenciar-se de seus "progenitores", fatos muito bem documentados em populações de gafanhotos *Eyprepocnemis plorans*, com ocorrência de pelo menos outras 50 variantes de supranumerários a partir de um B ancestral. Pesquisas recentes indicam que esses cromossomos após sua origem modificam rapidamente sua estrutura genética em poucas gerações (Manrique-Poyato *et al.*, 2013), impedindo a sinapse com

seu possível DNA “progenitor” seguindo suas próprias vias evolutivas e isolando-se do restante do genoma que o teria originado (Camacho *et al.*, 2000).

Portanto, propomos uma origem comum dos supranumerários de *A. bockmanni* (B_a e B_m) e *A. fasciatus* (B_{st}) aqui reportados, uma vez que a sonda B_{abock} revelou grande homologia entre ambos, bem como alguns de seus cromossomos padrão, inclusive em populações que não indicaram a presença de cromossomos B, o que reforça a hipótese de que em algum momento evolutivo e geográfico, estas populações compartilharam de um ancestral comum portador de supranumerários, ou ainda, este cromossomo B poderia estar em fase de invasão nesta população. Todavia, sabemos que supranumerários em peixes podem não apresentar um modelo único de origem. Por conta disso, seria imprescindível isolar e criar sondas B-específicas das outras duas espécies estudadas. Estes estudos certamente poderão reforçar esta teoria, e mostrar inclusive que não só estas três espécies podem estar associadas a um cromossomo B ancestral, mas também outras espécies do grupo que são proximamente relacionadas.

Referências Bibliográficas

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

5 Considerações finais

Os estudos citogenéticos e moleculares realizados no presente trabalho trouxeram uma particular contribuição sobre a organização cromossômica, distribuição e comportamento de alguns genes em diferentes populações de *Astyanax bockmanni*. Do ponto de vista citogenético o número diplóide modal para esta espécie apresentou $2n=50$ cromossomos, com todos os cariótipos constituídos por cromossomos metacêntricos, submetacêntricos, subtelocêntricos e acrocêntricos, além da presença de cromossomos B em apenas uma das populações (córrego Alambari), caracterizado pelo seu tamanho (microcromossomo) e heterocromatinização peculiares.

O bandamento C aplicado revelou um polimorfismo de marcações inter individuais nas seis populações, variando desde quatro (córrego Alambari e rio Capivara), até dez cromossomos marcados (rio Batalha). Em todas as populações verificamos uma recorrência de marcações em cromossomos de morfologia acrocêntricos. A instabilidade da heterocromatina pode ser resultado da duplicação de segmentos heterocromáticos por translocações não recíprocas, originando assim, gametas com quantidade de cromatina diferentes.

A impregnação com nitrato de Prata detectou vários sítios Ag-NORs em cinco das seis populações analisadas, predominando um sistema de RONS múltiplas e variação inter individual. Apenas a população do córrego Capivara apresentou um sistema de RONS simples. Este heteromorfismo de Ag-NOR pode estar associado à mecanismos de *crossing-over* desiguais, transposição ou rearranjos cromossômicos durante seu processo de diferenciação, processos comumente relatados em peixes. A impregnação com nitrato de Prata não indicou atividades nucleolares nos supranumerários reportados para esta espécie.

Os genes DNAr 5S e 18S mapeados em *A. bockmanni* acompanharam os padrões de distribuição e marcação do gênero, com o gene 5S se mostrando mais conservado, presente em apenas dois pares cromossômicos. Já o DNAr 18S se mostrou extremamente variável entre as populações (de 4 a 9 cromossomos marcados), fortalecendo a ideia de que genes ribossomais possivelmente seguem caminhos evolutivos independentes.

As mesmas populações apresentaram de forma similar os genes para a histona H1 e H3, presentes apenas em dois pares cromossômicos, com exceção apenas da população Alambari, que apresentou sete cromossomos hibridados com a histona H3. Assim, aparentemente estes dois genes esboçam um comportamento conservado para *A. bockmanni* e outras espécies do gênero, não apresentando diferenciação significativa entre populações.

O mapeamento dos elementos transponíveis *Rex1* e *Rex6* apontou que estes distribuem-se de forma similar ao longo do genoma das seis populações analisadas, com a presença de grandes blocos dos dois transposons marcando quase que completamente alguns cromossomos. Sítios menores de ambos também foram reportados ao longo de quase todo o cromossomo, de forma a apresentar uma cobertura similar ao observado pelos blocos.

O transposon *Rex3* também apresentou pequenos sítios na maioria dos cromossomos das seis populações, entretanto, disperso pelo genoma. Além destas marcações, verificamos ainda o predomínio de um bloco deste elemento concentrado em apenas um cromossomo acrocêntrico nas populações Batalha e Barra Seca.

Este padrão observado nas seis populações analisadas sugere que os elementos transponíveis da família *Rex* devem ter sido incorporados há muito tempo em seus genomas, e podem estar desde então desempenhando um papel importante na

conservação e evolução de populações de *A. bockmanni*, inclusive na origem de cromossomos B, já que sinais conspícuos dos três elementos foram encontrados no supranumerário desta espécie. Considera-se ainda, o fato de que estes elementos possam desempenhar papéis fundamentais na manutenção e estruturação de regiões cromossômicas heterocromáticas, onde há poucos genes funcionais e baixa taxa de recombinação, levando ao acúmulo desses elementos distribuídos pelo genoma.

