

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS - CAMPUS BAURU
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

MARIANA CANOVA DE OLIVEIRA

**ANÁLISE DA PRESENÇA DE SISTEMAS SEXUAIS HETEROMÓRFICOS E A
INFLUÊNCIA DO CROMOSSOMO B NA DETERMINAÇÃO SEXUAL EM
Psalidodon paranae (CHARACIFORMES, CHARACIDAE).**

Bauru

2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS - CAMPUS BAURU
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

MARIANA CANOVA DE OLIVEIRA

**ANÁLISE DA PRESENÇA DE SISTEMAS SEXUAIS HETEROMÓRFICOS E
A INFLUÊNCIA DO CROMOSSOMO B NA DETERMINAÇÃO SEXUAL EM
Psalidodon paranae (CHARACIFORMES, CHARACIDAE).**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Universidade Estadual Paulista (UNESP), como
parte das exigências para a obtenção do título de
bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Utsunomia

Co - Orientador: Prof. Dr. Fábio Porto

Bauru

2024

**AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE
TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO,
PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE**

D418a

de Oliveira, Mariana Canova

ANÁLISE DA PRESENÇA DE SISTEMAS SEXUAIS
HETEROMÓRFICOS E O IMPACTO DO CROMOSSOMO B NA
DETERMINAÇÃO SEXUAL EM *Psolidodon paranae* (CHARACIFORMES,
CHARACIDAE). / Mariana Canova de Oliveira. -- Bauru, 2024

16 p. : fotos, mapas

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) -
Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências, Bauru

Orientador: Ricardo Utsunomia

Coorientador: Fábio Porto Foresti

1. Ferramentas de Sexagem. 2. Genômica do Sexo. 3. Reversão sexual. I.

Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Dados fornecidos pelo autor(a).

MARIANA CANOVA DE OLIVEIRA

**ANÁLISE DA PRESENÇA DE SISTEMAS SEXUAIS HETEROMÓRFICOS E
O IMPACTO DO CROMOSSOMO B NA DETERMINAÇÃO SEXUAL EM *Psalidodon
paranae* (CHARACIFORMES, CHARACIDAE).**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Universidade Estadual Paulista (UNESP), como
parte das exigências para a obtenção do título de
bacharel em Ciências Biológicas.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ricardo Utsunomia

(Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências,
Bauru, SP)

Dr. Caio Augusto Gomes Goes

(Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências,
Bauru, SP)

Me. Natália dos Santos

(Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências,
Bauru, SP)

Bauru

2024

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Faculdade de Ciências da Universidade Estadual Paulista, campus Bauru e ao Departamento de Ciências Biológicas, pelas oportunidades que me permitiram chegar até aqui.

Às instituições que contribuíram na realização deste trabalho, em especial ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio concedido.

Aos professores Fábio Porto Foresti e Ricardo Utsunomia pela oportunidade de integrar o Laboratório de Genômica e Conservação de Peixes (LAGENPE), e por toda a orientação que tornou possível este trabalho.

Aos integrantes do LAGENPE: Caio Goes; Rodrigo Zeni; Amanda Bueno; Natália Santos; Henrique Stornioli e Hélio Gomes, por toda a paciência, compreensão, gentileza e por sempre estarem dispostos a me ajudar nas pequenas e grandes coisas.

Às minhas amigas Auany e Letícia, por terem me acompanhado nos últimos quatro anos e terem feito a experiência da graduação muito mais leve e divertida. Que eu possa seguir dividindo meus dias com vocês por muito mais tempo.

Às minhas amigas Agnes e Débora, por toda a companhia, compreensão e aconselhamento desde a minha chegada em Bauru. Obrigada por estarem presentes mesmo com toda a distância.

Ao meu namorado Bruno, que foi essencial nessa jornada. Obrigada por ter estado presente, me amando e motivando nos dias bons e ruins.

Aos meus pais Mara e Luís, por terem sido minha base, confiado e acreditado em mim e por sempre estarem por perto quando precisei. Essa conquista é de vocês também.

À minha irmã, que sempre foi minha referência. Obrigada pelo apoio e carinho de uma vida inteira.

RESUMO

Os cromossomos B são elementos extras que constituem o genoma dos eucariotos, juntamente com os genes essenciais. Podem ser chamados também de dispensáveis por não apresentarem função bem definida, utilizando maquinaria celular dos indivíduos portadores para processos de herança e manutenção próprios. No entanto, estudos propostos anteriores sugeriram uma associação entre a presença de cromossomos B e a determinação do sexo em indivíduos da espécie *Psalidodon paranae*. Esses estudos apontaram diferença significativa na frequência de cromossomos B entre machos e fêmeas. Além disso, análises genômicas preliminares nesta espécie revelaram a existência de um sistema de determinação sexual do tipo XX/XY que jamais havia sido descrito em nível citogenético. Desse modo, o presente projeto utilizou métodos moleculares e genômicos para verificar se, de fato, existe um sistema de cromossomos sexuais diferenciados em *P. paranae*, o que seria a primeira descrição de um sistema XX/XY em peixes Characidae. Além disso, este trabalho buscou determinar se os cromossomos B influenciam na diferenciação sexual dos indivíduos e se há associação entre a presença desses elementos e a proporção sexual na população. Ao final deste projeto, foi possível confirmar a existência de um sistema sexual XX/XY na espécie, embora não tenha sido possível identificar o par de cromossomos sexuais. No entanto, foi evidenciada a influência do cromossomo B na determinação sexual de fêmeas, sendo responsável pelo fenômeno de reversão sexual.

Palavras-chave: Ferramentas de Sexagem; Genômica do Sexo; Reversão sexual.

