

CRISTIANO NEVES DO NASCIMENTO

**ESTRUTURA CROMOSSÔMICA E CARACTERIZAÇÃO CARIOTÍPICA NO
GÊNERO *MOENKHAUSIA* EIGENMANN 1903 (CHARACIFORMES:
CHARACIDAE): OCORRÊNCIA DE CROMOSSOMOS SUPRANUMERÁRIOS**

Doutorado

Botucatu, SP
novembro de 2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS BOTUCATU
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ESTRUTURAL E FUNCIONAL

**ESTRUTURA CROMOSSÔMICA E CARACTERIZAÇÃO CARIOTÍPICA NO
GÊNERO *MOENKHAUSIA* EIGENMANN 1903 (CHARACIFORMES:
CHARACIDAE): OCORRÊNCIA DE CROMOSSOMOS SUPRANUMERÁRIOS**

**CHROMOSOMAL STRUCTURE AND KARYOTYPIC CHARACTERIZATION IN
THE GENUS *MOENKHAUSIA* EIGENMANN 1903 (CHARACIFORMES:
CHARACIDAE): OCCURRENCE OF SUPERNUMERARY CHROMOSOMES**

**ESTRUTURA CROMOSÔMICA Y CARACTERIZACIÓN CARIOTÍPICA EN EL
GÊNERO *MOENKHAUSIA* EIGENMANN 1903 (CHARACIFORMES:
CHARACIDAE): PRESENCIA DE CROMOSOMAS SUPERNUMERARIOS**

Tese apresentada aos programas:

i) Programa de Pós-graduação em Ciências
Biológicas (Zoologia), Instituto de Biociências,
Universidade Estadual Paulista, Câmpus de
Botucatu, Brasil, como parte dos requisitos para
à obtenção do título de doutor.

ii) *Programa de Doctorado en Biodiversidad y
Biología Evolutiva, Universitat de València*,
Valencia, Espanha, como parte dos requisitos à
obtenção do título de doutor.

Doutorando: Cristiano Neves do Nascimento

Orientador Brasil/UNESP: Fausto Foresti

Coorientador: Duílio Mazzoni Zerbinato de Andrade Silva

Orientador Espanha/UV: José Ignacio Lucas Lledó

Orientador Espanha/UV: Juan Antonio Balbuena Díaz-Pines

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Nascimento, Cristiano Neves do.

Estrutura cromossômica e caracterização cariotípica no gênero *Moenkhausia* Eigenmann 1903 (Characiformes: Characidae) : ocorrência de cromossomos supranumerários / Cristiano Neves do Nascimento. - Botucatu, 2023

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

Orientador: Fausto Foresti

Orientador: José Ignacio Lucas Lledó

Orientador: Juan Antonio Balbuena Díaz-Pines

Coorientador: Duílio Mazzone Zerbinato de Andrade Silva

Capes: 20402007

1. Peixe. 2. Genômica. 3. DNA. 4. Biologia do desenvolvimento. 5. Cromossomos.

Palavras-chave: *Moenkhausia*; DNA genômico; cromossomo B; cromossomos supranumerários.



Informe de la dirección de tesis para la autorización de defensa de tesis doctoral

Dr. Fausto Foresti, Dr. Juan Antonio Balbuena Díaz-Pines, y Dr. José Ignacio Lucas Lledó directores de la tesis doctoral de Cristiano Neves do Nascimento, informan favorablemente de la solicitud de defensa de la tesis doctoral con el título “**Estructura cromosómica y caracterización cariotípica en el género *Moenkhausia* Eigenmann 1903 (Characiformes: Characidae): presencia de cromosomas supernumerarios**” presentada por dicho doctorando.

Programa de doctorado en Biodiversidad y Biología Evolutiva

Paterna, 3 de julio de 2023

Firmado:

Fausto Foresti

Signat digitalment per
JOSE IGNACIO LUCAS LLEDÓ
- NIF:***6997** el dia
03/07/2023 amb un
certificat emés per
ACCVCA-120

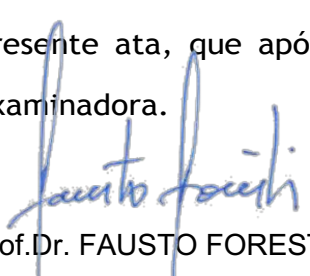
José Ignacio Lucas Lledó

Firmado digitalmente por JUAN
ANTONIO|BALBUENA|DIAZ PINES
Fecha: 2023.07.04 10:09:45
+02'00'

Juan Antonio Balbuena Díaz-Pines

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE CRISTIANO NEVES DO NASCIMENTO, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ZOOLOGIA), DO INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS - CÂMPUS DE BOTUCATU.

Aos 24 dias do mês de novembro do ano de 2023, às 10:00 horas, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de TESE DE DOUTORADO de CRISTIANO NEVES DO NASCIMENTO, intitulada **Estrutura Cromossômica e Caracterização Cariotípica no Gênero Moenkhausia Eigenmann 1903 (Characiformes: Characidae): Ocorrência de Cromossomos Supranumerários**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof.Dr. FAUSTO FORESTI (Orientador(a) - Participação Virtual) do(a) Departamento de Biologia Estrutural e Funcional / Instituto de Biociências de Botucatu UNESP, Prof. Dr. RICARDO UTSUNOMIA (Participação Virtual) do(a) Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências de Bauru -UNESP, Profa. Dra. LÚCIA GIULIANOCAETANO (Participação Virtual) do(a) Departamento de Biologia Geral / Universidade Estadual de Londrina - UEL, Prof. Dr. JOSÉ IGNACIO LUCAS LLEDÓ (Participação Virtual) do(a) Departamento de Genética / Instituto Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva, Universitat de València (UV), Valencia, Espanha, Profa. Dra. DÉBORA DINIZ BEZERRA (Participação Virtual) do(a) Departamento de Ciências Biológicas / Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), Jequié/BA. Após a exposição pelo doutorando e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, o discente recebeu o conceito final: **aprovado**. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.



Prof.Dr. FAUSTO FORESTI

À minha mãe Eunice e à minha filha Luiza, por elas, e para elas...

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos especiais ao meu orientador Dr. Fausto Foresti, pela relevante orientação e preciosos conselhos no desenrolar deste estudo.

Agradecimentos especiais aos orientadores Dr. Juan Antonio Balbuena Díaz-Pines, Dr. José Ignacio Lucas Lledó, pela recepção carinhosa, ensinamentos, conselhos e reflexões.

Ao pesquisador Dr. Duílio Zerbinato, pelo acompanhamento do projeto como coorientador, dicas, correções e pela amizade.

Aos professores Dr. Cláudio de Oliveira e Dr. José Carlos Pansonato Alves, pelos incentivos, motivação e exemplos como pesquisadores.

Ao professor Dr. Waldo Troy pelo incentivo desde a graduação, apoio e parcerias para a obtenção de êxito em coletas realizadas nos rios do interior do Mato Grosso.

Aos Professores Dr. Ricardo Utsunomia e Dr. Jonathan Pena Castro pelas valiosas contribuições no Exame Geral de Qualificação.

A todos os colegas de laboratório da Unesp e da UV que compartilharam além do café, agradáveis conversas e reflexões oportunas.

A minha esposa Tayomara pelas palavras de ânimo, carinhoso incentivo e pelo amor.

À UNEMAT, desde as bases de Iniciação Científica tão importantes para a conclusão desta tese.

À UNESP, que em continuidade, possibilitou a realização do mestrado, e do doutoramento.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 88887.643762/2021-00, pela bolsa de estudo.

Ao *Programa de Doctorado en Biodiversidad y Biología Evolutiva* e à UV pelas contribuições para a formação doutoral e celebração do Convênio de Cotutela para a defesa da tese.

Agradecimentos mais do que especiais à minha mãe Eunice, meu padrasto Gerson, meu pai Manoel, minha irmã Tatiane, meus sobrinhos Gabriel, Angeliny e Miguel, por todo o bem, cuidado, conselhos, orações e incentivos proporcionados desde o princípio, desde o primeiro instante.

A Deus, pelo dom da vida e oportunidade de compartilhar momentos únicos com minha família e amigos.

Nascimento, Cristiano Neves do. **Estrutura Cromossômica e Caracterização Cariotípica no Gênero *Moenkhausia* Eigenmann 1903 (Characiformes: Characidae): ocorrência de cromossomos supranumerários**. 2023. 100 p. (Tese de Doutorado). Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Zoologia), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Botucatu, Brasil. E *Programa de Doctorado en Biodiversidad y Biología Evolutiva, Universitat de València*, Valencia, Espanha.

RESUMO

A presente tese tem como objetivo caracterizar citogeneticamente *Moenkhausia australis*, *Moenkhausia bonita*, *Moenkhausia* cf. *forestii* e *Moenkhausia oligolepis* coletadas em diferentes rios e riachos de cabeceira da bacia do alto rio Paraguai. Nesse sentido, análises mitóticas e meióticas foram realizadas para investigar o número diploide, composição cariotípica, a descrição dos cromossomos B, distribuição da heterocromatina constitutiva (banda C), localização das Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONs), o mapeamento físico do DNA ribossômico (DNAr) 5S e 18S, a de microdissecção dos cromossomos B e o comportamento dos cromossomos B em diferentes fases do ciclo celular. Todas as espécies/populações, analisadas aqui, apresentam número diploide modal de 50 cromossomos com variações interespecíficas das fórmulas cariotípicas. A banda C, revela um padrão de distribuição da heterocromatina similar entre as espécies, exceto em *M. bonita* que apresenta um bloco heterocromático no braço curto do par cromossômico portador das RONs. As RONs, identificadas pela impregnação do Nitrato de Prata e pela sonda de DNAr 18S mostram-se simples nas quatro espécies. Os sítios de DNAr 5S estão distribuídos em múltiplos cromossomos, ocupando preferencialmente posição intersticial. Cromossomos B são observados em todas as espécies/populações analisadas, no entanto, com morfologias e frequências distintas. Os cromossomos B nestas espécies de *Moenkhausia*, apresentam distintos padrões de heterocromatina. A pintura cromossômica com sondas de cromossomos B é eficiente na detecção desses elementos, bem como na busca por sequências compartilhadas com os cromossomos A. Os experimentos de pintura cromossômica indicam o compartilhamento de sequências de DNA dos cromossomos B com alguns cromossomos A. Foi possível acompanhar o comportamento dos cromossomos B em diferentes fases do ciclo celular, verificando regularidade na busca por sua manutenção diante dos mecanismos de *checkpoints* meióticos e mitóticos. Os dados obtidos contribuem para o conhecimento cariotípico das espécies de *Moenkhausia*, permitindo novos insights sobre a origem, composição e frequência dos cromossomos B. De maneira geral, este estudo auxilia no progresso de investigações em uma área geográfica pouco conhecida em relação à diversidade citogenética, além de promover o intercâmbio técnico-científico entre as instituições envolvidas.

Palavras-Chave: citogenética, pintura cromossômica, DNA repetitivo.

Nascimento, Cristiano Neves do. **Chromosomal Structure and Karyotypic Characterization in the Genus *Moenkhausia* Eigenmann 1903 (Characiformes: Characidae): occurrence of supernumerary chromosomes.** 2023. 100 p. (Doctoral Thesis) Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Zoologia), *Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Botucatu*, Brazil. And *Programa de Doctorado en Biodiversidad y Biología Evolutiva*, Universitat de València, Valencia, Spain.

ABSTRACT

The present thesis aims to cytogenetically characterize *Moenkhausia australis*, *Moenkhausia bonita*, *Moenkhausia cf. forestii* and *Moenkhausia oligolepis* collected from different rivers and headwater streams of the upper Paraguai river basin. In this sense, mitotic and meiotic analyses were carried out to investigate the diploid number, karyotypic composition, the description of B chromosomes, distribution of constitutive heterochromatin (C-band), location of the Nucleolus Organizing Regions (NORs), the physical mapping of 5S and 18S ribosomal DNA (rDNA), the microdissection of B chromosomes and the behavior of B chromosomes in different phases of the cell cycle. All species/populations analyzed here show modal diploid number of 50 chromosomes, with interspecific variations of the karyotypic formulas. The C-band reveals a similar pattern of heterochromatin distribution among species, except in *M. bonita* that presents a heterochromatic block on the short arm of the chromosomal pair carrying the NORs. The NORs, identified by Silver Nitrate impregnation and by the 18S rDNA probe were simple in all four species. The 5S rDNA sites are distributed on multiple chromosomes, occupying preferentially an interstitial position. B chromosomes are observed in all species/populations analyzed, however, with distinct morphologies and frequencies. The B chromosomes in these species of *Moenkhausia* present distinct patterns of heterochromatin. The chromosome painting with B chromosome probes is efficient in the detection of these elements, as well as in the search for sequences shared with the A chromosomes. The chromosome painting experiments show sharing of DNA sequences of B chromosomes with some A chromosomes. It was possible to follow the behavior of B chromosomes in distinct phases of the cell cycle, verifying regularity in the search for their maintenance in face of the meiotic and mitotic checkpoint mechanisms. The data obtained contribute to the karyotypic knowledge of *Moenkhausia* species, allowing new insights into the origin, composition, and frequency of B chromosomes. Overall, this study assists in the progress of investigations in a geographical area little known in relation to cytogenetic diversity, in addition to promoting technical and scientific exchange between the institutions involved.

Keywords: cytogenetics, chromosome painting, repetitive DNA.

Nascimento, Cristiano Neves do. **Estructura cromosómica y caracterización cariotípica en el género *Moenkhausia* Eigenmann 1903 (Characiformes: Characidae): presencia de cromosomas supernumerarios**. 2023. 100 p. (Tesis Doctoral) Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Zoologia), *Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Botucatu*, Brasil. Y Programa de Doctorado en Biodiversidad y Biología Evolutiva Universitat de València, Valencia, España.

RESUMEN

La presente tesis tiene como objetivo la caracterización citogenética de *Moenkhausia australis*, *Moenkhausia bonita*, *Moenkhausia* cf. *forestii* y *Moenkhausia oligolepis* recolectadas en diferentes ríos y arroyos de cabecera de la cuenca alta del río Paraguai. En este sentido, se realizaron análisis mitóticos y meióticos para investigar el número diploide, la composición cariotípica, la descripción de los cromosomas B, la distribución de la heterocromatina constitutiva (banda C), la localización de las Regiones Organizadoras del Nucléolos (RONs), el mapeo físico del ADN ribosómico (ADNr) 5S y 18S, la microdissección de los cromosomas B y el comportamiento de los cromosomas B en diferentes fases del ciclo celular. Todas las especies/poblaciones aquí analizadas presentan un número diploide modal de 50 cromosomas, con variaciones interespecíficas de las fórmulas cariotípicas. La banda C, revela un patrón de distribución de la heterocromatina similar entre especies, excepto en *M. bonita* que presenta un bloque heterocromático en el brazo corto del par cromosómico portador de las RONs. Las RONs, identificados por impregnación de Nitrato de Plata y por la sonda 18S ADNr son simples en las cuatro especies. Los sitios 5S ADNr están distribuidos en múltiples cromosomas, ocupando preferentemente una posición intersticial. Los cromosomas B se observan en todas las especies/poblaciones analizadas, sin embargo, con morfologías y frecuencias distintas. Los cromosomas B en estas especies de *Moenkhausia*, presentan patrones distintos de heterocromatina. La pintura cromosómica con sondas de cromosomas B es eficiente en la detección de estos elementos, así como en la búsqueda de secuencias compartidas con los cromosomas A. Los experimentos de pintura cromosómica indican compartición de secuencias de ADN de cromosomas B con algunos cromosomas A. Los datos obtenidos contribuyen al conocimiento cariotípico de las especies de *Moenkhausia*, permitiendo nuevos conocimientos sobre el origen, composición y frecuencia de los cromosomas B. En general, este estudio ayuda al progreso de las investigaciones en una zona geográfica poco conocida en relación con la diversidad citogenética, además de promover el intercambio técnico y científico entre las instituciones implicadas.

Palabras clave: citogenética, pintura cromosómica, ADN repetitivo.

RESUMEN AMPLIO

Nascimento, Cristiano Neves do. **Estructura cromosómica y caracterización cariotípica en el género *Moenkhausia* Eigenmann 1903 (Characiformes: Characidae): presencia de cromosomas supernumerarios**. 2023. 100 p. (Tesis Doctoral) Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Zoologia), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Botucatu, Brasil. Programa de Doctorado en Biodiversidad y Biología Evolutiva, Universidad de Valencia, España.

Los estudios citogenéticos han aportado conocimientos relevantes sobre la biología cromosómica de los peces. Estos estudios han permitido caracterizar el conjunto cromosómico de miles especies de peces en los últimos años (ARAI, 2011). Sin embargo, el número de especies/poblaciones cariotipadas de *Moenkhausia* es escaso, lo que limita el conocimiento sobre la diversidad y la evolución cariotípica de este género de peces. La motivación para el desarrollo de esta tesis fue el estudio de cuatro especies de *Moenkhausia* de la cuenca alta del río Paraguai, Brasil. Estas cuatro especies tienen la característica de ser peces altamente sensibles al estrés causado por la manipulación y el cambio de entorno, y de que provienen de áreas de difícil acceso, a miles de kilómetros del laboratorio donde se procesan los análisis. Los procedimientos analíticos dependen principalmente del hecho de que las muestras estén vivas para el desarrollo exitoso de las técnicas (por ejemplo, la estimulación mitótica). Se utilizaron varias recolectas que aplicaron diferentes métodos de manipulación y transporte para poder enviar las muestras al laboratorio para el procesamiento de los análisis, por lo que fue necesario realizar cursos de reproducción y manejo de peces para resolver cuáles serían las variables que tendríamos que controlar para lograr una manipulación y un transporte eficientes. El interés por el estudio cromosómico de este grupo de peces se relaciona principalmente con la diversidad de especies que lo componen y con la presencia de especies portadoras de cromosomas B.

En este escenario, el **objetivo global** de este estudio es describir la composición cariotípica de *Moenkhausia australis*, *Moenkhausia* cf. *forestii*, *Moenkhausia bonita* y *Moenkhausia oligolepis*, realizando el mapeo físico de las secuencias repetitivas de ADN y la caracterización de los cromosomas B observados en estas especies.

En concreto, se han establecido los siguientes **objetivos específicos**:

- a) analizar y comparar la estructura cariotípica entre especies emparentadas;
- b) mapear físicamente las secuencias de ADN ribosómico en *M. australis*, *M. cf. forestii*, *M. bonita* y *M. oligolepis*;
- c) obtener sondas específicas de los cromosomas B presentes en *M. australis*, *M. cf. forestii*, *M. bonita* y *M. oligolepis*;
- d) caracterizar la morfología, frecuencia y distribución de los cromosomas B presentes en *M. australis*, *M. cf. forestii*, *M. bonita* y *M. oligolepis*;
- e) analizar el comportamiento de los cromosomas B durante la profase I del espermatocito y la anafases mitóticas de *M. australis* y *M. bonita*.

La aplicación de diferentes técnicas citogenéticas ha permitido mejor caracterización de la diversidad cariotípica, así como la comprensión de las relaciones evolutivas entre los diferentes

taxones (ALMEIDA-TOLEDO; FORESTI; TOLEDO-FILHO, 2000). En las últimas décadas, el desarrollo de sondas de ADN permitió el mapeo físico de secuencias de ADN repetitivo en los cromosomas metafásicos, mediante la técnica denominada Hibridación *in situ* Fluorescente (FISH). Este método se presenta como una herramienta fundamental que permite la correlación de la información molecular con la localización física de secuencias específicas de ADN en los cromosomas (CABRAL-DE-MELLO; MAREC, 2021). El mapeo cromosómico de secuencias de ADN repetitivo se ha utilizado con éxito en estudios citogenéticos en peces, lo que demuestra la diversidad y la plasticidad de estas regiones genómicas en diferentes especies (CIOFFI; BERTOLLO, 2012). Del mismo modo, el mapeo físico de las secuencias de ADN ha observado diferentes casos de sintenia entre diferentes clases de ADN repetitivos (por ejemplo, ADN satélite, familias génicas, elementos transponibles, etc.) (CIOFFI; BERTOLLO, 2012). De hecho, estos estudios de mapeo revelan la variabilidad estructural de las secuencias repetitivas y su dinámica en el genoma de diferentes organismos eucariotas (CABRAL-DE-MELLO; MAREC, 2021).

Mediante el análisis citogenético se ha podido observar el comportamiento de los cromosomas en distintas fases del ciclo celular, tanto en células somáticas como meióticas. En las células meióticas, por ejemplo, se observa una estructura cromosómica específica de la meiosis, denominada Complejo Sinaptonémico (SC) (ZICKLER; KLECKNER, 1999). El SC se forma entre los ejes de los cromosomas homólogos durante la profase I y asegura el contacto físico, también llamado sinapsis, entre los cromosomas homólogos. La formación del SC es un paso importante para la continuación de la gametogénesis y los errores durante esta formación pueden desencadenar señales internas, normalmente proteínas, que pueden inducir a la célula a la apoptosis, interrumpiendo la generación de gametos (ZICKLER; KLECKNER, 2015). Este mecanismo para comprobar posibles fallos, denominado *checkpoints*, es complejo y se produce en momentos específicos de la división celular (BARNUM; O'CONNELL, 2014). La técnica de inmunofluorescencia de los cromosomas meióticos ha contribuido al estudio del comportamiento meiótico de diferentes cromosomas (ARAYA-JAIME et al., 2015a). Los datos citogenéticos también han demostrado una presencia considerable de cromosomas B en los peces (D'AMBROSIO et al., 2017).

Los cromosomas supernumerarios, o simplemente “cromosomas B”, son cromosomas exóticos y prescindibles que no son homólogos al conjunto de cromosomas A estándar o simplemente “cromosomas A”. Los cromosomas B se observan en miles de especies de hongos, plantas y animales (D'AMBROSIO et al., 2017). En general, los cromosomas B pueden: (i) ser dispensable, no participar activamente en los procesos fundamentales de crecimiento y desarrollo de los organismos transportadores; (ii) no emparejarse ni recombinarse con los cromosomas A durante la meiosis; y (iii) comportarse de manera inestable durante la mitosis y la meiosis y pueden segregar de forma no mendeliana (CAMACHO; SHARBEL; BEUKEBOOM, 2000). Además, a medida que se estudian nuevas variantes del cromosoma B, se encuentran nuevas excepciones. Es decir, relatos de cómo los cromosomas B engañan a los *checkpoints* y sobreviven a los mecanismos de supresión de errores (por ejemplo, la duplicación, la apariencia de una sinapsis, la segregación, etc.), garantizando su herencia para las generaciones futuras (HOUBEN et al., 2019). Los cromosomas B se componen principalmente de secuencias de ADN repetitivos (KUMON; LAMPSON, 2022). Por el contrario, los genes que se encuentran en los cromosomas B son potencialmente funcionales y pueden participar en procesos biológicos que son beneficiosos para los huéspedes (por ejemplo, el ADN ribosómico) o que permiten una segregación sesgada (por ejemplo, SLIT, dmrt1, msh4, etc.) (RAJPAL et al., 2023).