A realização de microdissecção de cromossomos B de *A. bockmanni* seguida de *FISH* e *Zoo-FISH* nas espécies *A. bockmanni*, *A. fasciatus* e *A. paranae* apresentou uma homologia contundente entre a sonda B-específica e os cromossomos B e até oito cromossomos padrão de duas populações de *A. bockmanni*. A *Zoo-FISH* aplicada nas células metafásicas das espécies *A. fasciatus* e *A. paranae* mostrou que apenas o morfotipo B_{ST} de *A. fasciatus* compartilha sequências com o material genético da sonda B-específica. Entretanto, não foram observadas hibridações nos supranumerários de *A. paranae*.

Logo, aparentemente o cromossomo B microdissecado de *A. bockmanni* (B_a) apresenta características correspondentes a um cromossomo B ancestral entre estas espécies, uma vez que compartilha sequências intra e interespecíficas no grupo. A ausência de homologias entre o cromossomo B de *A. paranae* pode estar associado ao fato de que cromossomos B tendem a seguir caminhos evolutivos distintos, assim, hipoteticamente após a “transmissão” do cromossomo B ancestral, este teria modificado de tal forma suas sequências para se manter na espécie/população ao qual foi introduzido, que estas alterações foram refletidas na ausência de homologia observadas, além de mudanças radicais em sua morfologia. O isolamento e criação de sondas B-específicas de *A. paranae* e *A. fasciatus* aplicadas nestas e em outras espécies do grupo poderiam corroborar e fortalecer esta hipótese.

Por fim, os estudos desenvolvidos no atual trabalho, fornecem subsídios para melhor compreendermos a estruturação cromossômica e cariotípica, e o comportamento de famílias multigênicas (histonas e transposons) no genoma de peixes, bem como respaldos que nos permitam inferir sobre a origem, manutenção, composição e evolução de cromossomos supranumerários, em especial os que compreendem o gênero *Astyanax*.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida-Toledo LF, Ozouf-Costaz C, Foresti F, Bonillo C, Porto-Foresti F, Daniel-Silva MFZ (2002) Conservation of the 5S-bearing chromosome pair and co-localization with major rDNA clusters in five species of *Astyanax* (Pisces, Characidae). *Cytogenet Genome Res*, 97:229-233.
- Amaro PS, Aoudia S, Babak S, Binétruy P, Berti E, Bohé A, Ward H (2012) Low-frequency gravitational-wave science with eLISA/NGO. *Classical and Quantum Gravity*, 29(12)124016. doi:10.1088/0264-9381/29/12/124016.
- Aparicio S, Chapman J, Stupka E, Putnam N, Chia JM, Dehal P, *et al.* (2002) Whole-genome shotgun assembly and analysis of the genome of *Fugu rubripes*. *Science*, 297(5585):1301-1310.
- Artoni RF, Shibatta OA, Gross MC, Schneider CH, Almeida MC (2006) *Astyanax aff. fasciatus* Cuvier, 1819 (Teleostei, Characidae): evidences of a species complex in the upper rio Tibagi basin (Paraná, Brazil). *Neotrop Ichthyol*, 4:197-202.
- Bates GP, Wainwright BJ, Williamson R, Brown SDM (1986) Microdissection and microclonning from the short arm of human chromosome 2. *Mol Cell Biol*, 6:3826-3830.
- Britski HA, Silimon KZS, Lopes BS (1999) *Peixes do Pantanal. Manual de identificação*. Brasília: Embrapa-SPI, Corumbá: Embrapa-CPAP, p.184.
- Böhne A, Brunet F, Galiana-Arnoux D, Schultheis C, Volff JN (2008) Transposable elements as drivers of genomic and biological diversity in vertebrates. *Chromosome Res*, 16(1):203-215.

- Bouilly K, Chaves R, Fernandes M, Guedes-Pinto H (2010) Histone H3 gene in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg, 1793: molecular and cytogenetic characterisations. *Comparative Cytogenetics*, 4(2):111-121.
- Bueno D, Palacios-Gimenez OM, Cabral-de-Mello DC (2013) Chromosomal Mapping of Repetitive DNAs in the Grasshopper *Abracris flavolineata* Reveal Possible Ancestry of the B Chromosome and H3 Histone Spreading. *Plos One*, 8(6) e66532.
- Cabral-de-Mello DC, Moura RC, Martins C (2011a) Cytogenetic mapping of rRNAs and histone H3 genes in 14 species of *Dichotomius* (Coleoptera, Scarabaeidae, Scarabaeinae) beetles. *Cytogenetic and genome research*, 134(2):127-135.
- Cabral-de-Mello DC, Cabrero J, López-León MD, Camacho JPM (2011b) Evolutionary dynamics of 5S rDNA location in acridid grasshoppers and its relationship with H3 histone gene and 45S rDNA location. *Genetica*, 139(7):921-931.
- Cabral-de-Mello D, Oliveira S, Moura R, Martins C (2011c) Chromosomal organization of the 18S and 5S rRNAs and histone H3 genes in *Scarabaeinae coleopterans*: insights into the evolutionary dynamics of multigene families and heterochromatin. *BMC genetics*, 12(1):88.
- Cabrero J, López-León MD, Teruel M, Camacho JP M (2009) Chromosome mapping of H3 and H4 histone gene clusters in 35 species of acridid grasshoppers. *Chromosome Research*, 17(3):397-404.
- Cabrero J, López-León MD, Ruíz-Estévez M, Gómez R, Petitpierre E, Rufas JS, Camacho JPM (2013) B1 Was the Ancestor B Chromosome Variant in the Western Mediterranean Area in the Grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Cytogenet genome res*, 142(1):54-58, doi:10.1159/000356052.
- Camacho JPM, Sharbel TF, Beukboom LW (2000) B-chromosome evolution. *Phil. Trans. R Soc Lond*, 355:163-178.