ABSTRACT

B chromosomes are extra elements that make up the genome of eukaryotes, along with essential genes. They can also be called dispensable because they do not have a well-defined function, using cellular machinery from carrier individuals for their own inheritance and maintenance processes. However, previous proposed studies have suggested an association between the presence of B chromosomes and sex determination in individuals of the species *Psalidodon paranae*. These studies showed a significant difference in the frequency of B chromosomes between males and females. Furthermore, preliminary genomic analyzes in this species revealed the existence of an XX/XY sex determination system that had never been described at the cytogenetic level. Therefore, the present project used molecular and genomic methods to verify whether, in fact, there is a system of differentiated sex chromosomes in *P. paranae*, which would be the first description of an XX/XY system in Characidae fish. Furthermore, this work sought to determine whether B chromosomes influence the sexual differentiation of individuals and whether there is an association between the presence of these elements and the sex ratio in the population. At the end of this project, it was possible to confirm the existence of an XX/XY sexual system in the species, although it was not possible to identify the pair of sexual chromosomes. However, the influence of the B chromosome on the sexual determination of females was evidenced, being responsible for the phenomenon of sexual reversal.

Keywords: Sexing Tools; Sex Genomics; Sexual reversal.

Sumário

1. Introdução	1
1.1 Aspectos gerais de cromossomos B.....	1
1.2 Relação entre Cromossomos Sexuais e Cromossomos B.....	2
1.3 Cromossomos B em peixes, com enfoque na espécie <i>Psalidodon paranae</i>	3
2. Objetivos	4
3. Materiais e Métodos	5
3.1 Obtenção das amostras e local de coleta.....	5
3.2 Obtenção de cromossomos metafásicos.....	5
3.3 Coloração convencional com <i>Giemsa</i>	6
3.4 Bandamento C.....	6
3.5 Mapeamento de DNAs satélites por hibridação <i>in situ</i> fluorescente (FISH).....	6
3.6 Extração de DNA.....	7
3.7 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	7
4. Resultados	8
4.1 Montagem de Cariótipos.....	8
4.2 Mapeamento de DNAs satélites por hibridação <i>in situ</i> fluorescente (FISH).....	9
4.3 Aplicação de <i>Primers</i> sexo específico.....	9
5. Discussão	10
6. Conclusões	12
Referências	12

1. Introdução

1.1 Aspectos gerais de cromossomos B

O genoma de alguns eucariotos é composto não apenas por um conjunto de genes essenciais aos indivíduos, mas também por elementos dispensáveis que não seguem o padrão de segregação mendeliano, o que pode levar à sua acumulação ou extinção em populações naturais (Camacho *et al.* 2000). Entre estes elementos estão os cromossomos B, definidos como elementos genômicos supranumerários, encontrados em seres eucariontes (Makunin 2014). Esses cromossomos são considerados dispensáveis por não apresentarem função definida, estando presentes em apenas alguns indivíduos de determinadas populações de algumas espécies (Camacho *et al.* 2000). Cromossomos B aproveitam-se da maquinaria celular do indivíduo para mecanismos de herança e manutenção próprios (Camacho *et al.* 2000), sendo considerados parasitas intragenômicos (Houben *et al.* 2017).

Os cromossomos B foram observados pela primeira vez por Wilson (1907) em hemípteros do gênero *Metapodius*. Posteriormente, esses elementos foram encontrados em outros organismos como milho (Kuwada 1915) e centeio (Gotoh 1924). Atualmente, estima-se que os cromossomos B ocorram nos genomas de cerca de 15% dos eucariotos (Beukeboom 1994), tendo sido reportados em cerca de 1685 organismos, abrangendo diversos grupos como plantas, fungos e animais (Jones 2017).

Apesar da origem dos cromossomos B ainda ser incerta, existem duas hipóteses principais que guiam os estudos dessa temática. A primeira hipótese se refere à origem intraespecífica de cromossomos B, a partir de quebras cromossômicas do conjunto de cromossomos A da própria espécie (Camacho *et al.* 2000). Após a sua origem, eles tendem a seguir a sua própria história evolutiva. A segunda hipótese de surgimento é denominada origem interespecífica, por hibridização e introgressão entre espécies próximas (Silva *et al.* 2022). De forma geral, ambos os tipos de origem já foram descritos entre diferentes grupos de espécies, sendo que a forma mais usual e eficaz de se investigar este tipo de questão é comparar sequências de DNA presentes no cromossomo B, na espécie hospedeira e entre espécies próximas (Teruel *et al.* 2010; Silva *et al.* 2014; Tosta *et al.* 2015; Utsunomia *et al.* 2016; Perfectti e Warren 2001).

A distribuição e ocorrência dos cromossomos B na natureza torna esses elementos alvo de estudos em busca da compreensão acerca de sua origem e manutenção nos grupos em que se encontra presente, assim como a descrição de sua composição e caracterização estrutural. Nesse sentido, uma vez que eles tenham surgido em uma população natural, é de



amplo interesse buscar entender se eles desempenham algum tipo de função e quais os possíveis impactos nos indivíduos portadores (Jones 1995). Apesar de terem sido considerados elementos inertes por muito tempo, sabe-se que os cromossomos B usualmente possuem genes codificadores de proteínas, em conjunto com evidências de transcrição de DNA ribossômico, dentre outras influências que podem exercer, como resistência a toxinas (Miao *et al.* 1991) ou na determinação do sexo (Yoshida *et al.* 2011; Imarazene *et al.* 2021).

1.2 Relação entre Cromossomos Sexuais e Cromossomos B

As descrições sobre o desenvolvimento sexual de diversos grupos de vertebrados permitiram o estabelecimento de mecanismos distintos para a determinação do sexo, sendo eles genética e ambiental (Castro *et al.* 2019). A determinação genética pode ocorrer a partir da ação de um gene específico ou por meio de vários *loci* associados ao sexo, enquanto a determinação ambiental é regulada por fatores externos, como a temperatura da água (Castro *et al.* 2019). No entanto, em determinados organismos, uma mudança pode acontecer durante o processo de diferenciação sexual, como a inversão sexual, em que fêmeas e machos genotípicos se desenvolvem em fêmeas e machos fenotípicos (Castro *et al.* 2019).