Mediante la técnica de microdissección cromosómica, que permite el aislamiento de fragmentos o cromosomas completos, fue posible investigar la composición de nucleótidos de diferentes cromosomas. En resumen, el producto de la microdissección es amplificado mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y se genera una biblioteca que contiene varios fragmentos de ADN de interés, para diferentes aplicaciones según la necesidad y el objetivo de la investigación (PANSONATO-ALVES et al., 2014). Se pueden producir sondas para pintura cromosómica (WCP – *Whole Chromosome Painting*) a partir de esta biblioteca, por ejemplo. Los experimentos de WCP mediante FISH han permitido detectar o localizar algunos reordenamientos cromosómicos (SCUDELER et al., 2015). En este sentido, la microdissección ha permitido la secuenciación masiva del ADN repetitivo y los genes de copia única presentes en los cromosomas B (UTSUNOMIA et al., 2016). La integración del WCP y los datos de secuenciación ha generado información interesante, lo que ha permitido proponer hipótesis sobre el origen y la evolución de los cromosomas B (UTSUNOMIA et al., 2016). Es importante informar que las sondas obtenidas por microdissección están compuestas por secuencias anónimas y que, por lo general, se amplifican mediante métodos que favorecen las secuencias repetitivas (SILVA et al., 2014). En este contexto, la secuenciación masiva del ADN microdisseccionados es extremadamente importante en los estudios del origen y la ascendencia del cromosoma B. Inicialmente, el proyecto de desarrollo de la tesis incluyó una propuesta para la secuenciación masiva de los cromosomas B; sin embargo, debido al alto costo de los análisis y a algunos reveses metodológicos, la propuesta tuvo que retrasarse.

Así, se analizaron el cariotipo de *M. australis*, *M. cf. forestii*, *M. bonita* y *M. oligolepis* de diferentes ríos de la cuenca alta del río Paraguai, en la región del Centro Oeste de Brasil. Los especímenes se recolectaron de acuerdo con los procedimientos exigidos por la legislación ambiental brasileña, la autorización para la recolección de especímenes emitida por el (MMA/IBAMA/SISBIO – número 70988). Los procedimientos de muestreo, mantenimiento y análisis de los peces se realizaron de acuerdo con los principios éticos establecidos por el “Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA)” y con la aprobación (núm. 4790080722) de la “Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual Paulista/Instituto de Biociências de Botucatu (IBB/UNESP)”, Brasil. Los especímenes recolectados fueron transportados y empacados en bolsas de plástico o cajas de espuma de poliestireno que contenían agua recién extraída del punto de recolección, proporcionando condiciones favorables para su supervivencia durante el viaje. En el laboratorio, los peces recolectados se aclimataron en acuarios que contenían agua previamente tratada con acondicionador de agua para acuarios y con aireación constante. En ocasiones, se utilizó un sistema de filtración (filtros externos, filtros *Hang On* y/o filtros de espuma internos) para eliminar las partículas sólidas y algunos componentes químicos del agua, garantizando un agua limpia y de calidad para los especímenes. Tras la eutanasia, se extrajeron fragmentos de tejido renal/branquial de cada espécimen para realizar estudios citogenéticos mitóticos, gónadas para el análisis de los cromosomas meióticos y fragmentos de hígado/músculo/aleta para la extracción del ADN. Para identificar el sexo, se examinaron las gónadas con la ayuda de un microscopio óptico y/o la presencia de características sexuales secundarias. Por ejemplo, en ejemplares vivos, se observó una pigmentación rojiza en los machos de *M. bonita* en las aletas anal, caudal y dorsal, mientras que las hembras presentan una pigmentación amarillenta en estas aletas, así como la verificación de anzuelos, presentes en los primeros rayos de la aleta anal de *M. australis*, *M. cf. forestii* y *M. oligolepis*. Tras el análisis, los especímenes se fijaron en alcohol al 70%, se identificaron y depositaron en la colección ictiológica del “Laboratório de Biologia e Genética de Peixes da UNESP” en Botucatu, São Paulo, Brasil. A continuación, en el texto de esta tesis se describen detalladamente los **métodos** utilizados para llevar a cabo los siguientes procedimientos:

- a) Técnica de estimulación mitótica con el objetivo de obtener una mayor frecuencia de células en división (OLIVEIRA et al., 1988);
- b) Técnica de preparación *in vivo* de cromosomas mitóticos en peces (FORESTI et al., 1981);
- c) Caracterización de las Regiones Organizadoras de Nucléolos (RONs) mediante impregnación por Nitrato de Plata – AgNO₃ (Howell & Black, 1980);
- d) Detección de heterocromatina constitutiva (bandeo C) (SUMMER 1972);
- e) Obtención de cromosomas meióticos en profase I (ARAYA-JAIME et al., 2015b);
- f) Extracción de ADN genómico para amplificación de ADN ribosómico;
- g) Preparación de sondas de ADN;
- h) Microdissección de cromosomas B (PANSONATO-ALVES et al., 2014);
- i) Amplificaciones del ADN microdisseccionado (GRIBBLE et al., 2004);
- j) Inmunofluorescencia en espermatoцитos (ARAYA-JAIME et al., 2015b);
- k) Hibridación *in situ* fluorescente (PINKEL et al., 1986); y
- l) Montaje del cariotipo y análisis de datos (LEVAN et al., 1964).

Los **resultados** de la presente tesis doctoral se organizaron en dos artículos principales, con el fin de preparar mejor para su publicación en revistas científicas. El cuarto capítulo se titula, por lo tanto, “Diversidad cariotípica y pintura cromosómica en cuatro especies de *Moenkhausia* (Characiformes, Characidae), de la cuenca alta del río Paraguai, Brasil”. El quinto capítulo, por otro lado, se titula “La localización de proteínas del complejo sinaptonémico (SYCP3) indica el emparejamiento regular de los cromosomas B de *Moenkhausia australis* y *Moenkhausia bonita*”.

En el **capítulo 4**, se presenta la caracterización citogenética de *M. australis*, *M. cf. forestii*, *M. oligolepis* y *M. bonita* recolectadas en diferentes ríos y arroyos de la cuenca alta del río Paraguai, Brasil.

Los análisis cariotípicos realizados en estas cuatro especies mostraron un número diploide (2n) igual a 50 cromosomas, así como el predominio de los cromosomas metacéntricos y submetacéntricos, sin embargo, con variaciones en la fórmula cariotípica entre estas especies. *M. australis* recolectada en arroyo Mamoeiro y arroyo Corredeira presenta una fórmula cariotípica compuesta por cromosomas de los tipos 8 metacéntricos (m), 32 submetacéntricos (sm) y 10 subtelocéntricos (st) y un Número Fundamental (NF) igual a 100. En *M. cf. forestii* del arroyo Águas Claras, la fórmula cariotípica consiste en (8m + 34sm + 6st; NF = 100). Para *M. oligolepis* del arroyo Mamoeiro, la fórmula cariotípica es (10m + 34sm + 6st; NF = 100). Finalmente, para *M. bonita* recolectada en el arroyo São José, la fórmula cariotípica consiste en (12m + 26sm + 8st + 4 acrocéntricos (a); NF = 96). En *M. bonita*, se observa la presencia de dos pares cromosómicos acrocéntricos, situación que no se observó en *M. australis*, *M. cf. forestii* y *M. oligolepis*, por lo que difieren en esta característica. El patrón de distribución de la heterocromatina constitutiva fue similar entre *M. australis*, *M. cf. forestii* y *M. oligolepis*. Se observa pequeños bloques heterocromáticos en las regiones centroméricas y/o pericentroméricas de la mayoría de los cromosomas. Se observa una notable región eucromática

en el brazo corto del cromosoma que portaba las RONS de *M. australis*, *M. cf. forestii* y *M. oligolepis*. *M. bonita* presenta un patrón heterocromático distinto, con pequeñas regiones centroméricas, pericentroméricas y teloméricas en algunos cromosomas. Se observa un gran bloque heterocromático en el par cromosómico portador de las RONS, que ocupa casi todo el brazo corto de este par. También se observan bloques heterocromáticos intersticiales discretos en el primer par de cromosomas de *M. bonita*. La impregnación con nitrato de plata para visualizar las RONS reveló sitios simples en la región terminal del brazo corto de un par de cromosomas submetacéntricos en las cuatro especies analizadas. En *M. australis*, las RONS se observa en el brazo corto del par cromosómico 18, mientras que en *M. cf. forestii* y *M. oligolepis* las RONS se observa en el brazo corto del par cromosómico 8 de ambas especies. Finalmente, *M. bonita* revela las RONS en el brazo corto del par de cromosomas 19. Curiosamente, se observa un polimorfismo de tamaño entre los cromosomas portadores de las RONS después de la impregnación con AgNO₃.

Los resultados de doble-FISH, con sondas de ADN ribosómico (ADNr) 5S y 18S, demuestra un patrón de distribución conservado del ADNr 18S que ocupa la región terminal del brazo corto de un solo par de cromosomas en todas las especies analizadas aquí, coincidiendo con las marcas de AgNO₃. Entre las cuatro especies analizadas, los bloques de ADNr 5S varían. En *M. australis* y *M. oligolepis*, se observan seis cromosomas marcados en las regiones centroméricas y pericentroméricas. En *M. cf. forestii*, los sitios del ADNr 5S se distribuyen en una región centromérica de ocho cromosomas. En *M. bonita*, los sitios del ADNr 5S se observan en la posición telomérica de dos pares de cromosomas submetacéntricos, así como en la región centromérica de los pares acrocéntricos 24 y 25. Curiosamente, el primer par metacéntrico de *M. australis*, *M. cf. forestii* y *M. oligolepis* muestra sitios de ADNr 5S en la región centromérica/pericentromérica de estas tres especies, una situación que no se observó en *M. bonita*.

En las cuatro especies analizadas aquí, se observa la presencia de cromosomas B, que varían tanto en frecuencia como en morfología. En *M. australis*, se demuestra que el cromosoma B es un cromosoma acrocéntrico pequeño (el más pequeño del cariotipo), en *M. cf. forestii*, se observa la aparición de cromosomas B polimórficos micro/meta/submetacéntricos pequeños (los más pequeños del cariotipo), en *M. oligolepis* estos cromosomas también son polimórficos y se presentan como pequeños metacéntricos/submetacéntricos (los más pequeños del cariotipo). Finalmente, en *M. bonita*, los cromosomas B se presentan como un metacéntrico/submetacéntrico pequeño (los más pequeño del cariotipo). La frecuencia con la que se encuentran estos cromosomas B en las células de cada especie varía ampliamente y se presenta en tablas que muestran las observaciones. En resumen, el recuento de células en metafase en 15 ejemplares de *M. australis* muestra una variación considerable en el número de cromosomas B por célula. Curiosamente, los cromosomas B solo se observan en los machos de *M. australis*, y los individuos presentan de 1 a 3 cromosomas B en el 38% (154 de un total de 410) de las células.

En *M. cf. forestii*, se detectan de 1 a 4 cromosomas B en el 96% (103/107) de las metafases analizadas. Se observa una variación intra e interindividual en relación con el número de cromosomas B. Sin embargo, no se observan metafases con 0B en machos de *M. cf. forestii*. De las 443 células en metafase analizadas de *M. oligolepis*, se observa una frecuencia de 1 a 3 cromosomas B en el 47% (207) de las células. A su vez, los cromosomas B de *M. oligolepis* son más frecuentes en las metafases masculinas. Los 14 machos analizados presentan cromosomas B, con una incidencia variable intra e interindividual. Finalmente, 1 a 2 cromosomas B de *M. bonita* están presentes en el 84% (109/129) de las células. Los 10 individuos analizados muestran una variación intra e interindividual en relación con el número

de cromosomas B por célula. Los cromosomas B observados en estas cuatro especies de *Moenkhausia* muestran diferentes patrones heterocromáticos. Utilizando las sondas de ADN 5S y 18S, no se observan marcas en los cromosomas B de ninguna de las especies/poblaciones analizadas aquí.

La amplificación del ADN de los cromosomas B microdisecccionados, mediante dos ciclos de WGA 4, dio como resultado fragmentos de ADN de diferentes tamaños: se observa un “arrastré” del ADN entre 100 pares de bases y > 1 kilobases con una intensidad máxima de alrededor de 300 pb, según un análisis realizado con gel de agarosa al 1%. Cada sonda de ADN microdisecccionado producida recibió el nombre de la inicial de su especie respectiva (MaB para *M. australis*; MfB para *M. cf. forestii*; MoB para *M. oligolepis*; y MbB para *M. bonita*). La microdiseccción y la pintura cromosómica, con sondas completas del cromosoma B, fueron eficaces para localizar los diferentes tipos de cromosomas B observados en *M. australis*, *M. cf. forestii*, *M. oligolepis* y *M. bonita*, sin embargo, con algunas peculiaridades entre ellos. En *M. australis*, la sonda MaB pintó intensamente los tres cromosomas B y algunas regiones de los cromosomas A, sin embargo, se observa una región menos marcada cerca del centrómero de dos cromosomas. A su vez, en *M. cf. forestii*, la sonda MfB pintó intensamente el cromosoma B y el brazo corto del cromosoma A que portaba las RONS. En *M. oligolepis*, la sonda MoB pintó los cromosomas B en toda su longitud y algunas regiones de los cromosomas A. Finalmente, en *M. bonita*, la sonda MbB pintó evidentemente los cromosomas B y el brazo corto del cromosoma que transportaba las RONS y otras regiones de los cromosomas A. En particular, se observa que había una diferencia en la intensidad de la pintura entre los cromosomas B, una diferencia que deberá investigarse más a fondo.

En resumen, las conclusiones más destacadas de este capítulo son: de las 98 especies válidas para el género *Moenkhausia*, el número de especies con información citogenética se ha ampliado de 13 a 14, y la comparación con los datos disponibles en la literatura ha permitido constatar una macroestructura cariotípica similar entre las diversas especies cariotipadas de *Moenkhausia*, en particular, debido a la presencia de $2n = 50$ y el predominio de los cromosomas de dos brazos. Como ya se esperaba, se puede observar que las especies estrechamente relacionadas tienen una mayor similitud en la macroestructura, como las especies *M. australis*, *M. forestii*, *M. oligolepis* y *M. sanctaefilomenae*; así como las especies *M. bonita*, *M. costae*, *M. dichroua*, *M. intermedia* y *M. nigromarginata*. Indicando el uso potencial de la citogenética en el estudio de las relaciones filogenéticas dentro del género *Moenkhausia*. El mapeo físico del ADNr en representantes del género *Moenkhausia* muestra un estado simple del ADNr 18S en todas las especies analizadas aquí. Sin embargo, las secuencias de ADNr 5S se muestran en múltiples sitios cromosómicos. El patrón de dispersión de los sitios de ADNr 5S puede indicar una posible asociación con otros elementos egoístas del genoma (por ejemplo, elementos transponibles). Los cromosomas B se observan en *M. australis*, *M. cf. forestii*, *M. oligolepis* y *M. bonita*, y presentan una variación intra e interindividual y son más frecuentes/restringidos a los machos de estas especies. Los estudios futuros que utilicen la secuenciación de ADN pueden generar datos relevantes sobre el origen, la composición y la evolución de los cromosomas B de especies estrechamente relacionadas de *Moenkhausia*. Con el WCP, es posible identificar el intercambio de secuencias entre los cromosomas B polimórficos y algunas regiones de los cromosomas A. Por último, se considera interesante realizar un estudio detallado de estos grupos de especies de *Moenkhausia*, ya que contribuye a la comprensión de los procesos de diferenciación cariotípica de estos grupos monofiléticos.

En el **capítulo 5** se analiza el comportamiento meiótico y mitótico de los cromosomas B de *Moenkhausia australis* y *Moenkhausia bonita* de la cuenca alta del río Paraguai, Brasil. En este

sentido, se analizaron las células somáticas en metafases y anafases, así como espermatocitos en profase I, de *M. australis* y *M. bonita* recolectadas en el arroyo Mamoeiro y en el arroyo São José, respectivamente. Las muestras de *Moenkhausia australis* mostraron $2n = 50$ cromosomas ($8m + 32sm + 10st$; FN = 100). Además, se observan de 1 a 3 cromosomas B acrocéntricos en el 38% ($n = 154$) de las células analizadas en *M. australis*. Estos elementos supernumerarios se observaron solo en células de los machos.

La pintura cromosómica (WCP), con sondas B específicas de *M. australis*, muestra el intercambio de secuencias de ADN de los tres cromosomas B y algunas regiones de los cromosomas A. El WCP a mediante FISH, en las células somáticas durante anafase de *M. australis*, reveló una aparente disyunción de las cromátidas hermanas del cromosoma A y de los cromosomas B. Los análisis meióticos de los espermatocitos inmunodetectados con anticuerpos contra SYCP3 en la profase I muestran la formación de 25 bivalentes, correspondientes a los cromosomas A, así como la presencia de un pequeño elemento supernumerario, que representa a los cromosomas B. En los espermatocitos en profase I, se evidenció una aparente regularidad en las sinapsis de los cromosomas A, así como en las sinapsis del cromosoma B. No se observó ninguna discontinuidad a lo largo de la sinapsis de los cromosomas homólogos de *M. australis*. La identificación de los cromosomas B fue posible mediante la técnica WCP en espermatocitos en profase I de *M. australis*.

En *M. bonita*, se observan $2n = 50$ cromosomas y una fórmula cariotípica compuesta de ($14m + 24sm + 8st + 4a$; FN = 96). Se observa la presencia de 1 a 2 cromosomas B metacéntricos pequeños en 109 (129 en total) de las células contadas. El WCP, con sondas B específicas de *M. bonita*, permitió localizar los cromosomas B en las células somáticas en las metafases y anafases, así como en la profase I de la meiosis. En las metafases, las sondas del cromosoma B pintaron el brazo corto de un par de los cromosomas A, que posiblemente portara RONS. Se observó una diferencia en la intensidad de pintura entre los cromosomas B. A su vez, los resultados del WCP, en las células somáticas en anafases, detectaron una aparente disyunción de las cromátidas hermanas de los cromosomas A y B. Los análisis meióticos de los espermatocitos en la profase I muestran la formación de 25 bivalentes, correspondientes a los cromosomas A, así como la presencia de un pequeño supernumerario, que presenta una aparente regularidad en la formación del SC de estos cromosomas B. Curiosamente, algunos bivalentes mostraban pequeñas discontinuidades que representaban zonas desapareadas de SYCP3 a lo largo de algunos SC de los cromosomas A. La identificación del cromosoma B se confirmó mediante la técnica WCP con sondas del cromosoma B de *M. bonita*.

Este capítulo presenta datos iniciales sobre el comportamiento de los cromosomas B en *Moenkhausia*. El estudio de los mecanismos que utilizan estos cromosomas para sobrevivir a diferentes puntos de control proteico es relevante y puede servir de base para comprender cómo se emparejan y segregan estos cromosomas en cada generación.

Al final de la presente tesis, se preparan las **consideraciones finales y las implicaciones futuras**, donde se hace saber que la información presentada en esta tesis añade nuevos datos al conocimiento citogenético sobre el género *Moenkhausia*.

1. Se caracterizó la morfología, frecuencia y distribución de los cromosomas B presentes en *M. australis*, *M. cf. forestii*, *M. bonita* y *M. oligolepis*.
2. Se observó que, hasta el momento, las especies del género estudiadas presentan una macroestructura cariotípica conservada.

3. Se observó que las cuatro especies aquí analizadas presentan un número de cromosomas $2n = 50$ y una fórmula cariotípica compuesta principalmente por cromosomas de tipo metacéntrico, submetacéntrico y subtelocéntrico. Estas características demuestran que el número y la forma de los cromosomas se conservan entre las 14 especies ya cariotipadas. Sin embargo, las microestructuras (heterocromatina, RONS y 5S ADNr) son más similares entre especies filogenéticamente relacionadas.
4. Los cromosomas B no se emparejan con los cromosomas del complemento A durante el paquitene en *M. australis* y *M. bonita*.
5. La pintura cromosómica en anafases mitóticas, con las sondas específicas de los cromosomas B, reveló la ocurrencia de disyunción precisa de las cromátidas hermanas de los cromosomas B en *M. australis* y *M. bonita*.