- Camacho JPM (2005) B chromosomes. In: Gregory, T.R. The evolution of the genome. San Diego, California, USA, p.223-286.
- Capy P (1998) Evolutionary biology: A plastic genome. *Nature*, 396(6711):522-523.
- Charlesworth B, Sniegowski P, Stephan W (1994) The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature*, 371:215-220.
- Cioffi MB, Martins C, Bertollo LAC (2010) Chromosome spreading of associated transposable elements and ribosomal DNA in the fish *Erythrinus erythrinus*. Implications for genome change and karyoevolution in fish. *BMC Evolutionary Biology*, 10:271.
- Cioffi MB, Sánchez A, Marchal JA, Kosyakova N, Liehr T, Trifonov V, Bertollo LAC (2011) Whole chromosome painting reveals independent origin of sex chromosomes in closely related forms of a fish species. *Genetica*, 139(8):1065-1072, doi: 10.1007/s10709-011-9610-0.
- Colgan DJ, McLauchlan A, Wilson GDF, Livingston SP, Edgecombe GD, Macaranas J, Gray MR (1998) Histone H3 and U2 snRNA DNA sequences and arthropod molecular evolution. *Australian Journal of Zoology*, 46(5):419-437.
- Cox MM, Doudna JÁ, O'Donnell M (2012) *Biologia Molecular: Princípios e Técnicas*. Artmed, Porto Alegre, Brazil, p. 503-507.
- Daniel-Silva MFZ, Almeida Toledo LF (2001) Chromosome R-banding pattern and conservation of a marker chromosome in four species, genus *Astyanax* (Characidae, Tetragonopterinae). *Caryologia*, 54(3):209-215.
- Daniel SN, Hashimoto DT, Pansonato-Alves JC, Foresti F, Porto-Foresti F (2012) Cytogenetic characterization of distinct B chromosomes in a population of the fish *Astyanax bockmanni* (Teleostei, Characiformes). *Caryologia*, 65(3):229-233, doi:10.1080/00087114.2012.738488.

- Dantas ESO, Vicari MR, Souza IL, Moreira-Filho O, Bertollo LAC, Artoni RF (2007) Cytotaxonomy and Karyotype Evolution in *Moenkhausia* Eigenmann, 1903 (Teleostei, Characidae). *Nucleus*, 50(3):509-522.
- Deng HX, Yoshiura KI, Dirks RW, Harada N, Hirota T, Tsukamoto K, Jinno Y, Nuikawa N (1992) Chromosome-band-specific painting: chromosome in situ suppression hybridization using PCR products from a microdissected chromosome band as probe tool. *Hum Genet*, 89:13-17.
- Deng C, Bai L, Fu S, Yin W, Zhang Y, Chen Y, Hu Z (2013) Microdissection and chromosome painting of the alien chromosome in an addition line of wheat-*Thinopyrum intermedium*. *Plos One*, 8(8):e72564.
- Dimitri P, Arca B, Berghella L, Mei E (1997) High genetic instability of heterochromatin after transposition of the LINE-like factor in *Drosophila melanogaster*. *Proc Nat Acad Sci USA*, 94:8052-8057.
- Dowling P (2002) The sociology of mathematics education: Mathematical myths/pedagogic texts. Routledge.
- Eschmeyer WN (2013) Catalog of Fishes. California Academy of Sciences. Electronic version em <http://research.calacademy.org/ichthyology/catalog>. Acessado dia 08 de Janeiro de 2014.
- Fantinatti BEA, Mazzuchelli J, Valente GT, Cabral-de-Mello D, Martins C (2012) Genomic content and new insights on the origin of the B chromosome of the cichlid fish *Astatotilapia latifasciata*. *Genetica*, 139:1273-1282.
- Fauaz, G, Vicente VE, Moreira-Filho O (1994) Natural triploidy and B-chromosomes in the neotropical fish genus *Astyanax* (Characidae). *Rev Bras Genét*, 17(2):157-163.

- Fenocchio AS, Bertollo LAC, Takahashi CS, Camacho JPM (2000) B chromosomes in two fish species, genus *Rhamdia* (Siluriformes, Pimelodidae). *Folia Biol*, 48:105-109.
- Fernandes CA, Martins-Santos IC (2005) Sympatric occurrence of three cytotypes and four morphological types of B chromosomes of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characiformes) in the River Ivaí Basin, state of Paraná, Brazil. *Genetica*, 124(2-3):301-306.
- Fernandes CA, Piscor D, Bailly D, da Silva VFB, Martins-Santos IC (2010) Cytogenetic Studies Comparing Three Characidae Fish Species from the Iguatemi River Basin, Brazil. *Caryologia*, 75:329-333.
- Fernandes A, Scudeler PES, Diniz D, Foresti F, Oliveira C, Campos LA, Lopes DM (2011) Microdissection: a tool for bee chromosome studies. *Apidologie*, 42(6):743-748.
- Ferreira DC, Oliveira C, Foresti F (2011a) Chromosome Mapping of Retrotransposable Elements *Rex1* and *Rex3* in Three Fish Species in the Subfamily Hypoptopomatinae (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). *Cytogenet Genome Res*, 132:64-70.
- Ferreira DC, Porto-Foresti F, Oliveira C, Foresti F (2011b) Transposable elements as a potential source for understanding fish genome. *Mobile Genetic Elements*, 1(2):1-6.
- Ferreira IA, Martins C (2008) Physical chromosome mapping of repetitive DNA sequences in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*: Evidences for a differential distribution of repetitive elements in the sex chromosomes. *Micron*, 39(4):411-418.
- Ferreira-Neto M, Vicari MR, Camargo EF, Artoni RF, Moreira-Filho O (2009) Comparative cytogenetics among populations of *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae, *Incertae sedis*). *Genet Mol Biol*, 32(4):792-796.