A partir desse contexto, estudos relataram casos de algumas espécies em que o cromossomo B atua diretamente no processo de determinação sexual. Na espécie de vespas *Nasonia vitripennis*, o cromossomo B é denominado de “Razão Sexual Paterna” (do inglês, *Paternal Sex Ratio*, PSR), sendo encontrado em alguns machos da população (Werren e Stouthamer 2003). Os machos haploides dessa espécie se desenvolvem a partir de ovos não fertilizados, enquanto as fêmeas diplóides têm seu desenvolvimento a partir de ovos fertilizados. Os machos que carregam o PSR produzem espermatozoides funcionais que são perdidos durante o processo de mitose. O resultado da fecundação é um macho haploide que também possui o PSR, gerando novos ciclos de destruição do material genético do hospedeiro, sem a destruição do cromossomo supranumerário. Esse mecanismo faz com que dentro dessa espécie a proporção sexual seja mais favorável aos machos

A relação entre a presença do cromossomo B e a determinação sexual também pode ser encontrada no grupo dos peixes. Yoshida *et al.* (2011) estudaram diversas espécies de ciclídeos do Lago Vitória em que, dentro dessa diversidade, foi identificado que a espécie *Lithochromis rubripinnis* possui cromossomos B que atuam na determinação sexual dos indivíduos. Os dados obtidos mostraram que quase todas as fêmeas possuíam cromossomos B, enquanto nos machos estes elementos eram ausentes. A partir disso, experimentos envolvendo o cruzamento de machos 0B e fêmeas com diferentes números de cromossomos B (0, 1 ou 2), foram realizados a fim de se obter a proporção sexual da prole. Os cruzamentos de

fêmeas e machos 0B resultaram em uma proporção de quase 1:1 descendentes (38% de fêmeas no primeiro e 50% no segundo). Ao cruzar fêmeas +B e machos 0B, os resultados obtidos foram de 74% de fêmeas no terceiro cruzamento, 91% no quarto, 79% no quinto e 100% no sexto. Tais dados indicam que a presença de cromossomos B nas fêmeas da espécie gera proporção sexual tendenciosa a elas.

Ambos os exemplos mostram algo particularmente incomum, em espécies em que o cromossomo B exerce uma influência na determinação sexual. De forma similar, proporções distorcidas de razão sexual já foram observadas e descritas entre portadores e não portadores de cromossomos B em peixes da espécie *Psalidodon paranae*, sendo a maioria dos animais portadores destes elementos do sexo feminino (Porto-Foresti *et al.* 1997; Silva *et al.* 2014).

1.3 Cromossomos B em peixes, com enfoque na espécie *Psalidodon paranae*

Existe uma alta diversidade de cromossomos B presentes em aproximadamente 70 espécies de peixes Neotropicais (Carvalho *et al.* 2008) e que apresentam variações morfológicas e estruturais. Entre essas variações, existem as relacionadas aos tamanhos dos cromossomos, como por exemplo os macrocromossomos que são encontrados em algumas espécies do gênero *Psalidodon* (Daniel *et al.* 2012; Silva *et al.* 2014). Uma população específica da espécie *P. paranae*, coletada no córrego Cascatinha, em Botucatu, São Paulo, Brasil, possui macrocromossomos B metacêntricos, que são mitoticamente estáveis e com frequências variadas (Porto-Foresti *et al.* 1997; Silva *et al.* 2014, 2022). Um aspecto importante nesta população é que foi observado um viés significativo entre a frequência de cromossomos B, sendo encontrados em 57% das fêmeas e apenas em 8.7% dos machos (Porto-Foresti *et al.* 1997). Nesse sentido, foi possível verificar algum efeito de associação entre presença/ausência de cromossomos B e o sexo em *P. paranae*.

Os resultados acima motivaram a realização de um estudo genômico que vem sendo conduzido pelo nosso grupo, que envolve o sequenciamento completo do genoma da espécie, bem como de *pools* genômicos de indivíduos portadores e não-portadores de cromossomos B de ambos os sexos. Os resultados preliminares revelaram a existência de um sistema XX/XY de determinação sexual (Figura 1a). Além disso, também verificamos que ao comparar *pools* de DNA genômico de indivíduos com ovários (fenótipo de fêmea) portadores e não-portadores de cromossomos B, notamos a ocorrência de machos genéticos (XY) que exibem

fenótipo de fêmea (Figura 1b). É neste contexto que o presente projeto se insere, conforme será explicado abaixo.

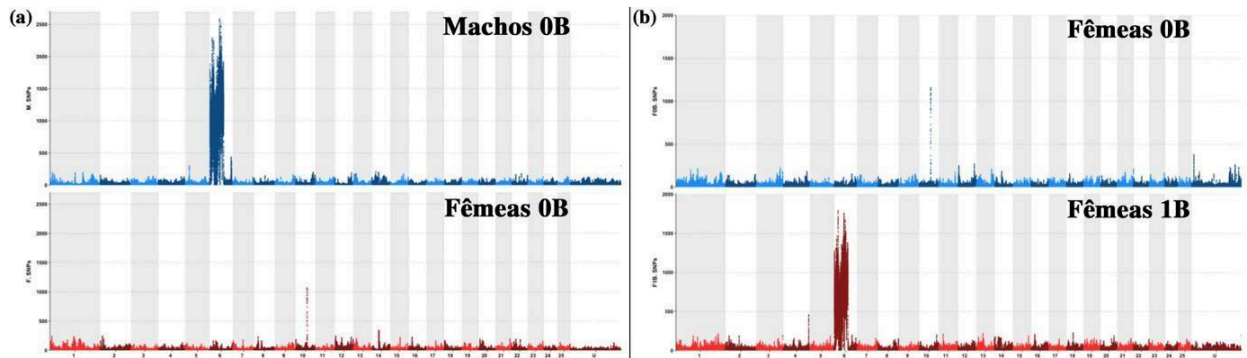


Figura 1: Manhattan plots do número de polimorfismos de base única em janelas de 100kb no genoma de *P. paranae*, usando pools de DNA genômico. Em (a), plot evidencia a ocorrência de um sistema XY, sendo que o cromossomo 6 é o cromossomo sexual heteromórfico. Em (b), plot evidencia que algumas fêmeas portadoras de cromossomos B são machos genéticos. Destaque para a diferenciação do cromossomo Y em machos, se estendendo ao longo de aproximadamente 75% do cromossomo 6.