En conclusión, la descripción cariotípica presentada en esta tesis doctoral tiene el potencial de proporcionar más datos citogenéticos sobre las especies de *Moenkhausia* y los cromosomas B, mediante el uso de técnicas de mapeo de ADN repetitivo, la creación de nuevas sondas de ADN para el experimento FISH y la inmunodetección. No obstante, estos datos son útiles para futuras investigaciones en las que se comparan especies estrechamente emparentadas y se determine la presencia de cromosomas B en las especies de *Moenkhausia*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Mapa mundi destacando as regiões biogeográficas do mundo	21
Figura 1.2 – Hipótese filogenética para <i>Moenkhausia</i> proposta por Mariguela et al. (2013), utilizando genes mitocondrial e nuclear	23
Figura 3.1 – Espécies de <i>Moenkhausia</i> coletadas.....	30
Figura 3.2 – Padrão de coloração em vida de <i>Moenkhausia bonita</i>	32
Figura 3.3 – Espécime macho de <i>Moenkhausia australis</i>	32
Figura 4.1 – Locais de coleta de espécies de <i>Moenkhausia</i> analisados no presente estudo	50
Figura 4.2 – Cariótipos corados com Giemsa a 5% (a, b, c e d) e metáfases após bandamento C (a', b', c' e d') em espécies de <i>Moenkhausia</i>	55
Figura 4.3 – Metáfases mitóticas mostrando marcações das RONS em um par de cromossomos submetacêntricos (setas)	56
Figura 4.4 – Metáfases mitóticas das espécies de <i>Moenkhausia</i> submetidas à técnica de <i>Double FISH</i> com sondas de DNAr 5S (vermelho) e DNAr 18S (verde).....	57
Figura 4.5 – Imagem representativa da eletroforese do DNA microdissecado obtido método do WGA.....	61
Figura 4.6 – Pintura cromossômica em células mitóticas de espécies de <i>Moenkhausia</i> utilizando distintas sondas de cromossomos B microdissecados	62
Figura 5.1 – Mapa de localização dos pontos de coleta <i>M. australis</i> e <i>M. bonita</i>	77
Figura 5.2 – Preparações mitóticas de <i>M. australis</i>	80
Figura 5.3 – Anáfase mitótica de <i>M. australis</i> submetida a pintura cromossômica com sonda MaB	81
Figura 5.4 – Preparações meióticas e mitóticas de <i>M. australis</i>	81
Figura 5.5 – Espermatócitos em paquíteno de <i>M. australis</i> submetidos a pintura cromossômica com sonda MaB.....	82
Figura 5.6 – Preparações mitóticas de <i>M. bonita</i>	83
Figura 5.7 – Anáfase mitótica de <i>M. bonita</i> submetida a pintura cromossômica com sonda MbB.....	84
Figura 5.8 – Preparações meióticas e mitóticas de <i>M. bonita</i>	85
Figura 5.9 – Espermatócitos em paquíteno de <i>M. bonita</i> submetidos à pintura cromossômica com sonda MbB.....	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 – Informações citogenéticas sobre as espécies do gênero <i>Moenkhausia</i>	24
Tabela 3.1 – Informações sobre os locais e espécies de <i>Moenkhausia</i> coletadas	31
Tabela 4.1 – Informações sobre os locais e espécimes de <i>Moenkhausia</i> coletados	51
Tabela 4.2 – Dados citogenéticos observados em espécies de <i>Moenkhausia</i> analisadas no presente trabalho.....	53
Tabela 4.3 – Frequência de cromossomos B em metáfases mitóticas de <i>Moenkhausia australis</i>	58
Tabela 4.4 – Frequência de cromossomos B em metáfases mitóticas de <i>Moenkhausia</i> cf. <i>forestii</i>	59
Tabela 4.5 – Frequência de cromossomos B em metáfases mitóticas de <i>Moenkhausia oligolepis</i>	59
Tabela 4.6 – Frequência de cromossomos B em metáfases mitóticas de <i>Moenkhausia bonita</i>	60
Tabela 4.7 – Dados citogenéticos do clado 4	68
Tabela 4.8 – Dados citogenéticos do clado 5	70
Tabela 5.1 – Espécimes de <i>Moenkhausia</i> coletados.....	78

LISTA DE SIGLAS

a	–	Acrocêntrico
CEUA	–	Comissão de ética no uso de animais
CONCEA	–	Conselho nacional de controle de experimentação animal
CP	–	Comprimento Padrão
DNA	–	Ácido desoxirribonucleico
DNAr	–	DNA ribossômico
DNAsat	–	DNA satélite
DNAsn	–	Sequências de DNA para pequenos RNA nucleares
FISH	–	Hibridização <i>in situ</i> fluorescente
IBAMA	–	Instituto brasileiro do meio ambiente e recursos renováveis
IBB	–	Instituto de biociências de Botucatu
m	–	Metacêntrico
MaB	–	Sondas de DNA para <i>Moenkhausia australis</i>
MbB	–	Sondas de DNA para <i>Moenkhausia bonita</i>
MfB	–	Sondas de DNA para <i>Moenkhausia cf. forestii</i>
MMA	–	Ministério do meio ambiente
MoB	–	Sondas de DNA para <i>Moenkhausia oligolepis</i>
MT	–	Mato Grosso
NGS	–	Sequenciamento de nova geração
PCR	–	Reação em cadeia da polimerase
RNA	–	Ácido ribonucleico
RONs	–	Regiões Organizadoras de Nucléolo
SC	–	Complexo sinaptonêmico
SISBIO	–	Sistema de autorização e informação em biodiversidade
sm	–	Submetacêntrico
st	–	Subtelocêntrico
SYCP	–	Proteínas do complexo sinaptonêmico
UNESP	–	Universidade estadual paulista
UV	–	Universitat de València
WCP	–	Pintura cromossômica total
WGA3	–	<i>Genome plex[®] whole genome reamplification</i>
WGA4	–	<i>Genome plex[®] single cell whole genome amplification kit</i>

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO	21
1.1 PEIXES NEOTROPICAIS	21
1.2 FAMÍLIA CHARACIDAE: O GÊNERO <i>MOENKHAUSIA</i>	22
1.3 ESTUDOS CITOGENÉTICOS EM <i>MOENKHAUSIA</i>	24
1.3.1 Cromossomos B em <i>Moenkhausia</i>	26
CAPÍTULO 2 OBJETIVOS	29
2.1 OBJETIVO GERAL	29
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
CAPÍTULO 3 MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 LOCAL DE COLETA E AMOSTRAS	30
3.2 MÉTODOS	33
3.2.1 Estimulação mitótica	33
3.2.2 Técnica de preparação <i>in vivo</i> de cromossomos mitóticos em peixes.....	33
3.2.3 Preparo de lâminas.....	34
3.2.4 Caracterização das Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONs).....	34
3.2.5 Detecção da heterocromatina constitutiva (banda C).....	35
3.2.6 Obtenção de cromossomos meióticos.....	35
3.2.7 Extração de DNA genômico.....	37
3.2.8 Preparo das sondas de DNA	37
3.2.9 Microdissecção cromossômica	38
3.2.10 Amplificações do material microdissecado.....	39
3.2.11 Imunocoloração de espermátócitos	41
3.2.12 Hibridização <i>in situ</i> (FISH)	42
3.2.13 Montagem dos cariótipos e análise dos dados.....	44
CAPÍTULO 4 DIVERSIDADE CARIOTÍPICA E PINTURA CROMOSSÔMICA EM QUATRO ESPÉCIES DE <i>MOENKHAUSIA</i> (CHARACIFORMES, CHARACIDAE) .	45
4.1 RESUMO	45
4.2 ABSTRACT	46
4.3 RESUMEN	47
4.4 INTRODUÇÃO.....	48
4.5 MATERIAL E MÉTODOS.....	50

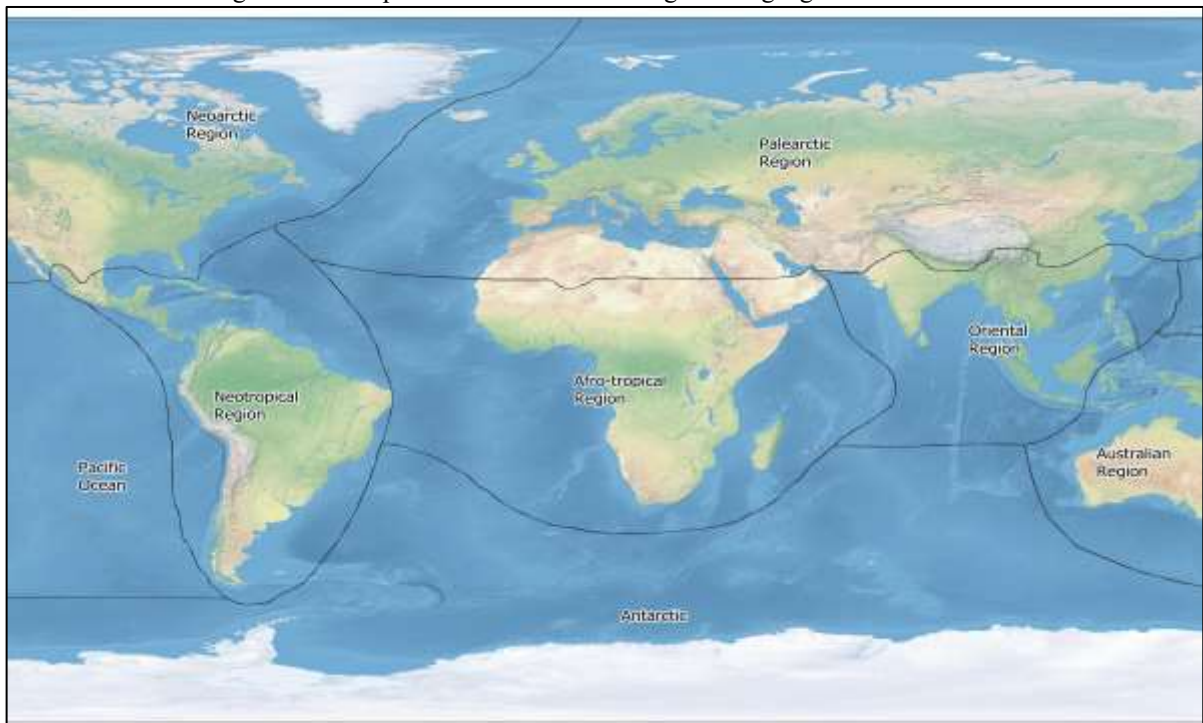
4.5.1 Locais de coleta e análise citogenética.....	50
4.5.2 Amplificação dos genes ribossômicos.....	52
4.5.3 Microdissecção cromossômica e obtenção de sondas	52
4.5.4 Hibridização <i>in situ</i> (FISH) e Pintura Cromossômica Total (WCP)	53
4.5.5 Microscopia	53
4.6 RESULTADOS	53
4.6.1 Cromossomos do complemento A.....	53
4.6.2 Cromossomos B.....	58
4.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
CAPÍTULO 5 IMUNOLocalização de Proteínas do Complexo Sinaptonêmico (SYCP3) Indica Pareamento Regular dos Cromossomos B de <i>MOENKHAUSIA AUSTRALIS</i> e <i>MOENKHAUSIA BONITA</i> (CHARACIFORMES, CHARACIDAE).....	71
5.1 RESUMO	71
5.2 ABSTRACT	72
5.3 RESUMEN	73
5.4 INTRODUÇÃO.....	74
5.5 MATERIAL E MÉTODOS.....	77
5.5.1 Amostragem	77
5.5.2 Obtenção de preparações cromossômicas mitóticas e meióticas.....	78
5.5.3 Imunocoloração e anticorpos utilizados	78
5.5.4 Hibridização <i>in situ</i> (FISH)	78
5.5.5 Coloração cromossômica.....	79
5.5.6 Microscopia	79
5.6 RESULTADOS	79
5.6.1 <i>Moenkhausia australis</i>	79
5.6.2 <i>Moenkhausia bonita</i>	82
5.7 DISCUSSÃO.....	86
5.8 REFERÊNCIAS	88
CONCLUSÕES.....	89
CONCLUSIONES	90
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO

1.1 PEIXES NEOTROPICAIS

A maior biodiversidade, de diferentes grupos de organismos, é encontrada na região Neotropical (RAVEN et al., 2020; WALLACE, 1876). Esta região se estende do centro do México até a Argentina na América do Sul (Figura 1.1, ALBERT; REIS, 2011; MORRONE, 2014). O sistema hidrográfico de água doce da região Neotropical é heterogêneo e muito particular, possuindo grandes rios, diferentes regiões de arcos entre bacias hidrográficas e grande variedade de ecossistemas aquáticos (ALBERT; TAGLIACOLLO; DAGOSTA, 2020; CASSEMIRO et al., 2023).

Figura 1.1 – Mapa mundi destacando as regiões biogeográficas do mundo



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Nestes ecossistemas aquáticos, os peixes representam um grupo de vertebrados extremamente biodiverso, que ocupa grande variedade de ambientes. A ictiofauna é representada atualmente por 36.532 espécies válidas, sendo o grupo de vertebrados que apresenta o maior número de espécies (FRICKE; ESCHMEYER; VAN DER LAAN, 2023; NELSON; GRANDE; WILSON, 2016). Um considerável número de espécies novas têm sido descritas todos os anos – uma média de aproximadamente 243 espécies por ano (FRICKE; ESCHMEYER; VAN DER LAAN, 2023). Considerando apenas a última década (2013 – 2022)

foram descritas 4.013 novas espécies em todo o mundo, sendo a maioria (2.466) espécies de peixes de água doce (FRICKE; ESCHMEYER; VAN DER LAAN, 2023).

A região Neotropical possui aproximadamente 5.000 espécies de peixes, as quais exibem padrões biogeográficos distintos baseados na ecologia, sistemática e evolução (CASSEMIRO et al., 2023; REIS et al., 2016; TONELLA et al., 2023). Porém, Reis et al. (2016) fazem uma projeção da riqueza de espécies de peixes neotropicais de água doce estimando que o número total de espécies seja bem maior, alcançando valores entre 8.000 – 9.000 espécies. Estes autores ressaltam que cerca de 34 a 42% das espécies de peixes de água doce da região Neotropical ainda não foram identificadas (REIS et al., 2016). Nesse cenário, é relevante realizar pesquisas na área para aprimorar o conhecimento sobre a biodiversidade.

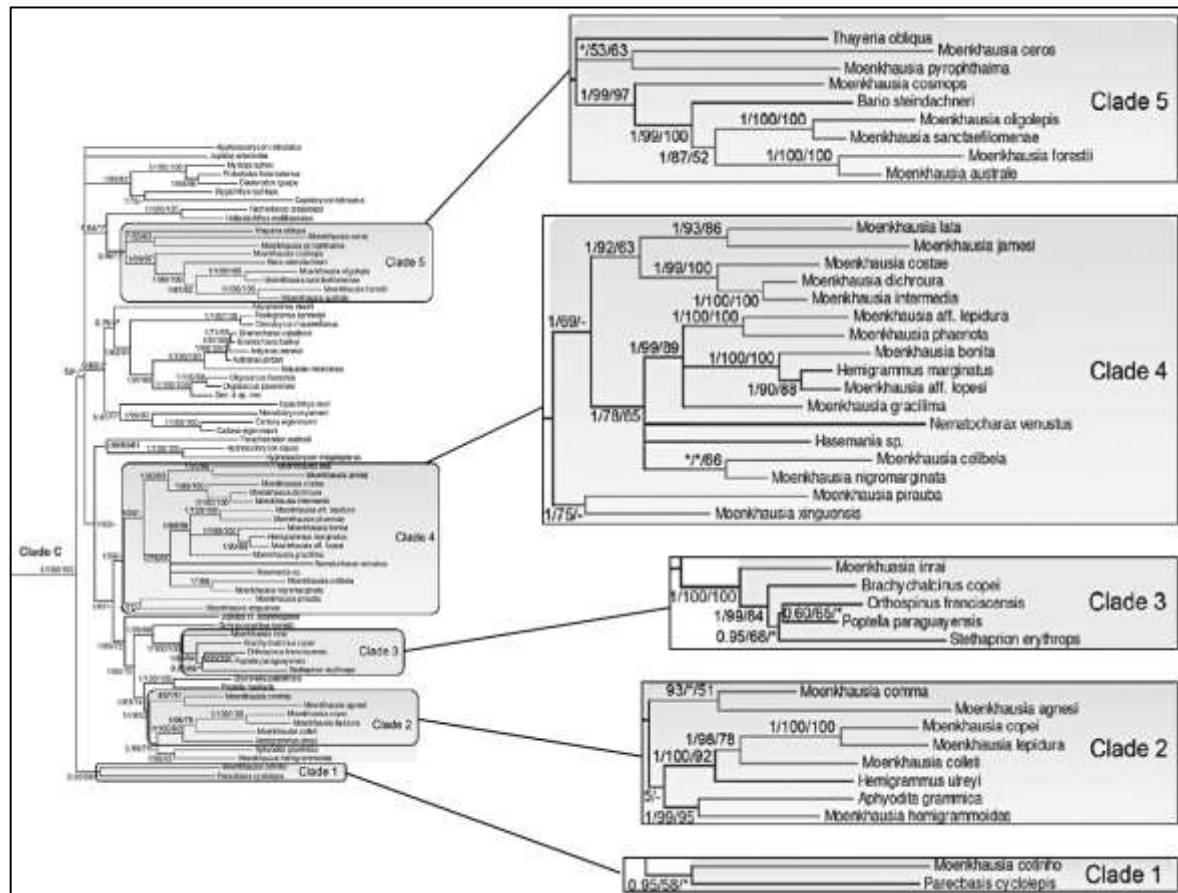
1.2 FAMÍLIA CHARACIDAE: O GÊNERO *MOENKHAUSIA*

Dentre essa biodiversidade Neotropical, pode-se destacar os caracídeos, peixes da família Characidae, que estão distribuídos em praticamente todas as bacias de água doce desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Patagônia na Argentina, mas são especialmente diversos na América do Sul (MIRANDE, 2019). A família Characidae está inserida na ordem Characiformes sendo considerada a quarta família, da classe Actinopterygii, com o maior número de espécies válidas, seguida por Gobiidae (1.973), Cyprinidae (1.784) e Cichlidae (1.750) (FRICKE; ESCHMEYER; VAN DER LAAN, 2023). Informações disponíveis, para Characidae, no *Catalog of Fishes* (versão online, atualizada em 6 de junho de 2023) indicam o registro de 1.255 espécies válidas, das quais 208 foram descritas somente na última década (2014 – 2023) (FRICKE; ESCHMEYER; VAN DER LAAN, 2023).

A maioria dos caracídeos são peixes de pequeno porte, < 80 mm de comprimento padrão (CP) chegando a 20 cm em alguns gêneros predadores (MIRANDE, 2019). Existem também espécies em miniatura que não excedem 26 mm CP (MATTOX et al., 2021; WEITZMAN; VARI, 1988). Entre os gêneros de caracídeos destaca-se o gênero *Moenkhausia* (Characiformes: Characidae: Stethaprioninae) que foi descrito por Eigenmann em 1903. Este gênero é composto por 98 espécies válidas amplamente distribuídas em rios da região Neotropical com mais de 80% (n = 74) das espécies ocorrendo em corpos d'água da bacia Amazônica (DAGOSTA; PINNA, 2019). *Moenkhausia* inclui espécies com uma ampla distribuição e que fazem parte de grupo de complexo de espécies, como por exemplo o grupo *Moenkhausia oligolepis* (BENINE; MARIGUELA; OLIVEIRA, 2009; REIA et al., 2019). Além disso, estudos filogenéticos têm evidenciado a natureza polifilética do gênero

Moenkhausia (MARIGUELA et al., 2013; MIRANDE, 2009, 2010, 2019), já que espécies de *Moenkhausia* se apresentam intimamente relacionadas a espécies de outros gêneros, por exemplo, *Hemigrammus*, *Bario*, e *Hasemania* (Figura 1.2, MARIGUELA et al., 2013).

Figura 1.2 – Hipótese filogenética para *Moenkhausia* proposta por Mariguela et al. (2013), utilizando genes mitocondrial e nuclear



Fonte: adaptado de Mariguela et al. (2013).

Legenda: uma série de três números (por exemplo, 1/100/87) em cada um dos nós principais representa a análise Bayesiana / análise particionada de máxima verossimilhança / análise de máxima parcimônia, respectivamente.

A hipótese filogenética apresentada na Figura 1.2 contém mais de 20 espécies de *Moenkhausia* que reforçam a condição polifiléticas do gênero *Moenkhausia* assim como a organização de cinco clados monofiléticos (MARIGUELA et al., 2013). A maioria das espécies (13) de *Moenkhausia* analisadas por Mariguela et al. (2013) estão agrupadas no Clado 4, incluindo *Moenkhausia xinguensis* considerada a espécie-tipo do gênero.

Interessantemente, Mirande (2019) recupera algumas relações observadas por Mariguela et al. (2013), notavelmente pela formação de um grande clado, “*Moenkhausia Clade*”, composto pela maioria das espécies de *Moenkhausia*, incluindo *M. xinguensis* (espécie tipo do gênero), bem como a relação de *Bario steindachneri* com *Moenkhausia australis*,

Moenkhausia forestii, *Moenkhausia oligolepis* e *Moenkhausia sanctaefilomenae* formando o clado denominado por Mirande (2019) de “*Barrio Clade*”.

1.3 ESTUDOS CITOGENÉTICOS EM *MOENKHAUSIA*

A citogenética evoluiu muito nos últimos anos devido ao uso de métodos mais sofisticados, que permitiram contribuição efetiva tanto para estudos taxonômicos (citotaxonomia) quanto para uma melhor caracterização do conjunto cromossômico (cariótipo) de diferentes organismos (AHMAD; MARTINS, 2019; ROSSI, 2021). Entretanto, em peixes a última publicação neste sentido, apresentando um panorama geral de espécies/subespécies cariotipadas, foi elaborada por Arai em 2011. O autor compilou 3.425 espécies/subespécies distribuídas em 53 ordens e 262 famílias (ARAI, 2011). Em peixes, são escassas as publicações de revisão geral sobre as informações cariotípicas.

Do mesmo modo, no gênero *Moenkhausia* se reflete essa escassez de dados citogenéticos. Atualmente estão disponíveis informações cariotípicas (considerando artigos científicos, teses e dissertações) para apenas 14 espécies desse gênero de um total de 98 espécies válidas. Os dados cariotípicos mostram uma predominância de $2n = 50$ com exceção das espécies *Moenkhausia gracilima* do rio Amazonas com $2n = 48$ (SANTOS, 1999) e *Moenkhausia pittieri* com $2n = 49$ (AREFJEV, 1989). No entanto, o número diploide mais frequente é de $2n = 50$ cromossomos, com predominância de cromossomos de dois braços. A espécie com maior número de populações analisadas citogeneticamente é *M. sanctaefilomenae*, apresentando 12 populações já cariotipadas (Tabela 1.1).