- Ferreira-Neto M, Artoni RF, Vicari MR, Moreira-Filho O, Camacho JPM, Bakkali M, Oliveira C, Foresti F (2012) Three sympatric karyomorphs in the fish *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae) do not seem to hybridize in natural populations. *Comparative Cytogenetics*, 6(1):29-40.
- Fischer C, Bouneau L, Coutanceau JP, Weissenbach J, Volff JN, Ozouf-Costaz C (2004) Global heterochromatic colocalization of transposable elements with minisatellites in the compact genome of the pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. *Gene*, 336:175-184.
- Ferro DA, Moreira-Filho O, Bertollo LAC (2003) B chromosome polymorphism in the fish, *Astyanax scabripinnis*. *Genetica*, 119:147-153.
- Fong PP, Garthwaite RL (1994) Allozyme electrophoretic analysis of the *Hediste limnicola*-*H. diversicolor*-*H. japonica* species complex (Polychaeta: Nereididae). *Marine Biology*, 118(3):463-470.
- Foresti F, Almeida-Toledo LF, Toledo-Filho SA (1981) Polymorphic nature of nucleous organizer regions in fishes. *Cytogenet Cell Genet.*, 31:137-144.
- Foresti F, Almeida-Toledo LF, Toledo SA (1989) Supernumerary chromosome system, C-banding pattern characterization and multiple nucleolus organizer regions in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Pisces, Characidae). *Genetica*, 79(2):107-114.
- Froese R, Pauly D (2010) FishBase. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org, version (01/2010). Capturado em 16 de Maio de 2013.
- Fujiwara A, Abe S, Yamaha E, Yamazaki F, Yoshida MC (1998) Chromosomal localization and heterochromatin association of ribosomal RNA gene loci and silver-stained nucleolar organizer regions in salmonid fishes. *Chromosome Research*, 6:463-471.

- Garrido-Ramos MA, Jamilena M, Lozano R (1994) Cloning and characterization of a fish centromeric satellite DNA. *Cytogenet Genome Res*, 65(4):233-237.
- Garutti V, Britski HA (2000) Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. *Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS, série Zoologia*, 13:65-88.
- Gilbert JJ, Walsh EJ (2005) *Brachionus calyciflorus* is a species complex: mating behavior and genetic differentiation among four geographically isolated strains. In *Rotifera X*. 257-265. doi: 10.1007/1-4020-4408-9_26.
- Gross MC, Schneider CH, Valente GT, Porto JIR, Martins C, Feldberg E (2009) Comparative Cytogenetic Analysis of the Genus *Symphysodon* (Discus Fishes, Cichlidae): Chromosomal Characteristics of Retrotransposons and Minor Ribosomal DNA. *Cytogenet Genome Res*, 127:43-53.
- Guerra M (2004) FISH. Conceitos e aplicações na Citogenética. SBG, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil, p.184.
- Gursel I, Gursel M, Yamada H, Ishii KJ, Takeshita F, Klinman DM (2003) Repetitive elements in mammalian telomeres suppress bacterial DNA-induced immune activation. *The Journal of Immunology*, 171(3):1393-1400.
- Hashimoto DT, Gonçalves VR, Bortolozzi J, Foresti F, Porto-Foresti F (2008) First report of a B chromosome in a natural population of *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae). *Genet Mol Biol*, 31:275-278.
- Hashimoto DT, Porto-Foresti F (2010) Chromosome polymorphism of heterochromatin and nucleolar regions in two populations of the fish *Astyanax bockmanni* (Teleostei: Characiformes). *Neotrop Ichthyol*, 8(4):861-866.

- Hashimoto DT, Ferguson-Smith M, Rens W, Foresti F, Porto-Foresti F (2011) Chromosome mapping of H1 histone and 5S rRNA gene clusters in three species of *Astyanax* (Teleostei, Characiformes). *Cytogenet Genome Res*, doi: 10.1159/000323512.
- Hatanaka T, Galetti PM (2004) Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetica*, 122(3):239-244.
- Houben A, Banaei-Moghaddam AM, Klemme S, Timmis JN (2013) Evolution and biology of supernumerary B chromosomes. *Cell Mol Life Sci*, doi: 10.1007/s00018-013-1437-7.
- Howell WM, Black DA (1980) Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, 36:1014-1015.
- Jesus CM, Galetti Jr. PM, Valentini SR, Moreira-Filho O (2003) Molecular characterization and chromosomal localization of two families of satellite DNA in *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae), a species with B chromosomes. *Genetica*, 118(1):25-32.
- Jones RN, Houben A (2003) B chromosomes in plants: escapes from the A chromosome genome? *Trends in Plant Science*, 8:417-423.
- Kantek DLZ, Noleto RB, Fenocchio AS, Cestari MM (2007) Cytotaxonomy, heterochromatic polymorphism and natural triploidy of a species of *Astyanax* (Pisces, Characidae) endemic to the Iguaçu River Basin (Paraná, Brasil). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50:67-74.
- Kavalco KF, Moreira-Filho O (2003) Cytogenetical analyses in four species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae) from Paraíba do Sul river basin. *Caryologia*, 56(4):453-461.