Conforme é observado na Figura 1a, o cromossomo Y apresenta diferenciação em relação ao X em cerca de 75% do seu comprimento total, o que indica uma diferenciação em nível citogenético. Embora a presente população já tenha sido analisada em outras oportunidades (Porto-Foresti *et al.* 1997; Silva *et al.* 2014), a informação genômica de que o cromossomo B poderia causar reversão do sexo é inédita (Utsunomia *et al. in prep.*).

2. Objetivos

2.1 Objetivos gerais

O presente trabalho busca verificar se um sistema de cromossomos sexuais heteromórficos ocorre em uma população de *P. paranae* em nível citogenético, corroborando análises em escala genômica realizadas pelo nosso grupo.

2.2 Objetivos específicos

- Compreender se a presença dos cromossomos B está relacionada à determinação sexual na espécie *P. paranae*.

3. Material e Métodos

3.1 Obtenção das amostras e local de coleta

Para este estudo, espécimes de *P. paranae* foram coletados no Córrego Cascatinha (22°53'22.5"S, 48°29'22.4"W), na cidade de Botucatu, SP, que faz parte da Bacia Hidrográfica do Rio Tietê. Todos os procedimentos de amostragem, manutenção e análise dos animais seguiram as regras internacionais em experimentação animal seguidas pela Universidade Estadual Paulista. Todos os exemplares foram coletados com o auxílio de puçás e armadilhas de pesca e armazenados imediatamente em tambores com oxigenação. Posteriormente, foram transportados ao Laboratório de Genética de Peixes, localizado no Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências, UNESP-Bauru, onde ficaram alocados em aquários aerados e mantidos até o início dos experimentos.

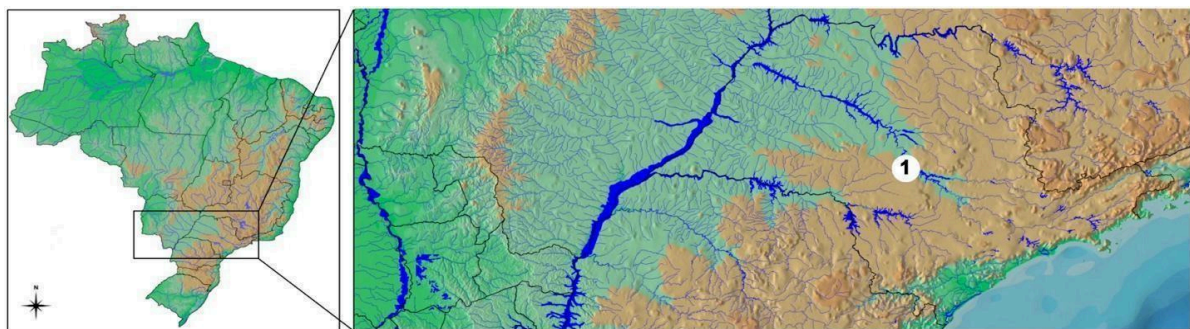


Figura 2: Mapa evidenciando a área de amostragem, com a localização do Córrego Cascatinha, na cidade de Botucatu/SP.

3.2 Obtenção de cromossomos metafásicos

Os cromossomos metafásicos foram obtidos de acordo com o protocolo proposto por Foresti *et al* (1981), com adaptações elaboradas pelo Laboratório de Genética de Peixes. Essa técnica consiste na inibição da polimerização de microtúbulos durante o processo de divisão celular, através do uso de colchicina, hipotonização das células a partir do uso de solução hipotônica (KCL 0,075M) e fixação do material com o uso do fixador Carnoy (Metanol: Ácido acético em proporção 3:1). A ordem dos procedimentos foi: 1. Injeção de colchicina 0,0125% na região peritoneal do espécime; 2. Permanência do indivíduo em aquário oxigenado por 50 min; 3. Morte induzida do animal com o anestésico benzocaína, seguido da retirada do rim anterior que foi transferido para uma Placa de Petri com 7mL de solução hipotônica (KCL 0,075M); 4. Dissociação do material com pinça e seringa; 5. Transferência do material para tubo de centrífuga, mantendo a solução em 37°C por 21 minutos; 6. Retirada da estufa e adição de 7 gotas de fixador Carnoy gelado (metanol e ácido acético em proporção 3:1); 7.



Adição de 6mL de fixador e mistura da suspensão celular; 8. Centrifugação da solução em 900rpm por 10 minutos; 9. Repetição dos passos 7 e 8 uma vez, no mínimo, a depender da qualidade da suspensão; 10. Diluição do material final em 300uL de fixador e armazenamento em tubos de 1,5 mL.

Na etapa de indução da morte, cada indivíduo teve o sexo identificado a partir da observação das gônadas em microscópio óptico. Além disso, fragmentos de tecido muscular foram coletados e fixados em etanol 100% para análises moleculares posteriores.

3.3 Coloração convencional com *Giemsa*

Após a obtenção das suspensões celulares contendo os cromossomos metafásicos mitóticos, as lâminas, previamente limpas e secas, foram pingadas com as preparações. Após secas, as lâminas foram coradas com solução de Giemsa a 5% em tampão fosfato (pH 6,7) por 15 minutos.

3.4 Bandamento C

Blocos heterocromáticos podem indicar diferenças entre cromossomos homólogos sexuais, em que a perda ou o ganho de heterocromatina são as principais causas de diferenciação entre esses cromossomos (Crepaldi, 2019). Além disso, os cromossomos B são altamente heterocromáticos (Stornioli, 2021), fazendo com que a técnica de Bandamento C seja de importante execução. A localização da heterocromatina constitutiva foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Sumner (1972), com algumas modificações feitas pelo Laboratório de Genômica e Conservação de Peixes (LAGENPE). Essa técnica envolveu os seguintes passos: 1. Hidrólise das lâminas em HCL 0,2N à temperatura ambiente por 30 minutos, seguido da lavagem em água destilada; 2. Passagem da lâmina em uma solução de Ba(OH)₂ por 15 segundos, sendo lavada novamente em água destilada; 3. Lavagem em HCl 1N a 60°C e, em seguida, em água destilada; 4. incubação da lâmina em 2x SSC (pH = 6,8) a 60°C por 20 minutos; 5. Coloração por 30 minutos com solução de Giemsa a 5% em tampão fosfato (PH=6,7).