Tabela 1.1 – Informações citogenéticas sobre as espécies do gênero *Moenkhausia*

Espécie	Localidade	2n	Fórmula Cariotípica	NF	B	Referências
<i>Moenkhausia</i> sp.	Rio Taquaral	50	16m+34sm	100	-	(DANTAS et al., 2007)
<i>M. andrica</i> **	Rio Membeca Rio Sangue	50	10m+32sm+8st 12m+32sm+6st	100	- 0-3	(NASCIMENTO et al., 2020)
<i>M. australis</i>	Ribeirão Mamoeiro Córrego Corredeira	50	8m+32sm+10st	100	0-3	***
<i>M. sanctaefilomenae</i>	Rio Capivara	50	48m/sm+2a	98	0-8	(FORESTI; ALMEIDA-TOLEDO; TOLEDO, 1989)
	Rio Aquapey		48m/sm+2st		1-3	(ALBERDI; FENOCCHIO, 1997)
	Rio Paraná		12m+36sm+2st		0-2	(PORTELA-CASTRO; JÚLIO JÚNIOR; NISHIYAMA, 2001)
	Afluente do Rio Capivara		12m+36sm+2st	100	0-6	(DANTAS et al., 2007)
	Rio Batalha				0-8	(HASHIMOTO et al., 2012)
	Rio Batalha		6m+16sm+28st		0-6	(UTSUNOMIA et al., 2016)
	Rio Novo				-	
	Rio Araquá		6m+44sm		0-6	(SCUDELER et al., 2015)

Espécie	Localidade	2n	Fórmula Cariotípica	NF	B	Referências
	Córrego Mané Teixeira					
	Riacho Olaria					
	Córrego Guaçu		8m+36sm+6st		0-8	(FERNANDES; ALVES, 2017)
	Yabebiry		12m+32sm+6st		1-3	(SÁNCHEZ; TAKAGUI; FENOCCHIO, 2021)
<i>M. oligolepis</i>	Córrego Corredeira		12m+32sm+6st		0-4	(NASCIMENTO et al., 2020)
	Serraria dos padres		10m+26sm+14st	100	0-2	
	Ribeirão Mamoeiro	50	10m+34sm+6st		0-3	***
	Córrego Pedro Correia		10m+32sm+8a	92*	0-10	(SANTOS et al., 2021)
	Córrego Taboquinha					
<i>M. forestii</i>	Ribeirão do Sapo		10m+32sm+8st	100	0-3	(NASCIMENTO et al., 2020)
	Rio Paraná	50	10m+28sm+10st+2a	98	0-2	(RANUCCI et al., 2021)
	Córrego Águas Claras		6m+38sm+6st	100	0-4	***
<i>M. intermedia</i>	Lagoa do Mato		50m/sm		0-1	(PORTELA; GALETTI; BERTOLLO, 1988)
	Rio Paraná	50	16m+34sm	100	-	(PORTELA-CASTRO; JÚLIO-JÚNIOR, 2002)
	Rio Mogi-Guaçu		16m+34sm		-	(DANTAS et al., 2007)
	Pindapoy Grande		16m+28sm+6st		1-3	(SÁNCHEZ; TAKAGUI; FENOCCHIO, 2021)
	Córrego Mártires					
<i>M. gracilima</i>	Rio Amazonas (Cit. A)	50	14m+26sm+6st+4a	96	-	(SANTOS, 1999)
	Rio Amazonas (Cit. B)	48	4m+24sm+12st+8a	88	-	
<i>M. cosmops</i>	Rio Verde	50	14m+30sm+6st	100	-	(NASCIMENTO et al., 2020)
<i>M. costae</i>	Rio São Francisco	50	50m/sm	100	-	(PORTELA; GALETTI; BERTOLLO, 1988)
<i>M. pittieri</i>	sem citação	49	4m+39sm/st+6a	92	-	(AREFJEV, 1989)
	sem citação	50	4m+40sm/st+6a	94	-	
<i>M. dichroua</i>	Rio Cuiabá		32m+14sm+4st		-	(MIYAZAWA, 1997)
	Rio Iguaçu		26m+24sm		-	(PAIZ, 2013)
	Pindapoy Grande	50	22m+22sm+6st	100	-	(SÁNCHEZ; TAKAGUI; FENOCCHIO, 2021)
	Mártires				-	
<i>M. nigromarginata</i>	Rio Membeca	50	14m+32sm+4a	96	-	(NASCIMENTO et al., 2020)
	Rio Verde				-	
<i>M. bonita</i>	Córrego São José		12m+26sm+8st+4a	96	0-2	***
	Rio Paraná	50	14m+24sm+8st+4a	96	0-1	(RANUCCI et al., 2021)
	Índios River				0-2	

Fonte: adaptado de Portela-Castro e Júlio-Júnior, (2002).

Legenda: 2n = número diploide; m = metacêntrico; sm = submetacêntrico; st = subtelocêntrico; a = acrocêntrico; NF = Número Fundamental; B = Cromossomos Supranumerários; * = recalculado; ** = *M. andrica*, foi identificada por Nascimento et al. (2020) como *M. oligolepis* LBP: 8527 e *Moenkhausia* sp. n. LBP: 19531 (ver REIA et al., 2021); *** = presente trabalho.

Para estas espécies apresentadas na Tabela 1.1, os estudos de distribuição das regiões heterocromáticas no gênero *Moenkhausia* evidenciam a presença de blocos de heterocromatina constitutiva (banda C) ocupando preferencialmente a região pericentromérica/centromérica da maioria dos cromossomos (DANTAS et al., 2007; NASCIMENTO et al., 2020; PORTELA-CASTRO; JÚLIO JÚNIOR, 2002). Além disso, Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONs) observadas por impregnação de Nitrato de Prata tem evidenciado a ocorrência de RONs simples na maioria das espécies. No entanto, em algumas populações de *M. sanctaefilomenae* foram observadas RONs múltiplas pela técnica de impregnação de Nitrato de Prata (DANTAS et al., 2007; FORESTI; ALMEIDA-TOLEDO; TOLEDO, 1989; HASHIMOTO et al., 2012).

Estudos de mapeamento físico de sequências de DNA repetitivos, em espécies de *Moenkhausia*, são observados em apenas oito espécies (DANTAS et al., 2007; FERNANDES; ALVES, 2017; NASCIMENTO et al., 2020; RANUCCI et al., 2021; SANTOS et al., 2021; SCUDELER et al., 2015; UTSUNOMIA et al., 2016; presente trabalho). Nestas espécies, mediante o uso da FISH, foi possível mapear fisicamente sequências de DNA ribossômico (DNAr), histona, sequências de DNA para pequenos RNA nucleares (DNAsn), sequências teloméricas e sequências de satélites (DNAsat). Em resumo, estes estudos têm evidenciado variações na microestrutura cromossômica, permitindo uma comparação em nível intra- e interespecífica. Considerando a riqueza de espécies do gênero *Moenkhausia* e o baixo número de espécies cariotipadas, torna-se relevante os estudos citogenéticos nesse grupo de peixes, contribuindo para a ampliação do conhecimento cromossômico de diferentes espécies/populações.

1.3.1 Cromossomos B em *Moenkhausia*

Além dos cromossomos do complemento padrão A, essenciais para o desenvolvimento e a reprodução, alguns organismos eucariotos podem exibir cromossomos adicionais denominados de cromossomos B (conhecidos também como supranumerários, extras ou acessórios) (CAMACHO, 2005). Os cromossomos B podem se originar de rearranjos cromossômicos (ex., fissão cromossômica) em regiões genômicas de uma determinada espécie (origem intraespecífica) ou podem ter surgido como resultados de hibridização entre espécies (origem interespecífica) (RAJPAL et al., 2023; SILVA et al., 2022). Comumente, os cromossomos B são heterocromáticos e contém distintas sequências de DNA repetitivos, sugerindo que sejam elementos geneticamente inertes, não essenciais, egoístas e ou parasitas (JOHNSON POKORNÁ; REIFOVÁ, 2021; KUMON; LAMPSON, 2022). Porém, os cromossomos B persistem em populações naturais sobrevivendo a diferentes mecanismos supressores e garantindo sua herança para as próximas gerações (HOUBEN, 2017; RAJPAL et al., 2023; SILVA et al., 2022).

Os cromossomos B são observados em aproximadamente três mil espécies de diferentes eucariontes como fungos, plantas e animais (D'AMBROSIO et al., 2017). O número de cromossomos B pode variar entre indivíduos, tecidos e até mesmo entre células (LI et al., 2022; PARDO et al., 1995). Além disso, os cromossomos B podem apresentar morfologias distintas até mesmo dentro de uma única espécie, no entanto, de maneira geral os cromossomos B são

pequenos ou em alguns casos podem apresentar tamanho semelhante aos cromossomos A (CAMACHO; SHARBEL; BEUKEBOOM, 2000; SILVA et al., 2022).

Em peixes são descritos cromossomos B em mais de 70 espécies de actinoptérigeos (CARVALHO; MARTINS-SANTOS; DIAS, 2008; D'AMBROSIO et al., 2017). Porém, esses cromossomos B têm se mostrado mais frequente em alguns grupos de peixes como por exemplo, em espécies dos gêneros *Astyanax*, *Psalidodon*, *Prochilodus* e *Rhamdia* (CARVALHO; MARTINS-SANTOS; DIAS, 2008).

No gênero *Moenkhausia*, a presença de cromossomos B é observada em sete espécies: *Moenkhausia andrica*, *M. australis*, *M. oligolepis*, *M. sanctaefilomenae*, *M. forestii*, *Moenkhausia intermedia* e *Moenkhausia bonita* (ver Tabela 1.1). Nestas espécies os cromossomos B apresentam-se com diferentes variantes morfológicas (NASCIMENTO et al., 2020), distintos padrões de heterocromatina constitutiva (HASHIMOTO et al., 2012) e atividade nucleolar foi detectada em cromossomos B de *M. sanctaefilomenae* (FORESTI; ALMEIDA-TOLEDO; TOLEDO, 1989). Além disso, por meio da FISH com sondas de DNA repetitivos foi possível mapear fisicamente sobre os cromossomos B, sequências de DNAr 18S, genes de histonas H1 e H3, DNA telomérico, DNAsn U2 e DNAsat MS3 e MS7 (DANTAS et al., 2007; NASCIMENTO et al., 2020; SCUDELER et al., 2015; UTSUNOMIA et al., 2016).

A técnica de microdissecção também tem sido utilizada em alguns estudos citogenéticos em espécies de *Moenkhausia* permitindo o levantamento de hipóteses da origem, assim como a detecção de sequências compartilhadas entre os cromossomos A e B (SANTOS et al., 2021; SCUDELER et al., 2015; UTSUNOMIA et al., 2016). Em *M. sanctaefilomenae* da bacia do rio Tietê, Scudeler et al. (2015) após microdissecar os cromossomos B heterocromáticos e realizar experimentos de pintura cromossômica, levantaram a hipótese de uma origem intraespecífica e independente para duas variantes de cromossomos B. Esta hipótese foi corroborada por estudos integrando dados de citogenética molecular e análises de sequências de DNA obtidas por sequenciamento massivo e Sanger (UTSUNOMIA et al., 2016). Recentemente, em *M. oligolepis* da bacia do rio Tocantins, Santos et al. (2021) após microdissecção e pintura cromossômica também apresentaram uma hipótese de origem intraespecífica e propõe rearranjos cromossômicos que contribuíram para a origem e diferenciação dos cromossomos B em populações de *M. oligolepis*.

Embora um pouco mais restrito, devido à dificuldade de estabelecer boas preparações meióticas, o comportamento dos cromossomos B têm sido observados em prófase I (estágio de paquíteno), metáfase I e metáfase II em populações de *M. sanctaefilomenae* do alto rio Paraná e do rio Tietê por (FORESTI; ALMEIDA-TOLEDO; TOLEDO, 1989; PORTELA-CASTRO;

JÚLIO JÚNIOR; NISHIYAMA, 2001) respectivamente. Nestas populações os cromossomos B foram observados ora como univalentes ora como bivalentes. Por exemplo, mediante análises de espermátocitos em paquítenos, Portela-Castro; Júlio-Júnior; Nishiyama (2001) observaram dois cromossomos B univalentes em 58,2% dos paquítenos analisados e em 13,8% dos meiócitos apenas um cromossomo B foi observado. Com base nesta observação, os autores propuseram que uma segregação tendenciosa poderia estar assegurando a transmissão de pelo menos um cromossomo B para as células-filhas.

Considerando as características peculiares dos cromossomos B e a necessidade de novas informações cariotípicas em espécies ou populações de *Moenkhausia*, o presente estudo visou descrever o cariótipo de quatro espécies de *Moenkhausia* mapeando fisicamente sequências de DNA ribossômicos, bem como descrição da morfologia e frequência dos cromossomos B em distintas fases do ciclo celular.

CAPÍTULO 2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Descrever a composição cariotípica de *Moenkhausia australis*, *M. bonita*, *M. cf. forestii* e *M. oligolepis* realizando o mapeamento físico de sequências de DNA repetitivos e a caracterização dos cromossomos B observados nestas espécies.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

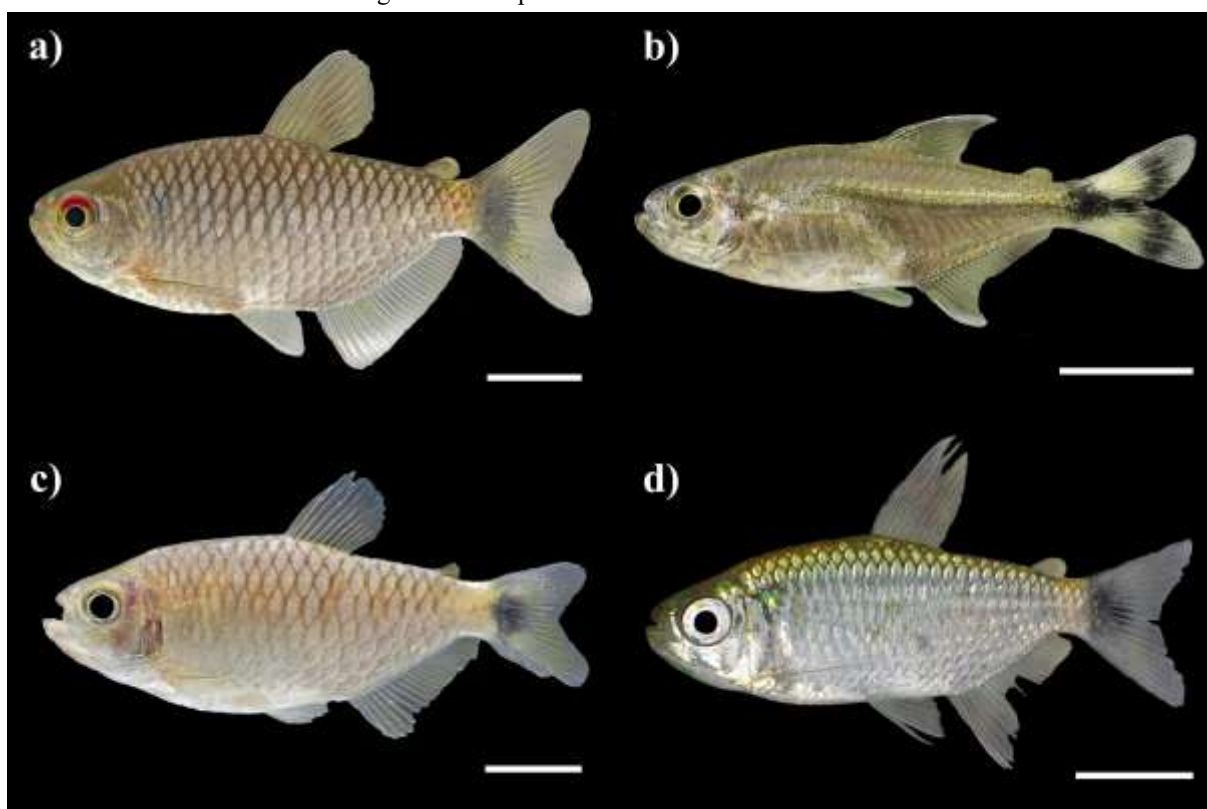
- a) analisar e comparar a estrutura cariotípica entre espécies filogeneticamente relacionadas;
- b) realizar o mapeamento físico de sequências de DNA ribossômicos em *M. australis*, *M. cf. forestii*, *M. bonita* e *M. oligolepis*;
- c) Obter sondas específicas dos cromossomos B de *M. australis*, *M. bonita*, *M. cf. forestii* e *M. oligolepis*.
- d) caracterizar a morfologia, frequência e distribuição dos cromossomos B presentes em *M. australis*, *M. cf. forestii*, *M. bonita* e *M. oligolepis*;
- e) analisar o comportamento dos cromossomos B, durante a prófase I de espermatócitos e anáfases mitóticas, de *M. australis* e *M. bonita*.

CAPÍTULO 3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAL DE COLETA E AMOSTRAS

Foram analisadas quatro espécies de *Moenkhausia* (Figura 3.1) coletadas em diferentes rios e riachos de cabeceira da bacia do alto rio Paraguai, na região Centro-Oeste do Brasil (Tabela 3.1). Os espécimes foram coletados de acordo com os procedimentos exigidos pela legislação ambiental brasileira (autorização para coleta de espécimes: MMA/IBAMA/SISBIO – número 70988). Os procedimentos de amostragem, manutenção e análise dos peixes foram realizados de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com aprovação (nº 4790080722) da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual Paulista/Instituto de Biociências de Botucatu (IBB/UNESP).

Figura 3.1 – Espécies de *Moenkhausia* coletadas



Fonte: Jefferson Crispim e Cristiano (2023).

Legenda: em **a)** *Moenkhausia australis*; **b)** *Moenkhausia bonita*; **c)** *Moenkhausia* cf. *forestii*; **d)** *Moenkhausia oligolepis*. Barra de escala 1 cm.

Tabela 3.1 – Informações sobre os locais e espécies de *Moenkhausia* coletadas

Espécies	Coordenadas	LBP*	Localidade/Município	Número Amostral	
				M	F
<i>Moenkhausia australis</i>	14°38'26.1" S, 56°49'41.7" W	32746 e 32747	Córrego Mamoeiro/ Denise – MT	4	4
	14°48'08.33" S, 57°07'25.18" W	32753	Córrego Corredeira/ Denise – MT	1	0
<i>M. cf. forestii</i>	14°21'03.2" S, 57°33'07.2" W	*	Córrego Águas Claras/ Santo Afonso – MT	9	22
<i>M. oligolepis</i>	14°38'26.1" S, 56°49'41.7" W	32750; 32751 e 32752	Córrego Mamoeiro/ Denise – MT	8	0
	14°48'08.33" S, 57°07'25.18" W	32754	Córrego Corredeira/ Denise – MT	9	1
<i>M. bonita</i>	14°39'0.98" S, 57°26'11.62" W	32755 e 32756	Córrego São José/ Tangará da Serra – MT	3	1

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

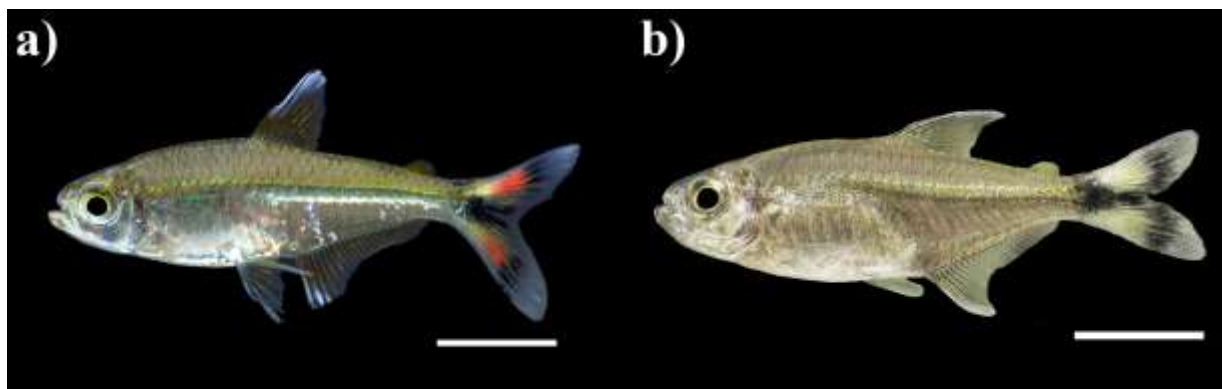
Legenda: LBP = Número de lote da Coleção de Peixes do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, Instituto de Biociências, UNESP. MT = Mato Grosso. W = Oeste. S = Sul. * = Em processo de registro.

As coletas dos espécimes foram realizadas empregando diferentes artefatos de pesca, tais como: rede de arrasto (10m de comprimento por 2,5m de altura e malha de 3mm entre nós opostos), bem como vara de bambu, linha de nylon e anzol. Os espécimes coletados foram transportados e acondicionados em sacos plásticos ou em caixas de isopor contendo água recém-retirada do ponto de coleta, proporcionando condições favoráveis à sobrevivência dos mesmos durante o deslocamento. Em laboratório, os peixes coletados foram aclimatados em aquários contendo água tratada previamente com condicionador de água para aquários e aeração constante. Por vezes, se utilizou um sistema de filtragem (filtros externos, *Hang On* e ou filtros internos de espumas) para remoção de partículas sólidas e alguns componentes químicos na água, garantindo água limpa e de qualidade.

Os espécimes analisados foram eutanasiados e retirados fragmentos de tecido renal/branquial para estudos citogenéticos mitóticos, gônadas para análises de cromossomos meióticos e fragmentos do fígado/músculo/nadadeira para estudos moleculares. Para a identificação do sexo foi realizado exame de gônadas, com auxílio de microscópio óptico, e/ou a presença de características sexuais secundárias – por exemplo, em espécimes vivos se observa, nos machos de *M. bonita*, uma pigmentação avermelhada nas nadadeiras anais, caudais e dorsais, enquanto as fêmeas apresentam uma pigmentação amarelada nessas nadadeiras (Figura 3.2) como descrito por Vanegas-Ríos et al. (2019) ou a verificação de ganchos ósseos (Figura 3.3),

presentes nos primeiros raios da nadadeira anal de *M. australis*, *M. cf. forestii* e *M. oligolepis* (BENINE; MARIGUELA; OLIVEIRA, 2009; REIA et al., 2019).