- Kavalco KF, Pazza R, Bertollo LAC, Moreira-Filho O (2004) Gene mapping of 5S rDNA sites in eight fish species from the Paraíba do Sul river basin, Brazil. *Cytogenet genome res*, 106(1):107-110.
- Kavalco KF, Almeida-Toledo LF (2007) Molecular cytogenetics of blind mexican tetra and comments on the karyotypic characteristics of genus *Astyanax* (Teleostei, Characidae). *Zebrafish*, 4(2):103-111.
- Kavalco KF, Pazza R, Almeida-Toledo LF (2009) *Astyanax bockmanni* Vari and Castro, 2007: An ambiguous karyotype in the *Astyanax* genus. *Genetica*, 136:135-139.
- Kavalco KF, Pazza R, Brandão KDO, Garcia C, Almeida-Toledo LF (2011) Comparative cytogenetics and molecular phylogeography in the group *Astyanax altiparanae* - *Astyanax aff. bimaculatus* (Teleostei, Characidae). *Cytogenet Genome Res*, 134(2):108-119, doi:10.1159/000325539.
- Kidwell MG, Kidwell JF, Sved JA (1977) Hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster*: a syndrome of aberrant traits including mutation, sterility and male recombination. *Genetics*, 86(4):813-833.
- Levan A, Fredga K, Sandbreg AA (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52:201-220.
- Li YC, Cheng YM, Hsieh LJ (2005) Karyotypic evolution of a novel cervid satellite DNA family isolated by microdissection from the Indian muntjac Y chromosome. *Chromosoma*, 114:28-38.
- Lima FCT, Malabarba LR, Buckup PA, Silva JFP, Vari RP *et al.* (2003) Genera *incertae sedis* in Characidae. In: *Check list of the freshwater fishes of South and Central America*. Edipucrs, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

- Loreto ELS, Carareto CMA, Capy P (2008) Revisiting horizontal transfer of transposable elements in *Drosophila*. *Heredity*, 100(6):545-554.
- Lucena CAS (1993) Estudo filogenético da família Characidae com uma discussão dos grupos naturais propostos (Teleostei, Ostariophysi, Characiformes). Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, p.125.
- Lucena CAS, Castro JB, Bertaco VA (2013) Three new species of *Astyanax* from drainages of southern Brazil (Characiformes: Characidae). *Neotrop Ichthyol*, 11(3):537-552.
- Ludecke HJ, Senger G, Claussen U, Horsthemke B (1989) Cloning defined regions of the human genome by microdissection of banded chromosomes and enzymatic amplification. *Nature*, 338:348-350.
- Machado TC, Pansonato-Alves JC, Pucci MB, Nogaroto V, Almeida MC, Oliveira C, Vicari MR (2011) Chromosomal painting and ZW sex chromosomes differentiation in *Characidium* (Characiformes, Crenuchidae). *BMC genetics*, 12(1):65.
- Machado SN, Ferreira-Neto M, Bakkali M, Vicari MR, Artoni RF, Oliveira C, Foresti F (2012) Natural triploidy and B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* (Characiformes, Characidae): a new occurrence. *Caryologia*, 65(1), 40-46.
- Maistro EL, Foresti F, Oliveira C, Almeida-Toledo LF (1992) Occurrence of macro B chromosome in *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characiformes, Characidae). *Genetica*, 87:101-106.
- Maistro EL, Foresti F, Oliveira C (1999) R-and G-band patterns in *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characiformes, Characidae). *Genet Mol Biol*, 22(2):201-204.
- Maistro EL, Oliveira C, Foresti F (2000) Sympatric occurrence of two cytotypes of *Astyanax scabripinnis* (Characiformes, Characidae). *Genet Mol Biol*, 23(2):365-369.

- Manrique-Poyato MI, López-León MD, Cabrero J, Perfectti F, Camacho JPM (2013) Spread of a New Parasitic B Chromosome Variant Is Facilitated by High Gene Flow. *Plos One*, 8(12), e83712.
- Mantovani M, Santos ALD, Mestriner CA, Moreira-Filho O (2000) Accentuated polymorphism of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): tools for understanding karyotypic evolution. *Genetica*, 109(3):161-168.
- Mantovani M, Abel LDSA, Moreira-Filho O (2005) Conserved 5S and variable 45S rDNA chromosomal localization revealed by *FISH* in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Genetica*, 123:211-216.
- Marchal JA, Acosta MJ, Nietzel H, Sperling K, Bullejos M, Guardia RD, Sánchez A (2004) X chromosome painting in *Microtus*: origin and evolution of the giant sex chromosomes. *Chromosome Research*, 12(8):767-776.
- Martins C, Galetti Jr. PM (1998) Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). *Chromosome Res*, 7:363-367.
- Martins CCC, Diniz D, Sobrinho-Scudeler PE, Foresti F, Campos LAO, Costa MA (2013) Investigation of *Partamona helleri* (Apidae, Meliponini) B chromosome origin. An approach by microdissection and whole chromosome painting. *Apidologie*, 44(1):75-81.
- Martins NF, Bertollo LAC, Troy WP, Feldberg E, Souza FCV, Cioffi MB (2013) Differentiation and evolutionary relationships in *Erythrinus erythrinus* (Characiformes, Erythrinidae): comparative chromosome mapping of repetitive sequences. *Rev Fish Biol Fish*, 1-9, doi:10.1007/s11160-012-9292-4.
- Mayr E (1977) Darwin and natural selection: how Darwin may have discovered his highly unconventional theory. *American scientist*, 65(3):321-327.