3.5 Mapeamento de DNAs satélites por hibridação *in situ* fluorescente (FISH)

Considerando que cromossomos sexuais tendem a acumular sequências repetitivas ao longo do seu processo evolutivo, devido à restrição de recombinação nas regiões adjacentes ao gene que determina o sexo, mapeamos os DNAs satélites isolados por Silva *et al.* (2017), considerando apenas os indivíduos que não portam cromossomos B, uma vez que os portadores podem apresentar influência em sua determinação sexual. Os *primers* isolados previamente no estudo supracitado estão disponíveis em nosso laboratório e foram utilizados

para a síntese de sondas em reações de PCR com nucleotídeos modificados, como a digoxigenina-11-dUTP. Posteriormente, aplicamos a técnica de FISH, em que foi utilizado como marcador citogenético o satDNA As51, por ser o mais abundante na espécie e por também estar localizado, comumente, em regiões de heterocromatina subtelomérica (Goes *et al.* 2022). Essa técnica foi baseada nos procedimentos adotados por Pinkel *et al.* (1986), com modificações implementadas pelo Laboratório de Genômica e Conservação de Peixes, as seguintes etapas foram seguidas: 1. Incubação das lâminas em solução de PBS 1X por 5 minutos em temperatura ambiente; 2. Desidratação das lâminas em série alcoólica gelada (70%, 85% e 100%) por 3 minutos cada; 3. Desnaturação da lâmina em formamida 70% em 2xSSC por 3 minutos e, em seguida, desidratação em série alcoólica; 4. Simultaneamente, preparação do mix de hibridação (200 ng de sonda, 10% de sulfato dextrano, 50% de formamida e 2xSSC) e incubação por 10 minutos a 95°C; 5. Aplicação de 15 µL do mix de hibridação sobre as lâminas desnaturadas, sendo cobertas com lamínula de vidro para incubação em câmara úmida a 37°C durante a noite; 6. Remoção das lamínulas e lavagem em 0,4x SSC/0,3% Triton por 5 minutos a 73°C; 7. Bloqueio em tampão de NFDM 5%/4xSSC por 10 minutos em temperatura ambiente; 8. Incubação das lâminas com 100µL de NFDM/1% de avidina-FITC/1% de antidigoxigenina-rodamina por 1 hora em temperatura ambiente; 9. Lavagem 3 vezes em 4xSSC/0,5% Triton por 3 minutos cada; 10. Desidratação das lâminas em série alcoólica e secagem. 11. Coloração dos cromossomos com DAPI e análise de lâminas em fotomicroscópio óptico. Fotos das metáfases foram registradas.

3.6 Extração de DNA

O DNA foi extraído a partir dos fragmentos de tecido muscular dos indivíduos de cada sexo, com auxílio do Kit comercial “Invitrogen DNA Purification Kit - Thermo Fisher Scientific”, seguindo o protocolo estabelecido pelo fabricante.

3.7 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Os *primers* sexo específicos utilizados para esta técnica foram elaborados pelo nosso grupo de pesquisa (Utsunomia *et al, in prep*), baseando-se no genoma a nível cromossômico da espécie, para genotipar os indivíduos. Esses *primers* possibilitaram a observação de amplicons de 304 pb (relacionado ao alelo do cromossomo X) e 245 pb (relacionado ao alelo do cromossomo Y). Os *primers* utilizados foram: Ppar_Xinsert_F 5' AGTGGCTCCAAGGTTCAAGTTA 3' e Ppar_Xinsert_R 5' CTCCTTTAACATTGGTATTGGAACA 3'. A reação de PCR foi realizada com os seguintes

reagentes: 10 mM Buffer, 7 mM MgCl₂, 0,12 mM dNTPs, 1 pmol de *Primer F* e *Primer R*, 0,04 U/μl de Taq DNA polimerase (Invitrogen™ Platinum™) e 2 ng de DNA molde. Essa etapa foi realizada em um ProFlex PCR System (Applied Biosystems), de acordo com os seguintes parâmetros de ciclagem: desnaturação inicial a 95° C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 95° C por 20 segundos; 54° C por 15 segundos; 72° C por 18 segundos, com extensão final a 72° C por 14 minutos. A qualidade das ampliações realizadas foram checadas em gel de agarose a 2% corado com *GelRed* e *Blue Juice*. Para a visualização dos resultados, foi utilizado um transiluminador e as imagens foram obtidas com uma câmera OLYMPUS C 5060.

4. Resultados

4.1 Montagem de Cariótipos

A partir da obtenção de cromossomos metafásicos e da aplicação da técnica de Bandamento-C, foi possível a elaboração de cariótipos para as fêmeas 0B, machos 0B, fêmeas 1B e machos 1B, como pode ser visto na Figura 3.