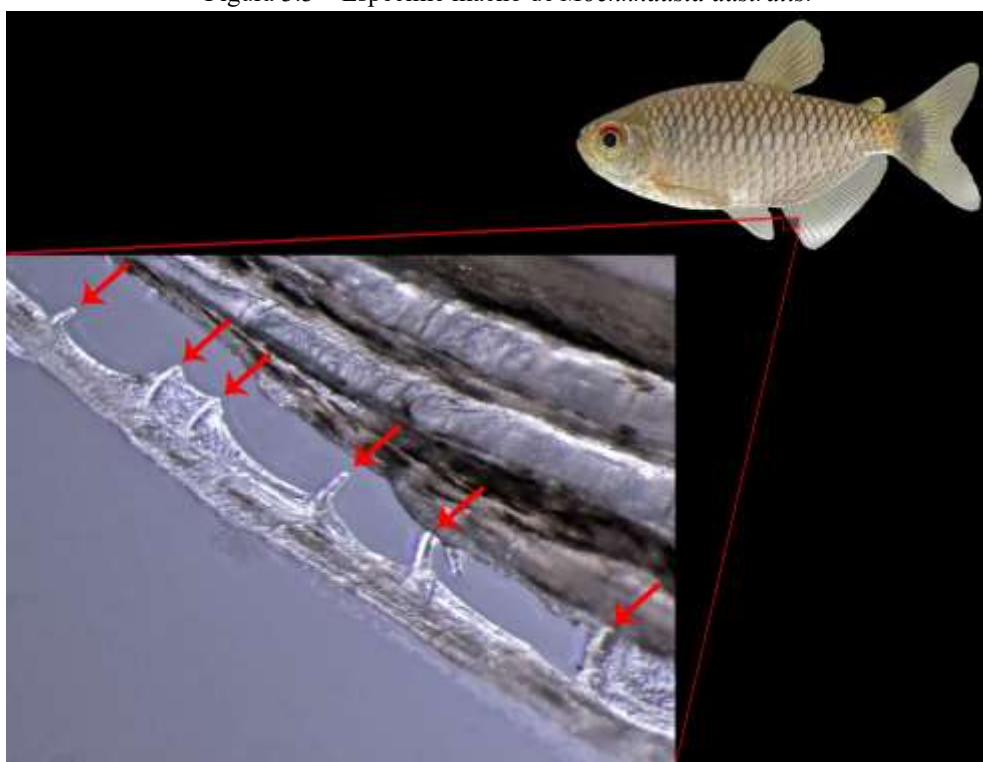
Figura 3.2 – Padrão de coloração em vida de *Moenkhausia bonita*



Fonte: Jefferson Crispim e Cristiano Neves (2023).

Legenda: em **a)** espécime macho caracterizado pelas nadadeiras alaranjadas ou avermelhadas; em **b)** espécime fêmea caracterizada pelas nadadeiras amareladas. Barra de escala 1 cm.

Figura 3.3 – Espécime macho de *Moenkhausia australis*.



Fonte: Jefferson Crispim, Enzo Emmerich e Cristiano Neves (2023).

Legenda: em detalhe a nadadeira anal indicando presença de ganchos ósseos (setas) presentes nos primeiros raios, levemente perceptível ao toque, por vezes observados em espécimes *M. australis*, *M. cf. forestii* e *M. oligolepis*.

Por fim, os espécimes foram conservados em álcool 70%, identificados e depositados na coleção ictiológica do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes da UNESP em Botucatu, São Paulo, Brasil, conforme registro de dados (ver Tabela 3.1).

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Estimulação mitótica

Com o objetivo de obter uma maior frequência de células em divisão mitótica, os animais foram submetidos à uma injeção prévia de solução de fermento biológico, conforme descrito por Cole et al. (1971) para anfíbios e répteis e adaptada por Bertollo et al. (1978) e Oliveira et al. (1988) para peixes. O procedimento utilizado consistiu em:

1. Preparar uma solução de fermento biológico na proporção de 0,5 g de fermento, 0,5 g de açúcar e 7 ml de água destilada;
2. Incubar a solução em uma estufa a 37 °C por cerca de 10 minutos;
3. Injetar a solução na região dorsolateral do peixe na proporção de 1 ml por 100 g de peso do animal;
4. Deixar o animal em aquário aquecido a 28 °C, bem aerado por cerca de 48 horas antes da eutanásia.

3.2.2 Técnica de preparação *in vivo* de cromossomos mitóticos em peixes

Para obtenção dos cromossomos metafásicos foi utilizado a técnica proposta por Foresti et al. (1981), com algumas adaptações. Esta técnica se baseia essencialmente na injeção de solução de colchicina, dissecação e obtenção de tecidos apropriados, com expressiva taxa de divisão celular e tratamento hipotônico das células antes de sua fixação e distribuição em lâminas de vidros. O procedimento utilizado consistiu em:

1. Injetar na região intra-abdominal uma solução aquosa de colchicina a 0,005% na proporção de aproximadamente 1 ml / 100 g de peso do animal;
2. Manter o peixe em aquário bem aerado por um período de 35 minutos;
3. Sacrificar o animal, retirando a porção anterior e posterior do rim e transferir o material para uma placa de Petri contendo 7 ml de solução hipotônica de cloreto de potássio – KCl (0,075 M);
4. Dissociar o material com o auxílio de pinças de dissecação e uma seringa hipodérmica de vidro, desprovida de agulha, até a obtenção de uma solução homogênea;
5. Transferir a suspensão de células obtida para um tubo de centrífuga e incubá-la em estufa a 37 °C por 21 minutos;

6. Retirar da estufa, gotejando 10 gotas de fixador (metanol e ácido acético na proporção de 3:1, respectivamente) gelado, agitar levemente com uma pipeta Pasteur e deixar repousar por 5 minutos a temperatura ambiente;
7. Adicionar cerca de 8 ml de fixador e homogeneizar novamente, centrifugar a 1000 rpm por 10 minutos;
8. Descartar o sobrenadante e ressuspender o precipitado em 7 ml de fixador, centrifugar por 10 minutos a 1000 rpm;
9. Repetir o passo anterior por 2 vezes;
10. Após a última lavagem, com fixador, descartar o sobrenadante e diluir o precipitado em aproximadamente 1 ml de fixador e transferir para tubos de microcentrífuga de 1,5 ml e armazenar em geladeira a $\sim 4^{\circ}\text{C}$.

3.2.3 Preparo de lâminas

1. Gotejar de 1 a 2 gotas da suspensão celular obtida no final da técnica de preparação de cromossomos mitóticos (**seção 3.2.2**), em diferentes regiões de uma lâmina previamente limpa;
2. Secar ao ar em temperatura ambiente por 5 – 10 minutos;
3. Corar com solução de Giemsa a 5% diluído em tampão fosfato (KH_2PO_4 0,06 M e Na_2HPO_4 0,449M, pH 6,8) por 8 minutos;
4. Analisar as lâminas, contendo as suspensões celulares coradas, em microscópio óptico.

3.2.4 Caracterização das Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONs)

Para a identificação das RONs foi utilizada a técnica de impregnação pelo Nitrato de Prata – AgNO_3 descrita por Howell & Black (1980). Essa técnica caracteriza-se pela reação química da Prata metálica com as proteínas acídicas que compõem o complexo proteico das regiões organizadoras de nucléolos. O procedimento envolveu o uso de duas soluções:

- Solução A (solução coloidal reveladora): 1 g de gelatina dissolvida em 50 ml de água destilada. Adiciona-se 0,5 ml de ácido fórmico.
- Solução B (solução de Nitrato de Prata): 1 g de AgNO_3 dissolvida em 2 ml de água destilada.

Com o uso destas soluções procedeu-se da seguinte maneira:

1. Hidrolisar o material por 3 minutos em ácido clorídrico, HCl 1 N a 60°C ;
2. Lavar em água destilada e secar a lâmina à temperatura ambiente;

3. Misturar em um tubo tipo Eppendorf, 3 gotas da solução A e 6 gotas da solução B com o auxílio de pipetas Pasteur;
4. Pingar 6 gotas da mistura sobre a lâmina e cobrir com uma lamínula;
5. Incubar a lâmina em um suporte no interior de um banho-maria a 65 °C com a lamínula voltada para baixo. Em aproximadamente 3 minutos a lâmina torna-se marrom-dourada;
6. Lavar a lâmina em água destilada e deixar secar ao ar à temperatura ambiente;
7. Se necessário corar com solução de Giemsa 5% em tampão fosfato (pH 6,8) por 10 segundos;
8. Lavar o material da lâmina e deixar secar ao ar à temperatura ambiente.

3.2.5 Detecção da heterocromatina constitutiva (banda C)

Para obtenção de bandas C foi utilizada a técnica descrita originalmente por Sumner (1972). Esta técnica baseia-se na ação sequencial de tratamentos com soluções ácida, básica e solução salina para eliminar seletivamente o DNA cromossômico, revelando as regiões de heterocromatina, que se encontram mais compactadas e sofrem menor ação dos tratamentos. O procedimento consistiu em:

1. Secar as lâminas recém pingadas ao ar por uma noite;
2. Hidrolisar as lâminas por 30 minutos em HCl 0,2 N à temperatura ambiente e lavar em água destilada;
3. Passar por solução de hidróxido de bário – Ba(OH)₂ a 5% a 60 °C por cerca de 15 segundos e lavar em água destilada;
4. Lavar rapidamente em HCl 1 N a 60 °C e, em seguida, em água destilada;
5. Incubar por 30 minutos em 2x SSC (pH 6,8) a 60 °C;
6. Montar as preparações com 15 µl de Vectashield/DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) e cobrir com lamínula.

3.2.6 Obtenção de cromossomos meióticos

Para a obtenção dos cromossomos meióticos em fase de paquíteno foi utilizada a metodologia descrita por Araya-Jaime et al. (2015b). Esta técnica se baseia na dissociação das gônadas, bem como o espalhamento de meiócitos e sua fixação em lâminas com solução de

Paraformaldeído. Todas as soluções foram ajustadas a um pH de 8,5 com tetraborato de sódio 0,1 M. O procedimento utilizado consistiu em:

1. Sacrificar os indivíduos com uma overdose de benzocaína 1%;
2. Remover as gônadas (testículos ou ovários) e imergi-las em 200 µl de solução de Hanks (sigma) gelada em uma placa de Petri. O volume de solução salina deve representar três vezes o volume de tecido;
3. Dissociar o tecido com o auxílio de pinças para obter uma suspensão celular homogênea;
4. Transferir a suspensão celular para um tubo de 1,5 ml e decantar por 30 min no gelo;
5. Transferir uma gota da suspensão de células (aproximadamente 20 µl) no centro de uma lâmina de vidro limpa e seca, evitando-se a presença de detritos celulares;
6. Adicionar 2 gotas de sacarose 0,2 M e 2 gotas de Triton X-100 0,2% nas suspensões;
7. Incubar as preparações contendo as suspensões celulares de testículos (4 min) e de ovários (7 min) a 37 °C;
8. Fixar as células, nas lâminas, adicionando 10 gotas de solução de paraformaldeído 4% pH 8.5, por 15 min;
9. Remover o excesso de líquido com papel absorvente e deixar secar à temperatura ambiente por 3 horas;
10. Lavar as lâminas 3 vezes em solução Kodak photo-flo 200 a 0,08% (Kodak) e secar em posição vertical;
11. Avaliar a qualidade das preparações corando com AgNO₃ de acordo com o protocolo descrito por Howell; Black (1980);
12. Armazenar as preparações em freezer a – 20 °C até seu uso.

3.2.7 Extração de DNA genômico

O DNA genômico foi obtido a partir de amostras de tecido de fígado, músculo ou nadadeiras preservadas em etanol 95%, utilizando-se o *Kit Wizard Genomic DNA Purification* (Promega), conforme instruções do fabricante.

3.2.8 Preparo das sondas de DNA genômico

Todas as sondas utilizadas para o mapeamento físico nos cromossomos foram compostas por DNA repetitivo amplificadas por Reação em cadeia da polimerase (PCR) a partir do DNA genômico de espécimes de *M. australis*.

As sequências de DNAr 5S foram amplificadas utilizando *primers* descrito por Pendás et al. (1994). Em reação de PCR secundária, os *amplicons*, foram marcados pela incorporação da Digoxigenina 11-dUTP (Roche). As reações de PCR foram preparadas para um volume final de 25 µl, utilizando 2 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); 2,5 mM de MgCl₂; 10X de Taq DNA buffer (20 mM Tris-HCL, pH 8,4 e 50 mM KCl); 0,5 U de Taq polimerase (Life Technologies); 0,2 µM de cada primer; 20 ng de DNA genômico e água *DNase-free* ultrapura. As reações de amplificação/marcação foram realizadas em um termociclador PTC-100TM (MJ Research), de acordo com as seguintes condições:

	95 °C por 1 minutos
35 ciclos	95 °C por 30 segundos
	56 °C por 35 segundos
	72 °C por 45 segundos
	72 °C por 7 minutos
	12 °C manutenção

Todos os produtos gerados, pelas respectivas PCR, foram checados por meio de eletroforese em gel de agarose a 1% utilizando tampão TAE 1X.

As sequências de DNAr 18S foram amplificadas utilizando os *primers* de DNAr 18S descrito por Utsunomia et al. (2016). Em reação de PCR secundária, os *amplicons*, foram marcados pela incorporação de Biotina-16-dUTP (Roche). As reações de PCR foram preparadas para um volume final de 25 µl, utilizando 2mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); 2,5 mM de MgCl₂; 10X de Taq DNA buffer (20 mM Tris-HCL, pH 8,4 e 50 mM KCl); 0,5 U de Taq polimerase (Life Technologies); 0,2 µM de cada primer; 20 ng de DNA genômico e água *DNase-*

free ultrapura. As reações de amplificação/marcação foram realizadas em um termociclador PTC-100TM (MJ Research), de acordo com as seguintes condições:

95 °C por 5 minutos
35 ciclos { 95 °C por 30 segundos
54 °C por 35 segundos
72 °C por 45 segundos
72 °C por 7 minutos
12 °C manutenção

Todos os produtos gerados, pelas respectivas PCR, foram checados por meio de eletroforese em gel de agarose a 1% utilizando tampão TAE 1X.

3.2.9 Microdissecção cromossômica

Os procedimentos para a microdissecção cromossômica dos cromossomos B de indivíduos de diferentes espécies de *Moenkhausia* envolvem a utilização da metodologia descrita por Pansonato-Alves et al. (2014), com algumas adaptações:

1. Pingar sobre lamínulas (24 mm X 60 mm) previamente limpas duas gotas de suspensões celulares obtidas pela técnica de preparação de cromossomos mitóticos (seção 3.2.2);
2. Secar o material ao ar em temperatura ambiente por 2 – 3 minutos;
3. Corar com solução tamponada de Giemsa 5% (pH 6.8) por 8 minutos;
4. Lavar as lamínulas com água destilada e mantê-las em câmara úmida até serem analisadas em microscópio;
5. Analisar as lamínulas contendo as suspensões celulares coradas em microscópio invertido Zeiss Axiovert 100;
6. Microdissecar o cromossomo de interesse com o auxílio de um capilar de vidro de borossilicato, presente em um micromanipulador Eppendorf TransferMan NK2 acoplado ao microscópio invertido Zeiss Axiovert 100;
7. Quebrar o capilar, contendo o cromossomo microdissecado, em um tubo de microcentrífuga tipo Eppendorf de 0,2 ml (tubo de PCR), contendo 9 µl de água *DNase-free* ultrapura;
8. Realizar a amplificação descrita na seção 3.2.10.

3.2.10 Amplificação do material microdissecado e marcação

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

O kit WGA4 é formulado para amplificar o genoma de uma única célula, produzindo grande quantidade de DNA genômico no final do processo. No entanto, resultados satisfatórios são observados na utilização desse kit para amplificação de DNA de cromossomos microdissecados por exemplo (GRIBBLE et al., 2004; KOSYAKOVA et al., 2013; PANSONATO-ALVES et al., 2014; SILVA et al., 2014; VALENTE et al., 2014). Em resumo, o kit WGA4 representa uma tecnologia baseada na fragmentação aleatória do DNA de interesse, gerando fragmentos pequenos que são ligados a adaptadores. Esse processo resulta em uma biblioteca amplificável por PCR. A amplificação do DNA microdissecado seguiu o protocolo de Gribble et al., (2004) e instruções do fabricante, com pequenas modificações.

Lise e fragmentação:

1. Isolar um único cromossomo usando a microdissecção ou outro método.
2. Transferir o cromossomo isolado para um Tubos de PCR de 0,2 ml contendo 9 µl de água *DNase-free* ultrapura.
3. Preparar uma solução de trabalho (Working Solution) adicionando 1 µl de “Proteinase K Solution” a 16 µl de “10X Single Cell Lysis & Fragmentation Buffer”. Agite bem no vórtex.
4. Adicionar 1 µl da *Working Solution* recém-preparada ao tubo contendo os cromossomos microdissecados. Misture bem.
5. Incubar a mistura de DNA no termociclador a 50 °C por 1 hora e, em seguida, aquecer a 99 °C por EXATAMENTE quatro minutos. Resfriar no gelo e centrifugar brevemente antes de preparar a biblioteca.

Geração de biblioteca:

6. Adicionar 2 µl de “1X Single Cell Library Preparation Buffer” e 1 µl “Library Stabilization Solution” a cada tubo contendo a mistura de DNA obtida no passo cinco.
7. Misturar bem e colocar no termociclador a 95 °C por 2 minutos. Resfriar a amostra no gelo, centrifugar brevemente e manter novamente no gelo.
8. Adicionar 1 µl de “Library Preparation Enzyme”, misturar bem e centrifugar brevemente.
9. Colocar a amostra em um termociclador e incube da seguinte forma:

16 °C por 20 minutos
24 °C por 20 minutos
37 °C por 20 minutos
75 °C por 5 minutos
12 °C manutenção

10. Remover as amostras do termociclador e centrifugar brevemente. As amostras foram amplificadas imediatamente ou armazenadas a - 20 °C por até três dias.

Amplificação por PCR:

11. Adicionar os seguintes reagentes a toda a reação de 14 µl:

7.5 µl de “10X Amplification Master Mix”
48.5 µl de “Water, Molecular Biology Reagent”
5.0 µl de “WGA DNA Polymerase”

12. Misturar bem e incubar no termociclador utilizando o seguinte programa:

95 °C por 3 minutos
25 ciclos { 94 °C por 30 segundos
65 °C por 5 minutos
12 °C manutenção

13. Remover as amostras do termociclador, misturar bem e centrifugar brevemente. Verificar os produtos da PCR por meio de eletroforese em gel de agarose a 1% utilizando tampão TAE 1X.
14. Manter as reações a 4 °C ou armazenar a - 20 °C.

GenomePlex® Whole Genome Reamplification (WGA3 – Sigma)

O kit WGA3 permite reamplificação de produtos WGA (2 e 4) de forma eficiente e com alto rendimento. As sondas de pintura cromossômica foram preparadas usando 10 ng de DNA microdissecado amplificado pelo WGA4. No processo de reamplificação com o WGA3, o nucleotídeo digoxigenina 11-dUTP foi incorporado seguindo os parâmetros conforme instruções do fabricante, com pequenas modificações:

1. Para cada reação de reamplificação adicionar os seguintes reagentes aos Tubos de PCR de 0,2 ml:

15 µl de “Nuclease-Free Water”
2,5 µl de “10X Amplification Master Mix”
1,7 µl de “WGA DNA Polymerase”
1,0 µl de dATP (2 mM)
1,0 µl de dCTP (2 mM)
1,0 µl de dGTP (2 mM)
0,6 µl de dTTP (2 mM)
0,4 µl de 11-dUTP (2 mM)
2,0 µl de DNA amplificado pelo WGA4

2. Misturar bem e incubar no termociclador utilizando o seguinte programa:

95 °C por 3 minutos
25 ciclos { 94 °C por 30 segundos
65 °C por 5 minutos
12 °C manutenção

3. Remover as amostras do termociclador, misturar bem e centrifugar brevemente. Verificar os produtos da PCR por meio de eletroforese em gel de agarose a 1% utilizando tampão TAE 1X.
4. Manter as reações a 4 °C ou armazenar a - 20 °C.

Por último, as sondas de DNA microdissecados, aqui produzidas, foram denominadas utilizando as iniciais de cada espécie analisadas (MaB para *M. australis*, MfB para *M. cf. forestii*, MoB para *M. oligolepis* e MbB para *M. bonita*).

3.2.11 Imunocoloração de espermátócitos

Para visualização do complexo sinaptonêmico utiliza-se anticorpos específicos para peixes, bem como anticorpos comerciais derivados de mamíferos. Como descrito por Araya-Jaime et al. (2015b), deve-se seguir os seguintes passos:

1. Lavar as lâminas três vezes em PBS 1x por 5 min. NÃO deixar as lâminas secarem;
2. Incubar as lâminas em tampão citrato 0,01 M (pH 6) a 95 °C por 20 min;

3. Deixar esfriar à temperatura ambiente por 20 min;
4. Lavar três vezes em PBS 1x por 2 min por vez;
5. Incubar com anticorpo primário (1:100 em PBS 1x) adicionando 25 µl por lâmina e cobrir com lamínula, deixando por 1:30 horas a 37 °C em câmara úmida ou *overnight* à 4 °C;
6. Lavar três vezes em PBS 1X, por 5 min por vez, à temperatura ambiente;
7. Incubar com anticorpo secundário (1:100 em PBS 1x), adicionando 25 µl por lâmina e cobrir com lamínula por 40 min a 37 °C em câmara úmida;
8. Lavar três vezes em PBS 1x, por 5 minutos por vez;
9. Montar as preparações com 15 µl de Vectashield/DAPI e cobrir com lamínulas.