- McAllister BF, Werren JH (1997) Hybrid origin of a B chromosome (PSR) in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. *Chromosoma*, 106:243-253.
- Mestriner CA, Galetti Jr. PM, Valentini SR, Ruiz IRG, Abel LDS, Moreira-Filho O, Camacho JPM (2000) Structural and functional evidence that a B chromosome in the characid fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome. *Heredity*, 85:1-9.
- Meltzer PS, Guan XY, Burgess A, Trent JM (1992) Rapid generation of region specific probes by chromosome microdissection and their application. *Nature Genetics*, 1:24-28.
- Milhomem SS, Scacchetti PC, Pieczarka JC, Ferguson-Smith MA, Pansonato-Alves JC, O'Brien PC, Nagamachi CY (2013) Are NORs Always Located on Homeologous Chromosomes? A FISH Investigation with rDNA and Whole Chromosome Probes in *Gymnotus* Fishes (Gymnotiformes). *PloS One*, 8(2):e55608.
- Mizoguchi SMHN, Martins-Santos IC (1998) Cytogenetic and morphometric differences in populations of "*Astyanax scabripinnis*" (Pisces, Characidae) from Maringá region, PR, Brazil. *Genet Mol Biol*, 21(1).
- Molina WF, Galetti Jr. PM (2002) Robertsonian rearrangements in the reef fish *Chromis* (Perciformes, Pomacentridae) involving chromosomes bearing 5S rRNA genes. *Genet Mol Biol*, 25(4):373-377.
- Moreira-Filho O, Bertollo LAC (1991) *Astyanax scabripinnis* (Pisces Characidae): a species complex. *Rev Bras Genét*, 14(2):331-357.
- Moreira-Filho O, Fenocchio AS, Pastori MC, Bertollo LAC (2001) Occurrence of a metacentric macrochromosome B in different species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae, Tetragonopterinae). *Cytologia*, 66:59-64.

- Moreira-Filho O, Galetti JR. PM, Bertollo LAC (2004) B chromosomes in the fish *Astyanax scabripinnis* (Characidae, Tetragonopterinae): An overview in natural populations. *Cytogenet Genome Res*, 106:230-234.
- Morelli S, Bertollo LAC, Foresti F, Moreira-Filho O, Toledo-Filho AS (1983) Cytogenetic considerations on the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). I Karyotypic variability. *Caryologia*, 36:235-244.
- Mühlmann-Díaz MC, Bedford JS (1995) Comparison of gamma-ray-induced chromosome ring and inversion frequencies. *Radiation research*, 143(2):175-180.
- Nagoda N, Fukuda A, Nakashima Y, Matsuo Y (2005) Molecular characterization and evolution of the repeating units of histone genes in *Drosophila americana*: coexistence of quartet and quintet units in a genome. *Insect Molecular Biology*, 14(6):713-717.
- Nelson JS (2006) *Fishes of the world*, John Wiley e Sons, New York, p.601.
- Néo DM, Bertollo LAC, Moreira-Filho O (2000) Morphological differentiation and possible origin of B chromosomes in natural Brazilian population of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Genetica*, 108:211-215.
- Neusser M, Münchb M, Anzenbergerb G, Müllera S (2005) Investigation of marmoset hybrids (*Cebuella pygmaea* × *Callithrix jacchus*) and related Callitrichinae (Platyrrhini) by crossspecies chromosome painting and comparative genomic hybridization. *Cytogenet Genome Res*, 108:191-196.
- Oliveira C, Almeida-Toledo LF, Foresti F, Toledo-Filho SA (1988) Supernumerary chromosomes, Robertsonian rearrangements and multiple NORs in *Corydoras aeneus* (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae). *Caryologia*, 41:227-236.

- Oliveira C, Wright JM (1998) Molecular cytogenetic analysis of heterochromatin in the chromosomes of tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae). *Chromosome Research*, 6(3):205-211.
- Oliveira C, Almeida-Toledo L, Foresti F (2006) Karyotypic Evolution em Neotropical Fishes. In (Pisano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F, Kapoor BG. Eds) *Fish Citogenetics*. USA, Science, p.111-152.
- Oliveira C, Foresti F, Hilsdorf AWS (2009) Genetics of neotropical fish: from chromosomes to populations. *Fish Physiol Biochemist*, 35(1):81-100.
- Oliveira NL, Cabral-de-Mello DC, Rocha MF, Loreto V, Martins C, Moura RC (2011) Chromosomal mapping of rDNAs and H3 histone sequences in the grasshopper *Rhammatocerus brasiliensis* (Acrididae, Gomphocerinae): extensive chromosomal dispersion and co-localization of 5S rDNA/H3 histone clusters in the A complement and B chromosome. *Molecular Cytogenetics*, 4:24.
- Ohno S (1970) The enormous diversity in genome sizes of fish as a reflection of nature's extensive experiments with gene duplication. *Transactions of the American Fisheries Society*, 99(1):120-130.
- Ozouf-Costaz C, Brandt J, Körting C, Pisano E, Bonillo C, Coutanceau JP, Volff JN (2004) Genome dynamics and chromosomal localization of the non-LTR retrotransposons *Rex1* and *Rex3* in Antarctic fish. *Antarctic Science*, 16:51-57.
- Pansonato-Alves JC, Serrano EA, Utsunomia R, Scacchetti PC, Oliveira C, Foresti F (2013a) Mapping five repetitive DNA classes in sympatric species of *Hypostomus* (Teleostei: Siluriformes: Loricariidae): analysis of chromosomal variability. *Rev Fish Biol Fish*, 1-13, doi:10.1007/s11160-013-9303-0.
- Pansonato-Alves JC, Hilsdorf AWS, Utsunomia R, Silva DMZA, Oliveira C, Foresti F (2013b) Chromosomal Mapping of Repetitive DNA and Cytochrome C Oxidase I