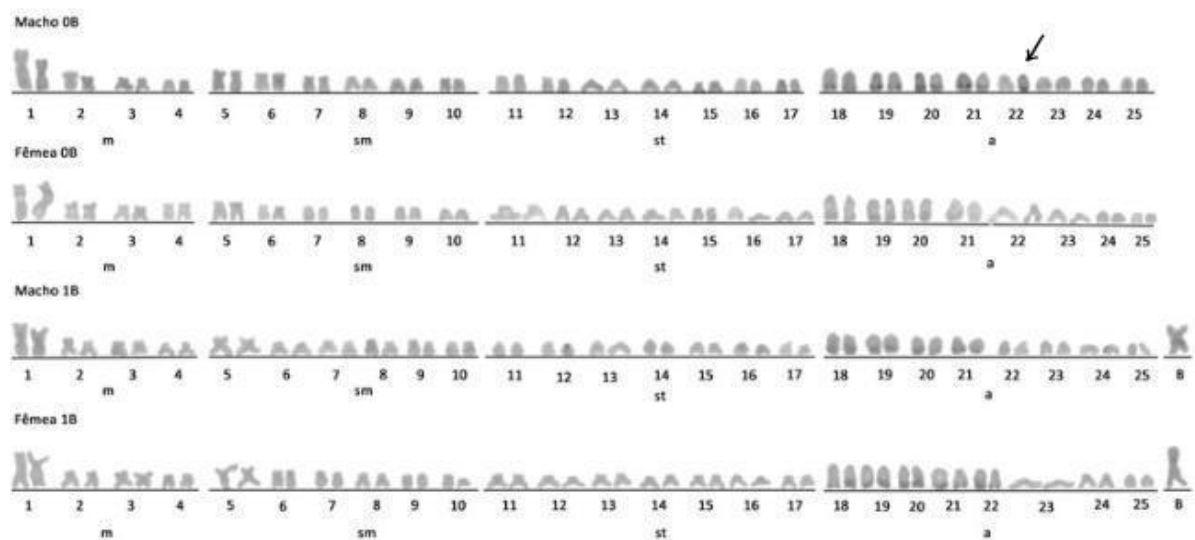


Figura 3: Cariótipos de machos e fêmeas, portadores e não portadores de cromossomos B. A partir dos cariótipos, é possível observar que o par 22 do conjunto de machos 0B, indicado pela seta, apresenta polimorfismo que não está presente nos demais grupos.

A montagem dos cariótipos corroborou a localização terminal de heterocromatina constitutiva, presente em cromossomos acrocêntricos, o que pode ser visualizado em todos os grupos. Além disso, foi possível observar um polimorfismo exclusivamente no grupo de

machos 0B, em que o par 22 apresenta apenas um cromossomo com heterocromatina constitutiva.

4.2 Mapeamento de DNAs satélites por hibridação *in situ* fluorescente (FISH)

A partir dos resultados obtidos na etapa anterior, foi aplicada a técnica de FISH para machos e fêmeas não portadores de cromossomos B, buscando encontrar o mesmo polimorfismo.

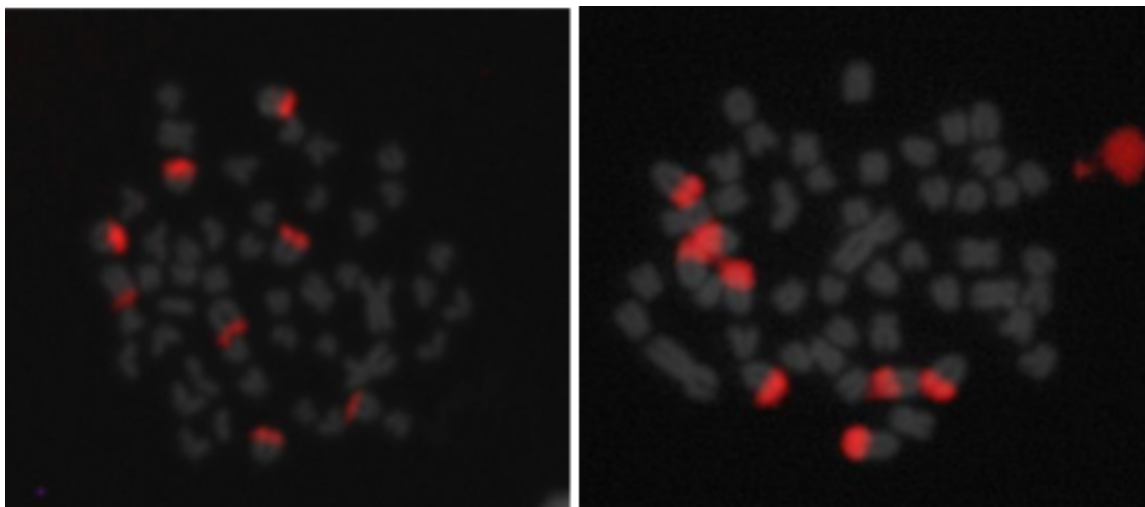


Figura 4: Técnica de FISH aplicada para indivíduos não portadores de cromossomos B. Os machos 0B apresentaram 8 marcações em regiões terminais de cromossomos acrocêntricos (à esquerda). Em fêmeas 0B também é possível observar as mesmas 8 marcações em regiões terminais de cromossomos acrocêntricos (à direita).

Analisando os resultados acima, é possível observar que tanto fêmeas quanto machos apresentaram 8 marcações, localizadas em regiões terminais de cromossomos acrocêntricos.

4.3 Aplicação de *Primers* sexo específico

Após a aplicação dos *primers* sexo específicos em reações de PCR, foram obtidos novos resultados. As fêmeas não portadoras de cromossomos B apresentaram uma única banda, o que indica um sistema sexual XX (Figura 5), enquanto os machos não portadores apresentaram duas bandas, indicando sistema sexual XY (Figura 5). Em relação aos indivíduos portadores de cromossomos B, os resultados são diferentes. As fêmeas exibiram uma ou duas bandas, indicando diferentes sistemas sexuais, podendo ser XX, XY ou YY (Figura 6), enquanto os machos, por sua vez, apresentaram uma única banda, indicando sistema sexual YY ou duas bandas, indicando sistema XY (Figura 6).

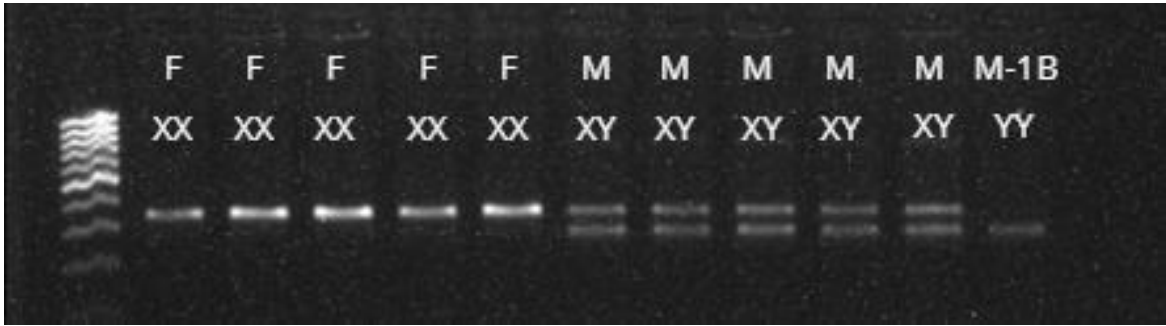


Figura 5: PCR de fêmeas e machos não portadores de cromossomos B. É possível observar que as fêmeas 0B possuem apenas uma banda, indicando sistema sexual XX, enquanto os machos 0B possuem duas bandas, indicando sistema sexual XY. A última amostra corresponde a um macho 1B, demonstrando sistema sexual YY.