3.2.12 Hibridização *in situ* (FISH)

A aplicação da técnica de FISH foi realizada com base nos procedimentos adotados por Pinkel et al. (1986), com adaptações implementadas no Laboratório de Biologia e Genética de Peixes do Departamento de Morfologia IB/UNESP, conforme descrito a seguir:

- **Etapa 1: Preparação das lâminas**

1. Lavar as lâminas em PBS 1x por 5 minutos à temperatura ambiente e desidratadas em série de etanol a 70%, 85% e 100% a 20 °C negativos por 3 minutos em cada banho;
2. Tratar as lâminas com solução de RNase (100 µg/ml) por 1 hora em câmara úmida a 37 °C, em seguida lavadas 2 vezes em 2x SSC por 5 minutos e uma vez em PBS 1x por 5 minutos;
3. Tratar as lâminas com pepsina 0,005% (em HCl 10 mM) por 10 minutos a 37 °C, em seguida; lavar em PBS 1x à temperatura ambiente por 5 minutos;
4. Fixar as lâminas com formaldeído 1% (em PBS 1x / MgCl₂ 50 mM) por 10 minutos a temperatura ambiente;
5. Lavar as lâminas, depois de fixadas, em PBS 1x por 5 minutos e desidratar em série de etanol a 70%, 85% e 100% a 20 °C negativos por 3 minutos em cada banho;

6. Secar as lâminas, em seguida desnaturar as lâminas em formamida 70% a 70 °C por 5 minutos;
 7. Desidratar em série de etanol a 70%, 85% e 100% a 20 °C negativos por 3 minutos em cada banho;
 8. Simultaneamente à desnaturação das lâminas, desnaturar a solução de hibridação (10% Sulfato Dextrano, 50% formamida e 20x SSC e água) contendo 2 µl de sonda marcada por 10 minutos a 95 °C;
 9. Colocar 30 µl de solução de hibridação sobre a lâmina, cobrir com lamínula e manter em câmara úmida a 37 °C *overnight*.
- **Etapa 2: Detecção dos sinais correspondentes**
 1. Lavar as lâminas 2 vezes em solução de formamida 15% / 0,2x SSC a 42 °C por 10 minutos cada, após a hibridação.
 2. Lavar 3 vezes em solução de 0,1x SSC a 60 °C por 5 minutos cada e uma vez em solução Tween 0,5% / 4x SSC à temperatura ambiente por 5 minutos;
 3. Cobrir, após as 3 primeiras lavagens, as lâminas com 50 µl de solução de bloqueio (leite em pó e 4x SSC) por 15 minutos e lavar 2 vezes em Tween 0,5% / 4x SSC à temperatura ambiente.
 4. Incubar as lâminas com 100 µl de solução de bloqueio com anticorpo (100 µl de solução de bloqueio e 0,5 µl de antidigoxigenina rondamina mais 1 µl de avidina conjugada com FITC) por 1 hora em câmara úmida e no escuro a 37 °C;
 5. Lavar as lâminas 3 vezes em solução de Tween 0,5% / 4x SSC por 5 minutos;
 6. Desidratar as lâminas em série de etanol 70%, 85% e 100% a 20 °C negativos por 5 minutos em cada banho;
 7. Secar ao ar e montar as lâminas com 15 µl de Vectashield/DAPI e cobrir com lamínulas.

3.2.13 Montagem dos cariótipos e análise dos dados

As metáfases que apresentaram melhor dispersão e morfologia mais nítida dos cromossomos foram fotografadas em microscópio de epifluorescência (Olympus® BX61) com câmera digital Olympus® DP80, usando-se o *software cellSens Dimension* versão 1 (Olympus®). Com a utilização de software de edição de imagens os cromossomos foram isolados, classificados e arranjados de acordo com seu tamanho e sua morfologia em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a), seguindo critérios descritos por Levan et al. (1964).

CAPÍTULO 4 DIVERSIDADE CARIOTÍPICA E PINTURA CROMOSSÔMICA EM QUATRO ESPÉCIES DE *MOENKHAUSIA* (CHARACIFORMES, CHARACIDAE)

4.1 RESUMO

Foram caracterizadas citogeneticamente quatro espécies de peixes do gênero *Moenkhausia*, sendo *M. australis*, *M. cf. forestii*, *M. oligolepis* e *M. bonita*, coletadas em diferentes rios e riachos da bacia do alto rio Paraguai. As análises cariotípicas envolveram a aplicação de técnicas citogenéticas clássicas e moleculares. Todas as espécies e populações analisadas apresentaram cariótipos com número diploide de $2n = 50$ cromossomos, com variações interespecíficas nas fórmulas cariotípicas. O bandamento C revelou padrões de bandas heterocromáticas similares entre essas espécies, com exceção de *M. bonita*. As regiões organizadoras de nucléolos identificadas nas preparações cromossômicas pela coloração com Nitrato de Prata e pela sonda de DNAr 18S, mostraram-se simples nas quatro espécies, com marcação nos cromossomos de um único par. Os sítios de DNAr 5S apresentaram-se distribuídos em múltiplos cromossomos em todas as espécies, ocupando preferencialmente posição intersticial nos cromossomos portadores. Cromossomos B foram observados nas quatro espécies analisadas, mostrando morfologia e frequências distintas nestas espécies. Os cromossomos B observados nestas espécies apresentaram distintos padrões de heterocromatina, sendo evidenciados cromossomos B totalmente ou parcialmente heterocromáticos, bem como eucromáticos. Os experimentos de pintura cromossômica mostraram o compartilhamento de sequências de DNA entre estes elementos genômicos supranumerários e os cromossomos do complemento A. Neste contexto, os resultados obtidos se apresentam como novas informações citogenéticas de espécies e populações de *Moenkhausia*, proporcionando uma melhor comparação entre espécies filogeneticamente próximas deste grupo de peixes. Além disso, também contribui para a descrição de novas ocorrências de cromossomos B.

Palavras-chave: citogenética; famílias multigênicas; mapeamento cromossômico; DNA repetitivo; pintura cromossômica.

4.2 ABSTRACT

Four species of fish of the genus *Moenkhausia* were characterized cytogenetically, being *M. australis*, *M. cf. forestii*, *M. oligolepis* and *M. bonita* collected in different rivers and streams of the upper Paraguai River basin. Karyotypic analyzes involved the application of classical and molecular cytogenetic techniques. All species and populations analyzed showed karyotypes with a diploid number of $2n = 50$ chromosomes, with interspecific variations in the karyotypic formulas. C-banding revealed similar heterochromatic banding patterns among these species, except for *M. bonita*. The nucleolus organizer regions identified in the chromosome preparations by staining with Silver Nitrate and by the 18S rDNA probe were simple in the four species, with staining in the chromosomes of a single pair. The 5S rDNA sites were distributed in multiple chromosomes in all species, preferentially occupying an interstitial position in the carrier chromosomes. B chromosomes were observed in the four species analyzed, showing distinct morphology and frequencies in these species. The extra chromosomes observed in these species revealed diverse heterochromatin patterns, showing totally or partially heterochromatic B chromosomes and euchromatic ones. The chromosome painting experiments showed the sharing of DNA sequences between these supernumerary genomic elements and the chromosomes of the A complement chromosomes. In this context, the results obtained present new cytogenetic information on species and populations of *Moenkhausia*, providing a more proper comparison between phylogenetically close species of this fish group. In addition, it equally contributes to the description of new occurrences of B chromosomes.

Keywords: cytogenetics, multigene families, chromosome mapping, repetitive DNA, chromosome painting.

4.3 RESUMEN

Se caracterizaron citogeneticamente cuatro especies de peces del género *Moenkhausia*, siendo *M. australis*, *M. cf. forestii*, *M. oligolepis* y *M. bonita*, colectadas en diferentes ríos y arroyos de la cuenca alta del río Paraguai. Los análisis cariotípicos implicaron la aplicación de técnicas de citogenética clásica y molecular. Todas las especies y poblaciones analizadas mostraron cariotipos con un número diploide de $2n = 50$ cromosomas, con variaciones interespecíficas en las fórmulas cariotípicas. Las bandas C revelaron patrones de bandas de heterocromatina similares entre estas especies, con la excepción de *M. bonita*. Las regiones organizadoras del nucléolo identificadas en las preparaciones cromosómicas por tinción con nitrato de plata y por la sonda 18S ADNr fueron simples en las cuatro especies, con tinción en un solo par de cromosomas. Los sitios 5S ADNr estaban distribuidos en múltiples cromosomas en todas las especies, ocupando preferentemente una posición intersticial en los cromosomas portadores. Se han observado cromosomas B en las cuatro especies analizadas, que muestran una morfología y frecuencias distintas en estas especies. Los cromosomas B observados en estas especies mostraron diferentes patrones de heterocromatina, con cromosomas B total o parcialmente heterocromáticos, así como eucromáticos. Los experimentos de pintura cromosómica mostraron la compartición de secuencias de ADN entre estos elementos genómicos supernumerarios y los cromosomas del complemento A. En este contexto, los resultados obtenidos presentan nueva información citogenética de especies y poblaciones de *Moenkhausia*, proporcionando una mejor comparación entre especies filogenéticamente próximas de este grupo de peces. Además, también contribuyen a la descripción de nuevas apariciones de cromosomas B.

Palabras clave: citogenética; familias génicas; cartografía cromosómica; ADN repetitivo; pintura cromosómica.

4.4 INTRODUÇÃO

Moenkhausia Eigenmann 1903 é um dos mais diversificados gêneros de peixes da família Characidae, possuindo ampla distribuição em rios e riachos da região Neotropical (REIS; KULLANDER; FERRARIS, 2004). Composto por 98 espécies válidas, os componentes do gênero *Moenkhausia* apresentam maior diversidade em corpos d'água na bacia Amazônica e Guianas, onde estão presentes mais de 80% (74 spp.) das espécies válidas (DAGOSTA; PINNA, 2019; FRICKE; ESCHMEYER; VAN DER LAAN, 2023; LIMA et al., 2003). Estudos filogenéticos envolvendo as espécies de *Moenkhausia* têm reconhecido a natureza polifilética deste grupo (BENINE; CASTRO; SANTOS, 2007; COSTA, 1994). Neste sentido, Mariguela et al. (2013) e Mirande (2019) apresentam duas árvores filogenéticas em que se observam espécies de *Moenkhausia* distribuídas em clados monofiléticos contendo diferentes gêneros como *Bario*, *Hemigrammus*, *Hasemania*, entre outros. Complexos de espécies também são identificados em diferentes estudos neste gênero (BENINE; MARIGUELA; OLIVEIRA, 2009; DAGOSTA; MARINHO; BENINE, 2015; REIA et al., 2019).

Até o presente, as informações citogenéticas disponíveis envolvendo os representantes do gênero *Moenkhausia* têm mostrado uma baixa variação do número diploide modal ($2n$), que se apresenta com 48 a 50 cromossomos, sendo predominante nos cariótipos a presença de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos (DANTAS et al., 2007; PORTELA-CASTRO; JÚLIO-JÚNIOR, 2002). Este aparente estado de conservação da macroestrutura cariotípica não se mantém quando se analisa as pequenas regiões dos cariótipos de *Moenkhausia*, sendo que variações na microestrutura cariotípica envolvendo distintos padrões de distribuição das Regiões Organizadoras de Nucléolos (RONs), bem como variação da posição dos blocos heterocromáticos são observadas em níveis intra- e interespecíficos (DANTAS et al., 2007; FORESTI; ALMEIDA-TOLEDO; TOLEDO, 1989; HASHIMOTO et al., 2012; NASCIMENTO et al., 2020; PORTELA-CASTRO; JÚLIO JÚNIOR; NISHIYAMA, 2001; PORTELA; GALETTI; BERTOLLO, 1988; RANUCCI et al., 2021; SÁNCHEZ; TAKAGUI; FENOCCHIO, 2021).

Outra característica citogenética de importância observada no gênero *Moenkhausia* é a presença de cromossomos B, frequentemente encontrados em células de diferentes espécies e ou populações deste gênero. Notavelmente, estes elementos supranumerários podem variar em relação à sua morfologia, distribuição e até mesmo estarem restritos a apenas um dos sexos, como observado em populações de *M. sanctaefilomenae* (DANTAS et al., 2007; FORESTI; ALMEIDA-TOLEDO; TOLEDO, 1989; PORTELA-CASTRO; JÚLIO-JÚNIOR, 2002;

PORTELA; GALETTI; BERTOLLO, 1988) e *M. australis* (presente trabalho). Em alguns casos, a presença de RONS ativas foram identificadas nos cromossomos B de *M. sanctaefilomenae* (FORESTI; ALMEIDA-TOLEDO; TOLEDO, 1989; HASHIMOTO et al., 2012; SCUDELER et al., 2015; UTSUNOMIA et al., 2016).

Estudos citogenéticos, utilizando técnicas de sequenciamento massivo revelaram a ocorrência de diferentes genes e sequências de DNA satélite, possibilitando a formulação de hipóteses sobre a origem ou a identidade de possível cromossomo ancestral dos cromossomos supranumerários (revisão em CAMACHO et al., 2021). Dados relacionados a esse tema são destacados no trabalho de Utsunomia et al. (2016), onde são integrados dados de microdissecção cromossômica, Sequenciamento de Nova Geração (NGS) e aplicação da técnica de hibridação *in situ* (FISH), com estudo detalhado da composição do DNA que resultaram na proposição de hipóteses sobre a origem dos microcromossomos B de *M. sanctaefilomenae*.

A produção de sondas a partir de técnicas de microdissecção e pintura cromossômica total (WCP - *Whole Chromosome Painting*) também têm sido utilizadas com sucesso no estudo de espécies como *M. oligolepis* e *M. sanctaefilomenae*. Os resultados de WCP têm permitido a melhor caracterização dos cromossomos B, assim como a geração de hipóteses sobre os rearranjos cromossômicos que culminaram nas variantes observadas nas diferentes espécies de *Moenkhausia* (SANTOS et al., 2021; SCUDELER et al., 2015; UTSUNOMIA et al., 2016). Considera-se, pois, que a aplicação da técnica de WCP em outras espécies e populações de *Moenkhausia* poderia agregar novas informações sobre a origem dos cromossomos B. Nesse sentido, *Moenkhausia australis*, *M. cf. forestii*, *M. oligolepis* e *M. bonita* foram citogeneticamente estudadas a fim de determinar o número diploide, composição cariotípica, distribuição da heterocromatina constitutiva, mapeamento físico de sequências de DNAr 5S e 18S e a descrição morfológica dos cromossomos B encontrados nessas quatro espécies.

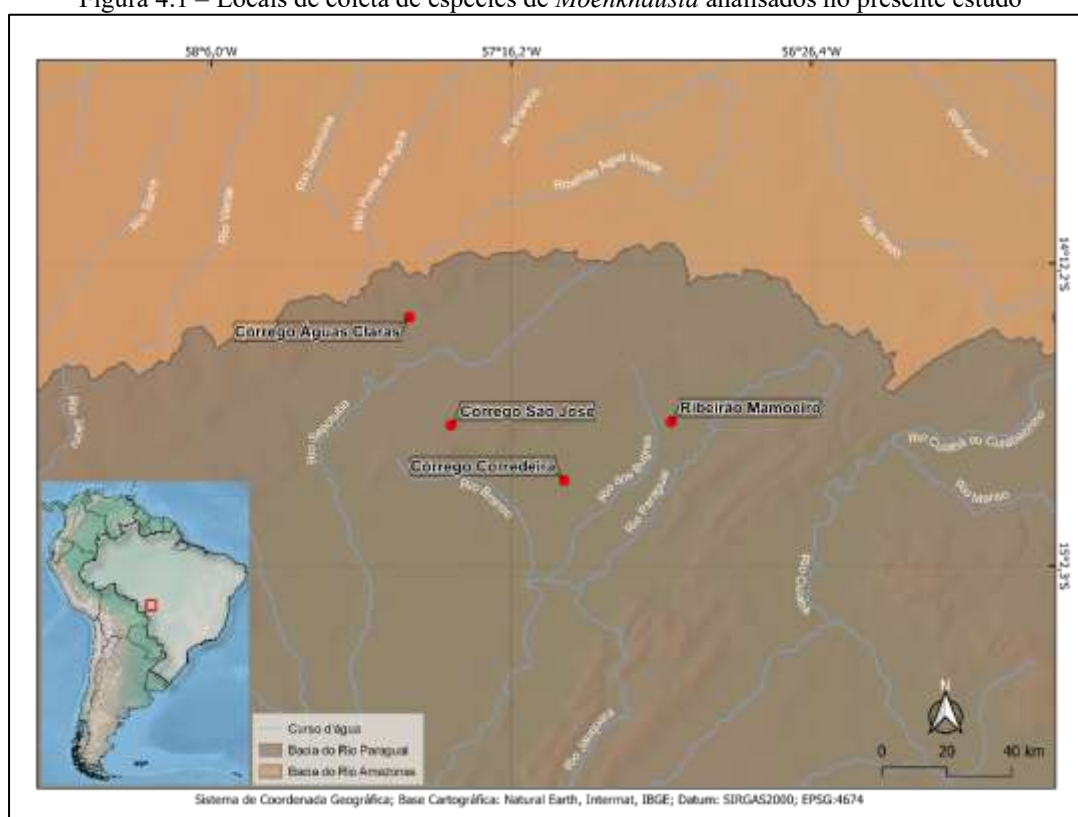
Os dados observados podem revelar a dinâmica evolutiva de sequências repetitivas que compõem esses elementos genômicos extras e abrem caminhos para novas hipóteses sobre a origem dos cromossomos B. Além disso, são apresentadas novas ocorrências de cromossomos B em *M. australis*, *M. cf. forestii*, *M. oligolepis* e *M. bonita* aqui descritas, complementadas pela geração e aplicação de sondas eficientes de WCP para as quatro espécies, que se mostraram capazes de identificar os cromossomos B e revelaram marcações em algumas regiões dos cromossomos do complemento A. Por fim, sugere-se que a incidência de cromossomos B nos táxons do “clado 5”, composto por *M. australis*, *M. cf. forestii*, *M. oligolepis* e *M. sanctaefilomenae* seja um caráter útil, capaz de contribuir com as discussões a respeito das relações filogenéticas deste grupo.

4.5 MATERIAL E MÉTODOS

4.5.1 Locais de coleta e análise citogenética

Foram analisadas quatro espécies de peixes do gênero *Moenkhausia* coletadas em riachos de cabeceira do alto rio Paraguai, MT, Brasil (Figura 4.1). As amostras foram coletadas de acordo com a autorização concedida por órgãos reguladores (autorização MMA/IBAMA/SISBIO – número 70988).

Figura 4.1 – Locais de coleta de espécies de *Moenkhausia* analisados no presente estudo



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Legenda: Córrego Águas Claras ponto de *Moenkhausia* cf. *forestii*; Córrego Corredeira ponto de *Moenkhausia australis*; Córrego São José ponto de *Moenkhausia bonita*; Ribeirão Mamoeiro ponto de *Moenkhausia australis* e *Moenkhausia oligolepis*.

Os procedimentos de amostragem, manutenção e análise dos peixes foram realizados de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com aprovação (nº 4790080722) da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual Paulista/Instituto de Biociências de Botucatu (IBB/UNESP).

Os espécimes foram previamente eutanasiados para a coleta de material, para a realização das preparações cromossômicas e análises moleculares, sendo, então, conservados em álcool

70%, identificados e depositados na coleção ictiológica do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes – LBP da UNESP em Botucatu, São Paulo, Brasil (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 – Informações sobre os locais e espécimes de *Moenkhausia* coletados

Espécies	Coordenadas	Localidade/Município	Sub-bacia	LBP	Nº Amostral	
					M	F
<i>Moenkhausia australis</i>	14°38'26.1" S, 56°49'41.7" W	Córrego Mamoeiro/ Denise - MT	Rio Bugres	32746 e 32747	4	4
	14°48'08.33" S, 57°07'25.18" W	Córrego Corredeira/ Denise - MT		32753	1	0
<i>M. oligolepis</i>	14°38'26.1" S, 56°49'41.7" W	Córrego Mamoeiro/ Denise - MT		32750, 32751 e 32751	9	22
<i>M. bonita</i>	14°39'0.98" S, 57°26'11.62" W	Córrego São José/ Tangará da Serra - MT	Rio Sepotuba	32755 e 32756	9	1
<i>M. cf. forestii</i>	14°21'03.2" S, 57°33'07.2" W	Córrego Águas Claras/ Santo Afonso - MT		*	3	1

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Legenda: LBP = Número de lote da coleção de peixes do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, Instituto de Biociências, Instituto de Biociências, UNESP. Nº = Número amostral. UNESP; F = fêmea; M = macho; * em processo de registro; S = Sul, W = Oeste; MT = Mato Grosso; * = Em processo de registro.

Para a identificação do sexo dos espécimes coletados foi realizado o exame das gônadas com auxílio de microscópio óptico e/ou a presença de características sexuais secundárias, sendo observado nos espécimes vivos machos de *M. bonita* uma pigmentação avermelhada nas nadadeiras anais, caudais e dorsais, enquanto as fêmeas apresentavam uma pigmentação amarelada nessas nadadeiras, como descrito por Vanegas-Ríos et al. (2019). Em *M. australis*, *M. cf. forestii* e *M. oligolepis*, as características sexuais secundárias se apresentaram na forma de pequenos ganchos ósseos nos primeiros raios da nadadeira anal dos machos adultos sexualmente maduros, característica esta levemente perceptível ao tato (BENINE; MARIGUELA; OLIVEIRA, 2009; REIA et al., 2019).

As preparações de cromossomos mitóticos foram obtidas do tecido renal e branquial utilizando o protocolo proposto por Foresti et al. (1981). A morfologia cromossômica foi determinada de acordo com a relação de braços estabelecida por Levan et al. (1964). Os cromossomos foram classificados como metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a) e arranjados em ordem decrescente de tamanho para a montagem final dos cariótipos. As técnicas de citogenética clássica envolveram a marcação das RONS pelo Nitrato de Prata (AgNO₃) proposta por Howell e Black (1980) e o bandamento C descrito por Sumner (1972), com pequenas modificações.

4.5.2 Amplificação dos genes ribossômicos

A amplificação das sequências de DNAr 5S e 18S foi realizada por PCR a partir do DNA genômico extraído de um espécime de *M. australis*. Foram utilizados os *primers* descritos por Pendás et al. (1994) e Utsunomia et al. (2016) para amplificação de DNAr 5S e 18S, respectivamente. As sondas foram marcadas com digoxigenina-11-dUTP (Roche®) ou biotina-16-dUTP (Roche®), em reações de PCR secundárias. Os produtos gerados pelas respectivas PCR foram verificados em gel de agarose a 1% em tampão TAE.

4.5.3 Microdissecção cromossômica e obtenção de sondas

As suspensões celulares obtidas pela técnica de preparação de cromossomos mitóticos foram gotejadas sobre laminulas (24 mm X 60 mm) previamente limpas. Após rápida secagem em temperatura ambiente, o material foi corado com solução tamponada de Giemsa 5% (pH 6.8) por cinco minutos. As laminulas contendo as suspensões celulares coradas foram mantidas em câmara úmida até serem analisadas em microscópio invertido Zeiss Axiovert 100. A microdissecção cromossômica foi realizada com o auxílio de um tubo capilar de vidro de borossilicato presente em um micromanipulador Eppendorf TransferMan NK2 acoplado a um microscópio invertido Zeiss Axiovert 100.