- Sequence Analysis Reveal Differentiation among Sympatric Samples of *Astyanax fasciatus* (Characiformes, Characidae). Cytogenet genome res, doi:10.1159/000354885.
- Pazza R, Kavalco KF, Bertollo LAC (2006) Chromosome polymorphism in *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae). Karyotype analysis, Ag-NORs and mapping of the 18S and 5S ribosomal genes in sympatric karyotypes and their possible hybrid forms. Cytogenetic and Genome Research, 112(3-4):313-319.
- Pendás AM, Moran P, Freije JP, Garcia-Vazquez E (1994) Chromosomal mapping and nucleotide sequence of two tandem repeats of Atlantic salmon 5 S rDNA. Cytogenet Cell Genet, 67:31-36.
- Penitente M, Voltolin TA, Senhorini JA, Bortolozzi J, Foresti F, Porto-Foresti F (2013) Transmission rate variation among three B chromosome variants in the fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae). An Acad Bras Ciênc, 85(4):1371-1377.
- Penitente M, Voltolin TA, Foresti F, Porto-Foresti F (*in prep.*) B chromomes: a review in neotropical fishes.
- Perfectti F, Werren JH (2001) The interspecific origin of B chromosomes: experimental evidence. Evolution, 55(5):1069-1073.
- Pinkel D, Straume T, Gray JW (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. Proc Natl Acad Sci, 83:2934-2938.
- Porto-Foresti F, Oliveira C, Maistro EL, Foresti F (1997) Estimated frequency of B-chromosomes and population density of *Astyanax scabripinnis paranae* in a small stream. Rev Bras Genét, 20:377-380.
- Porto-Foresti F, Oliveira C, Tabata YA, Rigolino MG, Foresti F (2002) NORs inheritance analysis in crossings including individuals from two stocks of rainbow

- trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Hereditas*, 136:227-230.
- Ramakrishnan V, Finch JT, Graziano V, Lee PL, Sweet RM (1993) Crystal structure of globular domain of histone H5 and its implications for nucleosome binding. *Nature*, 362(6417):219-223, doi:10.1038/362219a0.
- Reis RE, Kullander SO, Ferraris C (2003) *Check list of freshwater fishes of South and Central America*. Porto Alegre: Edipucrs, p.742.
- Reeves R, Bermingham E (2006) Colonization, population expansion, and lineage turnover: phylogeography of Mesoamerican characiform fish. *Biol J Linn Soc Lond*, 88(2):235-255.
- Robles R, Figueras J, Turrión VS, Margarit C, Moya A, Varo E, Parrilla P (2004) Spanish experience in liver transplantation for hilar and peripheral cholangiocarcinoma. *Annals of surgery*, 239(2):265.
- Rosa RD, Rubert M, Malabarba LR, Martins-Santos IC, Giuliano-Caetano L (2009) Cytogenetic analysis of *Astyanax laticeps* (Cope, 1894)(Ostariophysi: Characidae) from the laguna dos Patos system. *Neotropical Ichthyology*, 7(4):601-605.
- Sampaio TR, Gravena W, Gouveia JG, Giuliano-Caetano L, Dias AL (2011) B Icrochromosomes in the family Curimatidae (Characiformes): mitotic and meiotic behavior. *Comp Cytogen*, 5:301-313. doi: 10.3897/CompCytogen.v5i4.1650.
- Santi-Rampazzo AP, Nishiyama PB, Ferreira PEB, Martins-Santos IC (2008) Intrapopulational polymorphism of nucleolus organizer regions in *Serrapinnus notomelas* (Characidae, Cheirodontinae) from the Paraná River. *J Fish Biol*, 72(5): 1236-1243, doi:10.1111/j.1095-8649.2007.01784.x.
- Santos NM, Ferreira-Neto M, Artoni RF, Vicari MR, Bakkali M, Oliveira C, Foresti F (2012) A comparative structural cytogenetic study in three allopatric populations of *Astyanax scabripinnis* (Teleostei: Characidae). *Zoologia (Curitiba)*, 29(2):159-166.

- Santos LPD, Castro JP, Francisco CMD, Vicari MR, Almeida MCD, Goll LG, Gusso L, Morelli S, Artoni RF (2013) Cytogenetic analysis in the neotropical fish *Astyanax goyacensis* Eigenmann, 1908 (Characidae, incertae sedis): karyotype description and occurrence of B microchromosomes. *Molecular Cytogenetics*, 6(1):1-10.
- Senger G, Ludecke HJ, Horsthemke B, Claussen U (1990) Microdissection of banded human chromosomes. *Hum Genet*, 84:507-511.
- Siljak-Yakovlev S, Pustahija F, Vicic V, Robin O (2014) Molecular Cytogenetics (*FISH* and Fluorochrome Banding): Resolving Species Relationships and Genome Organization. *In Molecular Plant Taxonomy*, p.309-323. Humana Press.
- Silva DMZA, Pansonato-Alves JC, Utsunomia R, Daniel SN, Hashimoto DT, Oliveira C, Porto-Foresti F, Foresti F (2013) Chromosomal organization of repetitive DNA sequences in *Astyanax bockmanni* (Teleostei, Characiformes): dispersive location, association and co-localization in the genome. *Genetica*, doi:10.1007/s10709-013-9732-7.
- Silva LLL, Giuliano-Caetano L, Dias AL (2012) Chromosome Studies of *Astyanax jacuhiensis* Cope, 1894 (Characidae) from the Tramandai River Basin, Brazil, Using in situ Hybridization with the 18S rDNA Probe, DAPI and CMA3 Staining. *Folia Biol*, 60:3-4, doi:10.3409/fb60_3-4.135-140.
- Sumner AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Expl Cell Res*, 75:304-306.
- Telenius H, Carter NP, Bebb CE, Nordenskyold M; Ponder BA, Tunnacliffe J (1992) Degenerate Oligonucleotide-Primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerated primer. *Genomics*, 8:718-725.