Figura 6: PCR de machos e fêmeas portadores de cromossomos B. As duas primeiras amostras são controle, correspondendo a uma fêmea e a um macho 0B, respectivamente. As amostras seguintes são de indivíduos portadores de cromossomos B, em que é possível observar fêmeas com sistema sexual XX, XY, e YY, e machos com sistema sexual XY e YY.

5. Discussão

Cioffi e Bertollo (2012) sugerem que cromossomos sexuais apresentam regularmente padrões de heterocromatina distintos, refletindo processos evolutivos específicos que estão associados à diferenciação sexual, sendo comum observar polimorfismos nesses cromossomos, que, possivelmente, estão relacionados ao acúmulo de sequências repetitivas e modificações estruturais, como a expansão de regiões heterocromáticas localizadas no cromossomo Y, ou a restrição no cromossomo X.

A observação do polimorfismo encontrado no par 22 dos machos 0B, poderia apontar

um possível heteromorfismo cromossômico ligado ao sexo do tipo XX/XY. Além disso, a ausência deste polimorfismo nos machos portadores de cromossomos B poderia estar relacionada com o fato do cromossomo B promover algum tipo de reversão sexual. Conforme observado em estudos anteriores nesta mesma população, os cromossomos B apresentam um viés de ocorrência em fêmeas, indicando que os machos portadores estão passando pelo processo de reversão sexual. No entanto, nossos resultados revelam que este polimorfismo não está relacionado ao satDNA As51.

Apesar de não ter sido possível observar a ocorrência de um sistema sexual heteromórfico, foi possível confirmar, por meio de técnicas moleculares e genômicas, a existência de um sistema XX/XY, fato inédito para a espécie. Além disso, nossos dados confirmam que o cromossomo B está associado a um processo de reversão sexual. Como observado anteriormente, algumas fêmeas possuem sistema XY, o que demonstra que esses indivíduos são genotipicamente machos e fenotipicamente fêmeas. Nesse sentido, sugere-se que o cromossomo B esteja atuando no processo de reversão sexual. É possível observar ainda, a ocorrência de fêmeas e machos portadores de cromossomos B que possuem sistema YY, o que possivelmente pode estar acontecendo em decorrência de cruzamentos entre machos 0B e fêmeas 1B.

Estudos realizados anteriormente já demonstraram a relação dos cromossomos B com fêmeas de diversas espécies. Vicente *et al* (1996), em estudos com *Astyanax scabripinnis*, evidenciaram uma maior presença de cromossomos B em fêmeas, com razão sexual tendenciosa a elas. Além disso, ocorreu significativa associação entre a frequência do cromossomo B e a distorção da proporção sexual, com um número desproporcionalmente alto de machos sem cromossomos B e fêmeas com cromossomo B. Em outro estudo, conduzido por Maistro *et al* (1992), com *Astyanax scabripinnis paranae*, não foram encontrados machos portadores de cromossomos B, mas foi observado que, das fêmeas coletadas, a maior parte eram portadoras desse cromossomo extra. Em estudos posteriores, envolvendo a mesma espécie, Porto-foresti *et al* (1997), além de

demonstraram a ocorrência de cromossomos B em machos, também observaram uma diferença significativa na frequência do cromossomo B correspondendo a 57% para fêmeas e apenas 8,7% para machos. Isso indica, mais uma vez, uma forte associação dos cromossomos B com a determinação sexual de fêmeas. Dessa forma, o presente estudo corrobora com os dados apresentados.

6. Conclusões

Após a aplicação de técnicas citogenéticas, não foi possível determinar a existência de um sistema sexual heteromórfico para *P. paranae*, uma vez que os polimorfismos encontrados no Bandamento C não se confirmaram na etapa de FISH. No entanto, por meio de técnicas moleculares, foi possível observar um sistema sexual XX/XY que não havia sido descrito para a espécie até o momento. Ademais, o presente estudo possibilitou a confirmação da influência do cromossomo B na determinação sexual espécie, sendo responsável pela reversão sexual de fêmeas.

Referências

Beukeboom LW. Bewildering Bs: an impression of the 1st B-chromosome conference.

Heredity, v. 73, p.328-336, 1994

Camacho JPM, Sharbel TF, Beukeboom LW. B-chromosome evolution. **Philosophical**

Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, v.355, n.1394, p.163-178, 2000.

Carvalho R, Martins-Santos IC, Dias AI. B chromosomes: an update about their occurrence in freshwater Neotropical fishes (Teleostei). **Journal of Fish Biology**, v.72, p.1907–1932, 2008.

Castro JP, Hattori RS, Yoshinaga TT, Silva DMZA, Ruiz-Ruano FJ, Foresti F, Santos MH, Almeida MC, Moreira-filho O, Artoni RF. Differential expression of genes related to sexual determination can modify the reproductive cycle of *Astyanax scabripinnis* (Characiformes: Characidae) in B chromosome carrier individuals. **Genes**, v.10, n.11, p. 909, 2019.

Cioffi, MB.; Bertollo, LAC. Chromosomal distribution and evolution of repetitive DNAs in fish. **Repetitive DNA**, v. 7, p. 197-221, 2012.



Crepaldi, C. **Estudo da origem e evolução dos cromossomos sexuais do gênero Megaleporinus a partir de sequências repetitivas.** Tese (mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista. Rio Claro, p. 100. 2019.

Daniel SN, Hashimoto DT, Pansonato-Alves JC, Foresti F, Porto-Foresti F. Cytogenetic characterization of distinct B chromosomes in a population of the fish *Astyanax bockmanni* (Teleostei, Characiformes). **Caryologia**, v.65, n.3, p.229–233, 2012.

Foresti F, Almeida-Toledo LF, Toledo-Filho AS. Polymorphic nature of nucleolus organizer regions in fishes. **Cytogenetic and Genome Research**, v.31, p.137-144, 1981.

Gotoh K. Über die Chromosomenzahl von *Secale cereale*, L. **The Botanical Magazine**, v.38, n.453, 1924.