Para a amplificação das sequências e produção de sondas de DNA, foram microdissecados cromossomos B de diferentes morfologias, das espécies em estudo: i) um metacêntrico pequeno encontrado no indivíduo 106067 de *M. bonita*; ii) um acrocêntrico encontrado no indivíduo 85794 em *M. australis*; iii) um metacêntrico pequeno encontrado no indivíduo 106171 em *M. oligolepis*; e iv) quatro microcromossomos metacêntricos encontrados no indivíduo 106175 de *M. cf. forestii* (ver Figura 4.5, d).

Os cromossomos microdissecados foram transferidos para um tubo de PCR (0.2 ml) contendo 9 µl de água *DNase-free* ultrapura e, em seguida, foram amplificados utilizando o *GenomePlex® Single Cell Whole Genome Amplification Kit* (WGA4-Sigma) como descrito por Gribble et al. (2004), com pequenas modificações. Para aumentar a quantidade de sequências do DNA microdissecado foi realizado um segundo ciclo completo de amplificação com WGA4. Nesse segundo ciclo de WGA4, foram utilizados 9 µl de DNA molde (*amplicon*) gerados no primeiro ciclo e o produto gerado foi utilizado como DNA molde na produção da sonda de DNA (SondaB), que foi marcada com digoxigenina-11-dUTP ou biotina-16-dUTP (Roche Applied Science) utilizando o *GenomePlex® Whole Genome Reamplification* (WGA3-Sigma), conforme o protocolo do fabricante. Todos os produtos gerados pelas PCR foram analisados em gel de agarose a 1% em tampão TAE. As sondas do DNA microdissecado aqui produzidas foram

denominadas utilizando as iniciais de cada espécie analisada, sendo MaB para *M. australis*; MfB para *M. cf. forestii*; MoB para *M. oligolepis* e MbB para *M. bonita*.

4.5.4 Hibridização in situ (FISH) e Pintura Cromossômica Total (WCP)

O mapeamento físico das sequências dos genes ribossômicos e das sondas de pintura cromossômicas foram realizados com aplicação da FISH utilizando-se o método descrito por Pinkel et al. (1986), sob condição de elevada estrigência (~ 77%). A detecção de sinais fluorescentes foi realizada com anti-digoxigenina-rodamina (Roche®) para as sondas marcadas com digoxigenina-11-dUTP (Roche®) e com avidina-FITC (Sigma®) para as sondas marcadas com biotina-16-dUTP (Sigma®). Após a marcação, os cromossomos foram corados com DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole).

4.5.5 Microscopia

As imagens dos cromossomos mitóticos foram obtidas em fotomicroscópio de epifluorescência (Olympus® BX61) e capturadas com câmera digital Olympus® DP80, usando-se o *software cellSens Dimension* versão 1 (Olympus®). Por fim, as imagens foram manualmente tratadas e montadas no editor de imagens da Adobe Photoshop®.

4.6 RESULTADOS

4.6.1 Cromossomos do complemento A

As análises cariotípicas realizadas em exemplares de *Moenkhausia australis*, *M. bonita*, *M. cf. forestii* e *M. oligolepis* evidenciaram número diploide de $2n = 50$ cromossomos para as quatro espécies analisadas (Figura 4.2), com predominância de cromossomos dos tipos metacêntricos e submetacêntricos, sendo observadas variações nas fórmulas cariotípicas das espécies (Tabela 4.2).

Tabela 4.2 – Dados citogenéticos observados em espécies de *Moenkhausia* analisadas no presente trabalho

Espécie	Localidade	2n	Fórmula Cariotípica	NF	Cromossomos B
<i>Moenkhausia australis</i>	Córrego Mamoeiro	50	8m+32sm+10st	100	0-3
	Córrego Corredeira				
<i>M. cf. forestii</i>	Córrego Águas Claras	50	6m+38sm+6st	100	0-4
<i>M. oligolepis</i>	Córrego Mamoeiro	50	10m+34sm+6st	100	0-3
<i>M. bonita</i>	Córrego São José	50	12m+26sm+8st+4a	96	0-2

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Legenda: 2n = Número diploide; NF = Número fundamental.

A análise do cariótipo revelou que o primeiro par cromossômico do tipo metacêntrico sendo o de maior tamanho nas quatro espécies analisadas. Diferentemente, o cariótipo de *M. bonita* apresentou dois pares de cromossomos do tipo acrocêntrico, não observados nas demais espécies.

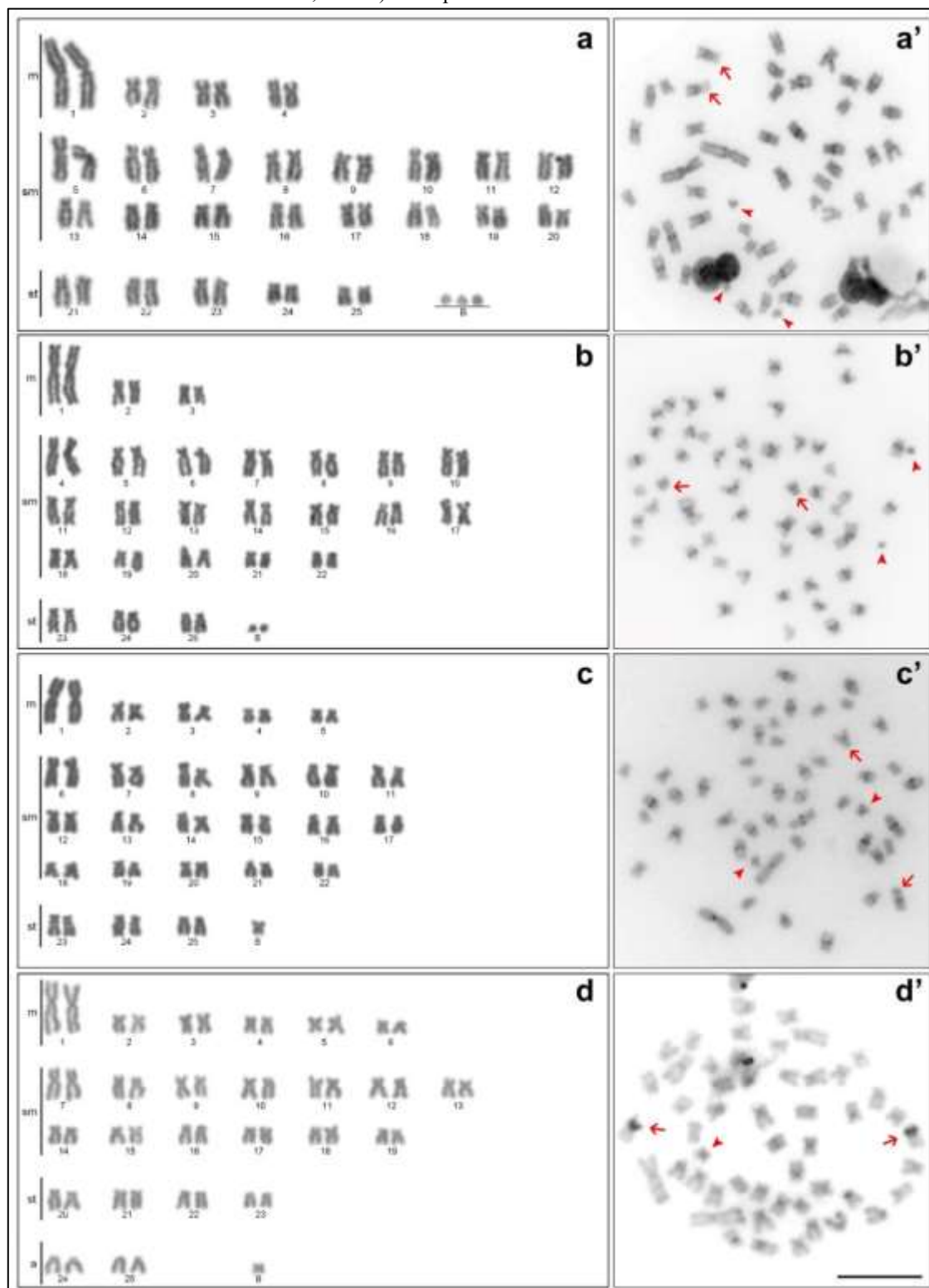
O padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva revelou-se similar nas espécies *M. australis*, *M. cf. forestii* e *M. oligolepis*, sendo observados pequenos blocos heterocromáticos em regiões centroméricas e pericentroméricas na maioria dos cromossomos (Figura 4.2 a' b' c'). Uma notável região eucromática foi observada no braço curto do cromossomo portador da Ag-RONs destas três espécies, indicadas com setas (Figura 4.2 a' b' c').

Por sua vez, *M. bonita* apresentou um padrão heterocromático distinto, com pequenas regiões centroméricas, pericentroméricas e teloméricas em alguns cromossomos, sendo que um bloco heterocromático foi observado no par cromossômico portador da Ag-RONs, ocupando quase todo braço curto (Figura 4.2 d'). Discretos blocos heterocromáticos intersticiais também foram observados no primeiro par cromossômico de *M. bonita* (Figura 4.2 d').

A impregnação pelo Nitrato de Prata para visualização das RONs revelou sítios na região terminal do braço curto de um par cromossômico submetacêntrico nas quatro espécies analisadas (Figura 4.3). *M. australis* apresentou RONs no braço curto do par cromossômico 18 (Figura 4.3 a), enquanto *M. cf. forestii* apresentou marcações no braço curto do par cromossômico 8 (Figura 4.3 b), por sua vez, em *M. oligolepis* as marcas foram identificadas no braço curto do par cromossômico 8 (Figura 4.3 c). E, por fim, *M. bonita* revelou um sítio ribossomal no braço curto do par cromossômico 19 (Figura 4.3 d).

Os cromossomos portadores das RONs mostraram polimorfismo de tamanho desta região nestas espécies (Figura 4.3). Os resultados de *Double-FISH* utilizando sondas de DNAr 5S e 18S mostraram um padrão de distribuição conservado para o DNAr 18S, ocupando a região terminal do braço curto de um único par cromossômico em todas as espécies aqui analisadas e coincidindo com as marcações de RONs (Figura 4.4). Por sua vez, os sítios de DNAr 5S variaram entre as quatro espécies analisadas. Em *M. australis* e *M. oligolepis*, a marcação foi observada em seis cromossomos, localizadas em regiões centroméricas e pericentroméricas (Figura 4.4). Em *M. cf. forestii*, os sítios de DNAr 5S mostraram-se distribuídos na região centromérica de oito cromossomos (Figura 4.4), enquanto em *M. bonita* as marcações foram identificadas na região telomérica de dois pares de cromossomos submetacêntricos e na região centromérica dos pares acrocêntricos 24 e 25 (Figura 4.4). Interessantemente, os cromossomos do primeiro par metacêntrico das espécies *M. australis*, *M. cf. forestii* e *M. oligolepis* apresentaram sítios de DNAr 5S na região centromérica ou pericentromérica, situação não observada em *M. bonita*.

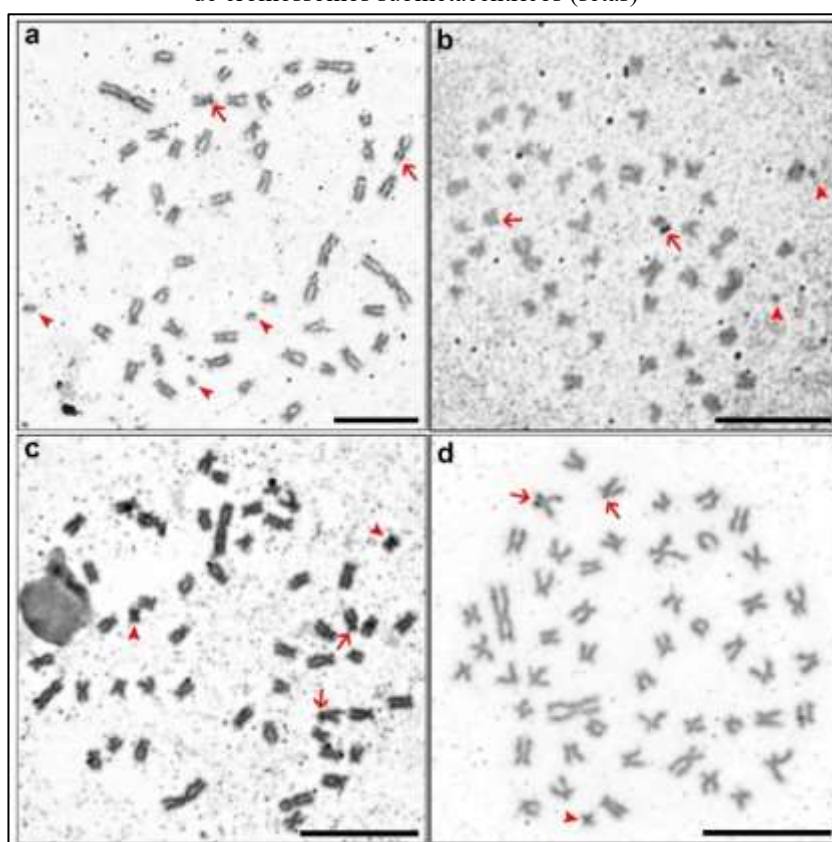
Figura 4.2 – Cariótipos corados com Giemsa a 5% (a, b, c e d) e metáfases após bandamento C (a', b', c' e d') em espécies de *Moenkhausia*



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Legenda: Em **a** *M. australis*; **b** *M. cf. forestii*; **c** *M. oligolepis* e em **d** *M. bonita*. Em destaque os cromossomos B encontrados. As setas indicam o par cromossômico portador das RONS. As cabeças de seta indicam o cromossomo B. Barra = 10 μ m.

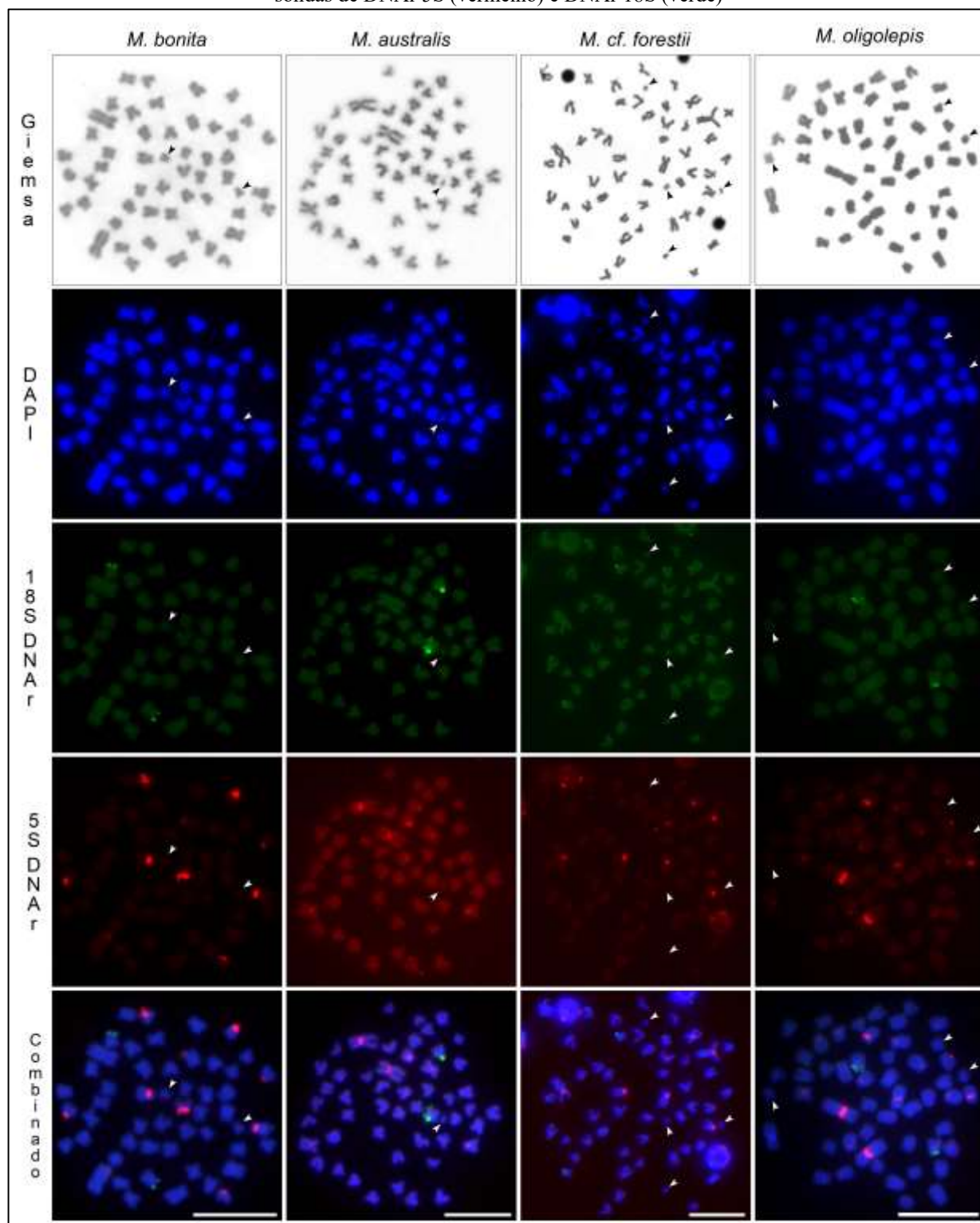
Figura 4.3 – Metáfases mitóticas mostrando marcações das RONS em um par de cromossomos submetacêntricos (setas)



Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Legenda: em **a** *M. australis*; em **b** *M. cf. forestii*; em **c** *M. oligolepis*; e em **d** *M. bonita*. As cabeças de seta indicam os cromossomos B. Barra = 10 μm .

Figura 4.4 – Metáfases mitóticas das espécies de *Moenkhausia* submetidas à técnica de *Double FISH* com sondas de DNAr 5S (vermelho) e DNAr 18S (verde)



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Legenda: metáfases mitóticas de *Moenkhausia* submetidas ao *Double FISH* com sondas de DNAr 5S (vermelho) e DNAr 18S (verde). As cabeças de seta indicam o cromossomo B. Barra = 10 μ m.

4.6.2 Cromossomos B

Nas quatro espécies aqui analisadas foi observada a presença de cromossomos B, que variaram tanto em frequência (Tabelas de 4.3 a 4.6) quanto na morfologia, conforme apresentado anteriormente (ver Figuras 4.2 e 4.5).

Em *M. australis*, o cromossomo B se apresentou como um acrocêntrico pequeno, o menor do cariótipo, enquanto que em *M. cf. forestii* foi observada a ocorrência de cromossomos B polimórficos na forma de elementos metacêntricos e submetacêntricos pequenos; em *M. oligolepis* esses cromossomos também apresentaram-se polimórficos e na forma de elementos metacêntricos e submetacêntricos pequenos; e, por fim, em *M. bonita* os cromossomos B se apresentaram na forma de cromossomos metacêntricos pequenos, sendo os menores do cariótipo (Figura 4.2 e 4.5). A frequência com que esses cromossomos B são encontrados em cada espécie variou amplamente e as informações são apresentadas nas Tabelas 4.3, 4.4, 4.5 e 4.6.

A contagem de células metafásicas em 15 espécimes de *M. australis* mostram uma considerável variação do número de cromossomos B por células (Tabela 4.3). Curiosamente, em *M. australis* os cromossomos B foram exclusivos dos exemplares machos, com indivíduos apresentando de zero a três cromossomos B (Tabela 4.3).

Tabela 4.3 – Frequência de cromossomos B em metáfases mitóticas de *Moenkhausia australis*

Espécies	LBP	Sexo	Células com cromossomos B				Total
			0B	1B	2B	3B	
<i>M. australis</i>							
	85793	Fêmea	38	-	-	-	38
	85795	Fêmea	37	-	-	-	37
	85993	Fêmea	33	-	-	-	33
	106042	Fêmea	26	-	-	-	26
	106245	Fêmea	2	-	-	-	2
	85794	Macho	4	6	3	30	43
	85992	Macho	7	15	4	1	27
	85994	Macho	43	3	2	3	51
	106056*	Macho	9	15	5	9	38
	106121	Macho	27	-	-	-	27
	106213	Macho	7	4	12	2	25
	106214	Macho	7	16	5	-	28
	106215	Macho	2	-	-	-	2
	106216	Macho	10	10	5	-	25
	106262	Macho	5	3	-	-	8
Total			256	73	36	45	410
Porcentagem			62%	18%	9%	11%	
Porcentagem com cromossomos B					38%		

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Legenda: LBP = Coleção ictiológica do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, Instituto de Biociências, UNESP, Brasil. * = Espécime coletado no Córrego Corredeira

Em *M. cf. forestii*, de um a quatro cromossomos B foram detectados em 96% das metáfases analisadas (Tabela 4.4), tendo sido observada variação intra- e interindividual em relação ao número de cromossomos B. No entanto, em machos de *M. cf. forestii* não foram observadas metáfases com 0B (Tabela 4.4).

Tabela 4.4 – Frequência de cromossomos B em metáfases mitóticas de *Moenkhausia cf. forestii*

Espécie	LBP	Sexo	Células com cromossomos B					Total
			0B	1B	2B	3B	4B	
<i>M. cf. forestii</i>								
	106173	Fêmea	4	4	15	2	-	25
	106175	Macho	-	3	17	15	9	44
	106176	Macho	-	13	1	3	-	17
	106183	Macho	-	2	10	8	1	21
	Total		4	22	43	28	10	107
	Porcentagem		4%	21%	40%	26%	9%	
	Porcentagem com cromossomos B		96%					

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Legenda: LBP = Número de lote da Coleção ictiológica do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, Instituto de Biociências, UNESP, Brasil.

Por sua vez, os cromossomos B de *M. oligolepis* foram mais frequentes em metáfases de machos (Tabela 4.5). Das 443 metáfases analisadas, em 47% (207) estes elementos supranumerários estavam presentes com até três cromossomos. Todos os 14 indivíduos machos analisados apresentaram cromossomos B, com variação numérica intra- e interindividual (Tabela 4.5).