- Teruel M, Cabrero J, Perfectti F, Camacho JPM (2010) B chromosome ancestry revealed by histone genes in the migratory locust. *Chromosoma*, 119(2):217-225. doi:10.1007/s00412-009-0251-3.
- Trask BJ (1991) Fluorescence in situ hybridization: applications in cytogenetics and gene mapping. *Trends Genet*, 7:149-154.
- Trifonov VA, Dementyeva PV, Larkin DM, O'Brien PC, Perelman PL, Yang F, Graphodatsky AS (2013) Transcription of a protein-coding gene on B chromosomes of the Siberian roe deer (*Capreolus pygargus*). *BMC biology*, 11(1):1-11, doi:0.1186/1741-7007-11-90.
- Valente GT, Mazzuchelli J, Ferreira IA, Poletto AB, Fantinatti BEA, Martins C (2011) Cytogenetic Mapping of the Retroelements *Rex1*, *Rex3* and *Rex6* among Cichlid Fish: New Insights on the Chromosomal Distribution of Transposable Elements. *Cytogenet Genome Res*, 133:34-42, doi:10.1159/000322888.
- Vari RP (1998) Higher level phylogenetic concepts within Characiforms (Ostariophysi), a historical review, p.111-122.
- Vari RP, Castro RMC (2007) New species of *Astyanax* (Ostariophysi: Characiformes: Characidae) from the Upper Rio Paraná System, Brazil. *Copeia*, 1:150-162.
- Vicari MR, Noleto RB, Artoni RF, Moreira-Filho O, Bertollo LAC (2008) Comparative cytogenetics among species of the *Astyanax scabripinnis* complex. *Evolutionary and biogeographical inferences. Genetics and Molecular Biology*, 31:173-179.
- Vicari MR, Nogaroto V, Noleto RB, Cestari MM, Cioffi MB, Almeida MC, Moreira-Filho O, Bertollo LAC, Artoni RF (2010) Satellite DNA and chromosomes in Neotropical fishes: methods, applications and perspectives. *Journal of fish biology*, 76(5):1094-1116.

- Vicari MR, Pistune HFM, Castro JP, Almeida MC, Bertollo LAC, Moreira-Filho O, Camacho JPM, Artoni RF (2011) New insights on the origin of B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* obtained by chromosome painting and FISH. *Genetica*, 139:1073-1081, doi:10.1007/s10709-011-9611-z.
- Vicente VE, Jesus CM, Moreira-Filho O (2001) Chromosomal localization of 5S and 18S rDNA genes in three *Parodon* species (Pisces, Parodontidae). *Caryologia*, 4:365-369.
- Volff JN, Körting C, Sweeney K, Scharl M (1999) The non-LTR retrotransposon *Rex3* from the fish *Xiphophorus* is widespread among teleosts. *Mol Biol Evol*, 16:1427-1438.
- Volff JN, Körting C, Scharl M (2000) Multiples lineages of the non-LTR retrotransposon *Rex1* with varying success in invading fish genomes. *Mol Biol Evol*, 17:1673-1684.
- Volff JN, Körting C, Froschauer A, Sweeney K, Scharl M (2001) Non-LTR retrotransposons encoding a restriction enzyme-like endonuclease in vertebrates. *J Mol Evol*, 52(4):351-360.
- Voltolin TA, Senhorini JA, Oliveira C, Foresti F, Bortolozzi J, Porto-Foresti F (2010) B-chromosome frequency stability in *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetica*, doi:10.1007/s10709-009-9420-9.
- Voltolin TA, Pansonato-Alves JC, Senhorini JA, Foresti F, Camacho JPM, Porto-Foresti F (2013). Common Descent of B Chromosomes in Two Species of the Fish Genus *Prochilodus* (Characiformes, Prochilodontidae). *Cytogenet Genome Res*, doi:10.1159/000354987.
- Vujosevic M, Jovanovic V, Blagojevic J (2013) Polyploidy and B chromosomes in *Alium flavum* from Serbia. *Archives of Biological Sciences*, 65(1):23-32.

- Zanata AM, Camelier P (2009) *Astyanax vermillion* and *Astyanax burgerai*: new characid fishes (Ostariophysi: Characiformes) from Northeastern Bahia, Brazil. *Neotrop Ichthyol*, 7(2):175-184, doi:10.1590/S1679-62252009000200007.
- Zhang L, Bao Z, Wang S, Huang X, Hu J (2007) Chromosome rearrangements in Pectinidae (Bivalvia: Pteriomorphia) implied based on chromosomal localization of histone H3 gene in four scallops. *Genetica*, 130(2):193-198.
- Ziegler CG, Lamatsch DK, Steinlein C, Engel W, Scharl M, Schmid M (2003) The giant B chromosome of the cyprinid fish *Alburnus alburnus* harbours a retrotransposon derived repetitive DNA sequence. *Chromosome Research*, 11:23-35.