Houben A. B chromosomes – a matter of chromosome drive. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p.1–6, 2017.

Imarazene B, Du K, Beille S, Jouanno E, Feron R, Pan Q, Torres-Paz J, Lopez-Roques C, Castinel A, Gil L, Kuchly C, Donnadiou C, Parrinello H, Journot L, Cabau C, Zahm M, Klopp C, Pavlica T, Al-Rikabi A, Liehr T, Simanovsky SA, Bohlen J, Sember A, Perez J, Veyrunes F, Muller TD, Postlethwait JH, Schartl M, Herpin A, Rétaux S, Guiguen, Y. A supernumerary “B-sex” chromosome drives male sex determination in the Pacho’n cavefish, *Astyanax mexicanus*. **Current Biology**, v.31, n.21, p.4800-4809, 2021.

Jones RN. B chromosomes in plants. **New Phytologist**, v.131, n.4, p.411–434, 1995.

Jones RN. New species with B chromosomes discovered since 1980. **Nucleus**, v.60, n.3, p. 263–281, 2017.

Kuwada Y. Ueber die Chromosomenzahl von *Zea Mays* L. **Shokubutsugaku Zasshi**, v.29, n.342, p.83–89, 1915.

Maistro EL, Foresti F, Oliveira C. New occurrence of a macro B-chromosome in *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characiformes, Characidae). **Brazilian Journal of Genetics**, v.17, p.153–156, 1994.



Maistro EL, Foresti F, Oliveira C, Almeida-Toledo LF. Occurrence of B macro chromosomes in *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characiformes, Characidae). **Genetics**, v.87, p. 101–106, 1992.

Makunin AI, Dementyeva PV, Graphodatsky AS, Volobouev VT, Kukekova AV, Trifonov VA. Genes on B chromosomes of vertebrates. **Molecular Cytogenetics**, v.7, n.1, 2014.

Miao VP, Covert SF, VanEtten HD. A Fungal gene for antibiotic resistance on a dispensable (“B”) chromosome. **Science**, v.254, p.1773-1776, 1991.

Perfectti F, Werren JH. The interspecific origin of B chromosomes: Experimental evidence **Evolution**,v.55, n.5, p.1069–1073, 2001.

Pinkel D, Gray JW, Trask B, van den Engh G, Fuscoe J, van Dekken H. Cytogenetic analysis by in situ hybridization with fluorescently labeled nucleic acid probes. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 51, p. 151–157,1986.

Porto-Foresti F, Oliveira C, Maistro EL, Foresti F. Estimated b AU9 frequency of B-chromosomes and population density of *Astyanax scabripinnis paranae* in a small stream. **Brazilian Journal of Genetics**, v.20, p.377–380, 1997.

Silva DMZA, Castro JP, Goes CAG, Utsunomia R, Vidal MR, Nascimento CN, Lasmar LF, Paim FG, Soares LB, Oliveira C, Porto-Foresti F, Artoni RF, Foresti F. B Chromosomes in *Psalidodon scabripinnis* (Characiformes, Characidae) Species Complex. **Animals**, v.12, n.17, p.2174, 2022.

Silva DMZA, Pansonato-Alves JC, Utsunomia R, Araya-Jaime C, Ruiz-Ruano FJ, Daniel SN, Hashimoto DT, Oliveira C, Camacho JPM, Porto-foresti F, Foresti F. Delimiting the origin of a B chromosome by FISH mapping, chromosome painting and DNA sequence analysis in *Astyanax paranae* (Teleostei, Characiformes). **Plos One**, v.9, n.4, 2014.

Silva DMZA, Utsunomia R, Ruiz-Ruano FJ, Daniel SN, Porto-Foresti F, Hashimoto DT, OliveiraC, Camacho JPM. High-throughput analysis unveils a highly shared satellite DNA library among three species of fish genus *Astyanax*. **Scientific Reports**, v.7, n.1, 2017.

Stornioli, JHF; Goes, CAG; Calegari, RM; dos Santos, RZ; Giglio, LM; Foresti, F; Oliveira, C; Penitente, M; Porto-Foresti, F; Utsunomia, R. The B Chromosomes of *Prochilodus lineatus* (Teleostei, Characiformes) Are Highly Enriched in Satellite DNAs. **Cells**, 2021.

Sumner AT. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**, v.75, n.1, p.304–306, 1972.

Teruel M, Cabrero J, Perfectti F, Camacho JPM. B chromosome ancestry revealed by histone genes in the migratory locust. **Cromossoma**, v.119, n.2, p.217-225, 2010.



Tosta VC, Marthe JB, Tavares MG, Fernandes-Salomão TM, Pompolo SG, Recco-Pimentel SM, Perfectti F, Campos LAO, Camacho JPM. Possible introgression of B chromosomes between bee species (Genus *Partamona*). **Cytogenetic and Genome Research**, v.144, n.3, p.220-226, 2015.

Utsunomia R, Silva DMZA, Ruiz-Ruano FJ, Araya-Jaime C, Pansonato-Alves JC, Scacchetti PC, Hashimoto DT, Oliveira C, Trifonov VA, Porto-Foresti F, Camacho JPM, Foresti F. Uncovering the ancestry of B chromosomes in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Teleostei, Characidae). **PLoS One**, v.11, n.3, 2016.

Vicente V, Moreira-Filho O, Camacho JPM. Distortion of the sex ratio associated with the presence of a B chromosome in *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae). **Cytogenet Cell Genet** 74: 70–75. 1996.

Werren JH, Stouthamer R. PSR (Paternal Sex Ratio) chromosomes: The ultimate selfish genetic elements. **Genetica**, v.117, p.85-101, 2003.

Wilson EB. Note on The Chromosome Groups of *Metapodius* and *Banasa*. **Biological Bulletin**, v. 12, n.5. 1907.

Yoshida K, Terai Y, Mizoiri S, Aibara M, Nishihara H, Watanabe M, Kuroiwa A, Hirai H, Hirai Y, Matsuda Y, Okada N. B Chromosomes have a functional effect on female sex determination in Lake Victoria cichlid fishes. **Plos Genetics**, v.7, n.8, 2011.