Tabela 4.5 – Frequência de cromossomos B em metáfases mitóticas de *Moenkhausia oligolepis*

Tabela 7.5 - Frequência de cromossomos B em metarárias iniciais de <i>Microgastera oligolepis</i>							
Espécie	LBP	Sexo	Células com cromossomos B				Total
			0B	1B	2B	3B	
<i>M. oligolepis</i>							
	3401	Fêmea	13	-	-	-	13
	3402	Fêmea	3	-	-	-	3
	3403	Fêmea	6	-	-	-	6
	3406	Fêmea	12	-	-	-	12
	3409	Fêmea	6	-	-	-	6
	3411	Fêmea	31	-	-	-	31
	3413	Fêmea	9	-	-	-	9
	3415	Fêmea	19	-	-	-	19
	85991	Fêmea	7	-	-	-	7
	106037	Fêmea	21	-	-	-	21
	106122	Fêmea	10	15	1	-	26
	106172	Fêmea	13	1	-	-	14
	106220	Fêmea	8	2	-	-	10
	3404	Macho	3	2	5	-	10

Espécie	LBP	Sexo	Células com cromossomos B				Total
			0B	1B	2B	3B	
	3410	Macho	-	1	2	-	3
	3412	Macho	8	2	-	-	10
	3414	Macho	6	3	1	-	10
	85995	Macho	8	20	14	-	42
	85996	Macho	14	4	3	6	27
	106035	Macho	6	25	-	-	31
	106036	Macho	5	20	9	-	34
	106038	Macho	5	3	4	-	12
	106041	Macho	6	8	2	-	16
	106043	Macho	7	13	-	-	20
	106171	Macho	3	16	5	2	26
	106247	Macho	3	-	-	-	3
	106248	Macho	4	16	2	-	22
Total			236	151	48	8	443
Porcentagem			53%	34%	11%	2%	
Porcentagem com cromossomos B					47%		

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Legenda: LBP = Número de lote da Coleção ictiológica do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, Instituto de Biociências, UNESP, Brasil.

Por fim, os cromossomos B de *M. bonita* estavam presentes em 84% das metáfases analisadas (Tabela 4.6). Os 10 indivíduos analisados apresentaram uma variação intra- e interindividual em relação ao número de cromossomos B por células (Tabela 4.6).

Tabela 4.6 – Frequência de cromossomos B em metáfases mitóticas de *Moenkhausia bonita*

Tabela 7.0 - Frequência de metáfases mitóticas de <i>Microgaster bonita</i>						
Espécies	LBP	Sexo	Células com cromossomos B			Total
			0B	1B	2B	
<i>M. bonita</i>						
	85962	Fêmea	-	3	13	16
	85907	Macho	1	-	-	1
	85908	Macho	1	1	6	11
	85909	Macho	2	8	1	11
	85914	Macho	2	34	1	37
	85915	Macho	-	-	3	3
	106059	Macho	-	2	-	2
	106063	Macho	12	1	-	13
	106064	Macho	2	7	-	9
	106067	Macho	-	-	26	26
Total			20	56	53	129
Porcentagem			16%	43%	41%	
Porcentagem com cromossomos B				84%		

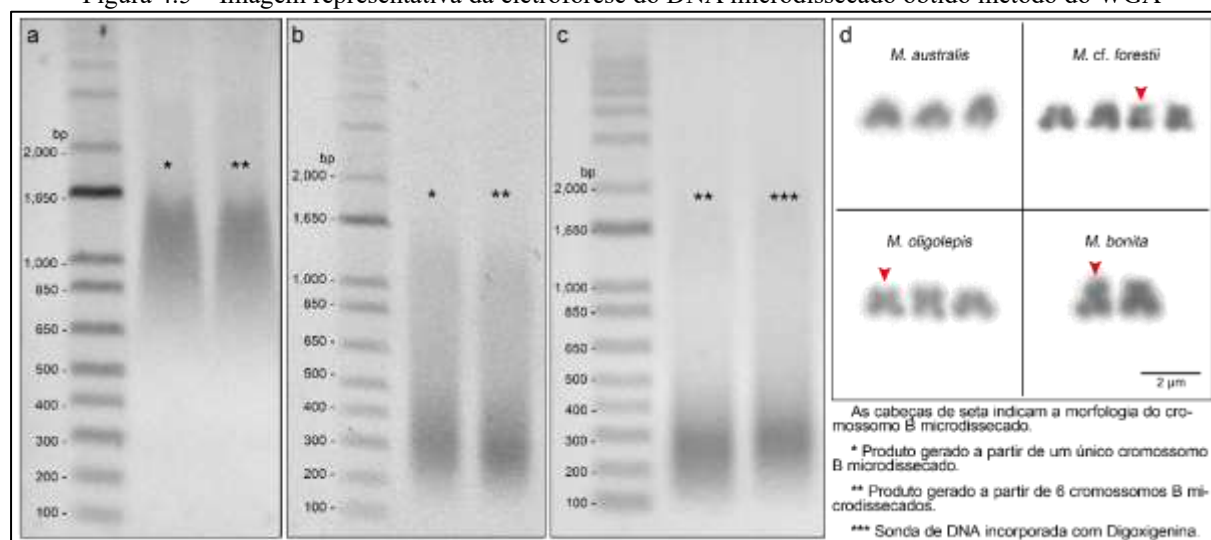
Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Legenda: LBP = Número de lote da Coleção ictiológica do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, Instituto de Biociências, UNESP, Brasil.

Os cromossomos B observados nestas quatro espécies de *Moenkhausia* apresentaram distintos padrões heterocromáticos, sendo identificados cromossomos B eucromáticos e totalmente ou parcialmente heterocromáticos (Figura 4.2 a'b'c'd'). Não foram observadas marcações de sequências com as sondas de DNAr 5S e 18S sobre os cromossomos B de nenhuma das espécies e populações analisadas.

A amplificação do DNA microdissecados das quatro espécies, por dois ciclos de WGA4, resultou em fragmentos de DNA com tamanhos variados, tendo sido observado um “arrasto” de DNA entre 100 pares de bases a > 1,0 kilobases com um pico de intensidade de cerca de 300 pares de bases, conforme verificado em gel de agarose 1% (Figura 4.5 b).

Figura 4.5 – Imagem representativa da eletroforese do DNA microdissecado obtido método do WGA



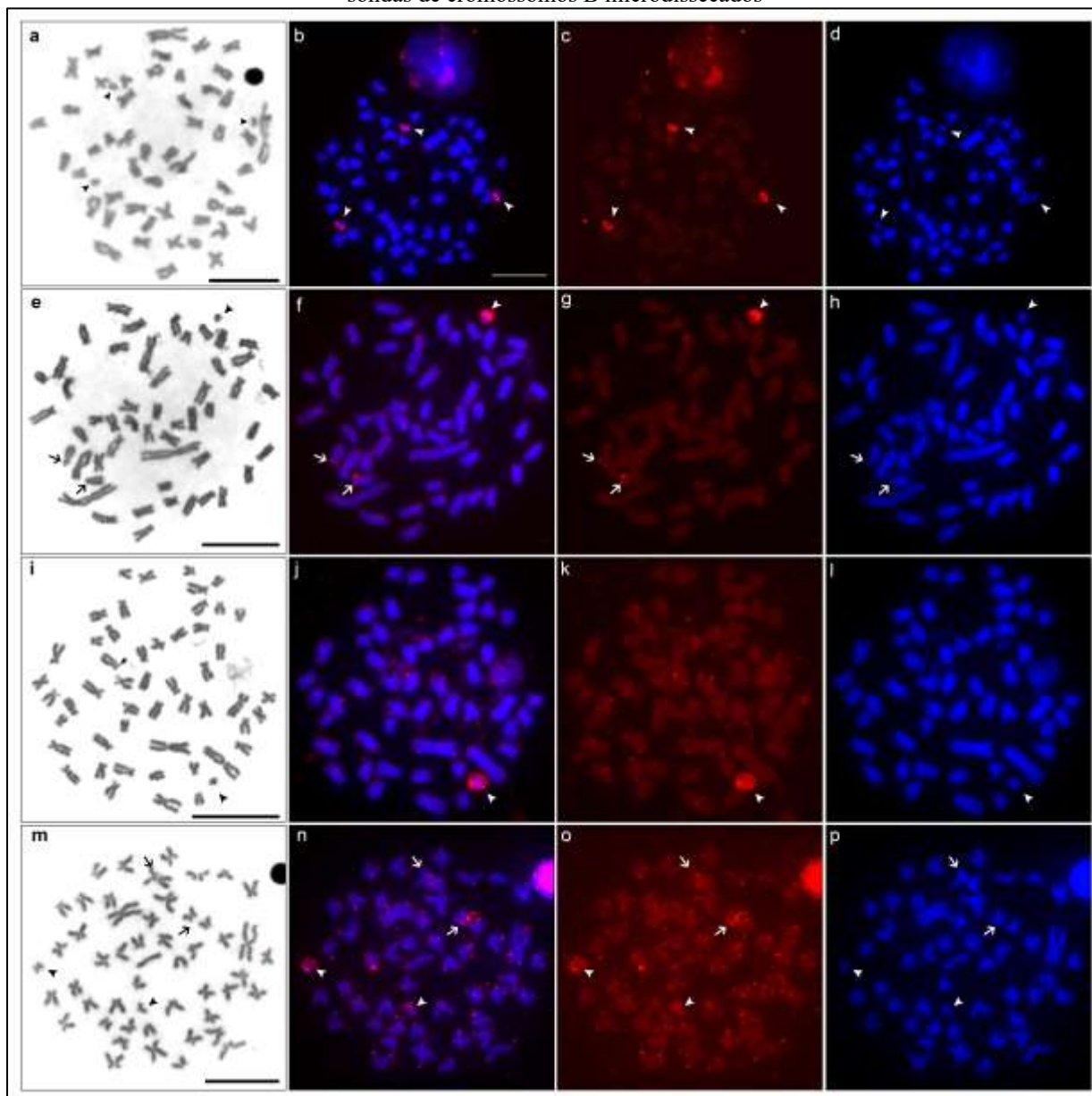
Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Legenda: em **a** produto do primeiro ciclo completo do WGA4; em **b** produto do segundo ciclo completo do WGA4; em **c** produto da amplificação e incorporação de Digoxigenina pelo kit WGA3; em **d** diferentes morfologias dos cromossomos B, corados com Giemsa a 5%, observados nas quatro espécies de *Moenkhausia*. Não se pode diferenciar morfológicamente o cromossomo B microdissecado de *M. australis*.

A microdissecção e pintura cromossômica realizada com sondas de cromossomos B inteiros mostraram-se eficientes na localização dos diferentes tipos de cromossomos B observados em *M. australis*, *M. cf. forestii*, *M. oligolepis* e *M. bonita* que, no entanto, mostraram algumas particularidades entre elas (Figura 4.6). Em *M. australis* a sonda MaB caracterizou de forma intensa, os três cromossomos B e algumas regiões dos cromossomos do complemento A. Entretanto, uma região menos marcada pode ser identificada próxima ao centrômero de dois cromossomos B (Figura 4.6 a, b, c, d). Por sua vez, em *M. cf. forestii* a sonda MfB pintou intensamente o cromossomo B e o braço curto do cromossomo A portador das RONS (Figura 4.6 e, f, g, h), enquanto em *M. oligolepis* a sonda MoB pintou intensamente o cromossomo B e algumas regiões dos cromossomos do complemento A (Figura 4.6 i, j, k, l). Por fim, em *M. bonita*

a sonda MbB pintou os cromossomos B, o braço curto do cromossomo portador das RONS e outras regiões dos cromossomos do complemento A. Foi observada a existência de diferença na intensidade de pintura entre os cromossomos B com as sondas específicas, diferença essa que deverá ser melhor investigada (Figura 4.6, m, n, o, p).

Figura 4.6 – Pintura cromossômica em células mitóticas de espécies de *Moenkhausia* utilizando distintas sondas de cromossomos B microdissecados



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Legenda: cada metáfase corada por Giemsa 5% (a, e, i, m) é acompanhada por sua metáfase correspondente combinada com DAPI/Texas Red (b, f, j, n) seguidas de metáfase expostas sobre os filtros Texas Red (c, g, k, o) e DAPI (d, h, l, p). Em **a**, **b**, **c** e **d**, metáfases de *M. australis* sonda MaB; em **e**, **f**, **g** e **h**, metáfases de *M. cf. forestii* sonda MfB; em **i**, **j**, **k** e **l**, metáfases de *M. oligolepis* sonda MoB e em **m**, **n**, **o** e **p**, metáfases de *M. bonita* sonda MbB. As setas indicam os cromossomos portador da NOR. As cabeças de seta indicam o cromossomo B. Barra = 10 µm.

1.7 Discussão

No presente estudo foram caracterizadas citogeneticamente quatro espécies de peixes do gênero *Moenkhausia*, aumentando o número de espécies conhecidas citogeneticamente para 14 das 98 espécies válidas para o gênero. Foi observado que a macroestrutura cariotípica é semelhante aos resultados já descritos para outras espécies deste gênero, notadamente pela presença de cariótipos com número diploide conservado de $2n = 50$ e o predomínio de cromossomos de dois braços. No entanto, o gênero *Moenkhausia* tem sido considerado polifilético, com uma organização de clados contendo espécies proximalmente relacionadas (BENINE; MARIGUELA; OLIVEIRA, 2009; MARIGUELA et al., 2013; MIRANDE, 2019; REIA et al., 2019).

Os dados citogenéticos disponíveis para *Moenkhausia* revelam que espécies relacionadas filogeneticamente apresentam uma semelhança cariotípica mais acentuada, como é o caso das espécies relacionadas no “Clado 5”, composto por *M. australis*, *M. forestii*, *M. oligolepis* e *M. sanctaefilomenae* e o “Clado 4”, formado por *M. bonita*, *M. costae*, *M. dichrourea*, *M. intermedia* e *M. nigromarginata* (MARIGUELA et al., 2013; MIRANDE, 2019; REIA et al., 2019). Internamente, em ambos os clados, pode ser observada uma macroestrutura cariotípica constante com número diploide de $2n = 50$ cromossomos, formado principalmente por cromossomos submetacêntricos, grande semelhança nos padrões de heterocromatina e na morfologia dos cromossomos portadores da RONS, bem como com a presença de distintas populações apresentando cromossomos B (DANTAS et al., 2007; NASCIMENTO et al., 2020; PORTELA-CASTRO; JÚLIO-JÚNIOR, 2002; PORTELA; GALETTI; BERTOLLO, 1988; RANUCCI et al., 2021).

A comparação entre a localização física dos genes ribossômicos em *Moenkhausia* também nos reforça dois cenários de organização entre os clados 4 e 5, nos quais se observa a predominância de sítios de DNAr 18S em posição telomérica de um par cromossômico do tipo submeta ou subtelocêntrico, seguido por um bloco heterocromático evidente. Neste modelo podem ser incluídas as espécies *M. bonita* (RANUCCI et al. 2021, presente trabalho) e *M. nigromarginata* (NASCIMENTO et al., 2020). Por outro lado, um heteromorfismo de tamanho do braço curto relacionado com o estado de compactação da cromatina dos cromossomos homólogos portadores das RONS, pode ser observado nas espécies do clado 5 (DANTAS et al., 2007; FORESTI; ALMEIDA-TOLEDO; TOLEDO, 1989; HASHIMOTO et al., 2012; NASCIMENTO et al., 2020).

Por sua vez, o mapeamento de blocos de DNAr 5S identifica sequências localizadas em posição pericentromérica ou centromérica de múltiplos cromossomos. A presença de um sítio de

DNAr 5S em posição pericentromérica ou centromérica no primeiro par cromossômico é observada nas quatro espécies do clado 5 (NASCIMENTO et al., 2020; RANUCCI et al., 2021; UTSUNOMIA et al., 2016), sendo uma sinapomorfia para esse grupo de espécies. Tal par cromossômico não possui *clusters* de DNAr 5S em *M. bonita* (RANUCCI et al., 2021 e no presente trabalho) e *M. nigromarginata* (NASCIMENTO et al., 2020), ambas pertencentes ao clado 4. De fato, pode-se sugerir que a diversificação cariotípica nestes clados vêm sendo acompanhada pela dispersão dos sítios de DNAr 5S. Assim, considera-se que o estudo de outras espécies e populações deste grupo de organismos deverão gerar informações que auxiliarão na compreensão dos processos de dispersão dos sítios ribossômicos no gênero *Moenkhausia*.

Rearranjos cromossômicos envolvendo porções de DNA repetitivo, como é o caso de genes ribossômicos, podem ser um indicativo de rápidos e recentes processos especiação (CIOFFI; BERTOLLO, 2012; DVOŘÁK, 1983). Em certos casos, tais rearranjos podem gerar regiões de não pareamento entre cromossomos homólogos durante a meiose, contribuindo para o estabelecimento de isolamento reprodutivo, infertilidade e para a diversificação genômica encontrada em diferentes espécies (revisão em FARIA; NAVARRO 2010). Diferentes mecanismos, entre os quais os rearranjos cromossômicos, poderiam explicar os padrões de distribuição do DNAr observados em espécies de *Moenkhausia*, bem como a presença de elementos transponíveis também seria um fator capaz de elucidar a dispersão de sequências de DNAr 5S. Estudos citogenéticos vêm demonstrando a associação de genes ribossômicos com elementos transponíveis, resultando na dispersão dessas sequências (ex. CIOFFI et al., 2010, SILVA et al. 2013, SILVA et al., 2016, SYMONOVÁ et al., 2013). Além disso, a presença de pseudogenes também poderia ser um fator com atuação na dispersão e variação observada no mapeamento físico do DNAr 5S (revisão em REBORDINOS et al., 2013).

Uma característica peculiar do gênero *Moenkhausia* é a presença de distintos cromossomos B em algumas espécies. A primeira descrição desses elementos supranumerários em espécies de *Moenkhausia* foi em *M. intermedia* que apresentava um microcromossomo B em pouco mais de 12% das células contadas (PORTELA; GALETTI; BERTOLLO, 1988). No ano seguinte, Foresti et al. (1989) descreveram com detalhes os microcromossomos B encontrados em *M. sanctaefilomenae*. Os autores observaram esses microcromossomos em diferentes fases do ciclo celular de células somáticas e germinativas, relatando a frequência desses microcromossomos, a presença de RONS ativas e sua organização heterocromática. Mais recentemente, estudos citogenéticos mostraram cromossomos B presentes em sete espécies de *Moenkhausia* (DANTAS et al., 2007; NASCIMENTO et al., 2020; PORTELA-CASTRO;

JÚLIO JÚNIOR, 2002; RANUCCI et al., 2021), sendo duas espécies do clado 4 (ver Tabela 4.7) e quatro espécies do clado 5 (ver Tabela 4.8).

A análise dos dados sumarizados na Tabela 4.8 revela que todas as espécies do clado 5 apresentam cromossomos B em duas ou mais populações analisadas. Interessantemente, uma única população natural de *M. sanctaefilomenae* coletada no rio Novo (bacia do rio Paranapanema) não apresenta cromossomos B, possivelmente indicando a perda desses elementos nessa população (UTSUNOMIA et al., 2016). Nas demais espécies e populações analisadas observa-se uma considerável variedade de formas dos cromossomos B, com distintos padrões de condensação da cromatina, sendo eucromáticos, parcialmente heterocromáticos e totalmente heterocromáticos, com tamanhos variados, apresentando-se como micro ou macrocromossomo e com diferentes morfologias diferenciadas pela posição do centrômero, podendo ser metacêntricos, submetacêntricos e acrocêntricos. A presença de RONS ativos nesses elementos genômicos também tem sido descrita ao longo dos 35 anos de estudos nesse grupo de peixes (DANTAS et al., 2007; FORESTI; ALMEIDA-TOLEDO; TOLEDO, 1989; HASHIMOTO et al., 2012; NASCIMENTO et al., 2020; PORTELA-CASTRO; JÚLIO JÚNIOR; NISHIYAMA, 2001; RANUCCI et al., 2021; SANTOS et al., 2021; UTSUNOMIA et al., 2016).

A considerável incidência de cromossomos B em espécies intimamente relacionadas é notável e pode ser um indicativo de que estes elementos genômicos observados no clado 5, compartilham uma origem ancestral. Tal hipótese pode ser corroborada por: (i) dados filogenéticos atuais com informações morfológicas e moleculares reforçam o estado monofilético do clado 5 (MARIGUELA et al., 2013; MIRANDE, 2019; REIA et al., 2019); (ii) pela composição gênica, uma vez que nos cromossomos B foi observada a presença de sequências de DNAr 18S e de histonas, além de sequências de DNA satélite (MS7 e MS3), (NASCIMENTO et al., 2020; UTSUNOMIA et al., 2016); (iii) comportamento relacionado ao sexo, se observa a presença de cromossomos B em maior frequência em células de machos (FORESTI; ALMEIDA-TOLEDO; TOLEDO, 1989; NASCIMENTO et al., 2020; PORTELA-CASTRO; JÚLIO JÚNIOR; NISHIYAMA, 2001). Considera-se que essas particularidades poderão ser amplamente exploradas em estudos futuros, que possibilitem a localização e comparação entre sequências de DNA específicas dos cromossomos B.

As análises citogenéticas clássicas sobre os cromossomos B em espécies do clado 4 de *Moenkhausia* apresentam informações iniciais sobre a caracterização destes elementos genômicos. Neste grupo de organismos pode ser destacada a alta frequência de espécies que apresentam cromossomos B, sendo que em *M. bonita* são encontrados em 84% das células em

exemplares analisados do Córrego São José; em cerca de 66% das células em exemplares analisados do Rio Índio e em 43% das células dos exemplares analisados do Rio Paraná (RANUCCI et al., 2021 e no presente trabalho). Considera-se, pois, que a ampliação de estudos nesse grupo de espécies poderá trazer importantes informações citogenéticas e filogenéticas, além de permitir novas abordagens sobre as características estruturais, funcionais e evolutivas sobre os cromossomos B.

A técnica WCP vêm fornecendo dados relevantes no estudo dos cromossomos B. Quando utilizada em amostras de *M. sanctaefilomenae*, foi observado que sondas produzidas a partir de microcromossomos B eucromáticos e de microcromossomos B heterocromáticos apresentavam sinais fluorescentes semelhantes pela técnica de FISH, marcando as duas variantes do cromossomo B e algumas regiões heterocromáticas dos cromossomos do complemento A (UTSUNOMIA et al., 2016). Porém, as duas variantes de cromossomos B, encontrados em *M. sanctaefilomenae* possuem diferenças em sua composição de DNA e tiveram uma origem comum, mas em momentos distintos (UTSUNOMIA et al., 2016). Nos estudos citogenéticos de *M. sanctaefilomenae*, os autores Scudeler et al. (2015) e Utsunomia et al. (2016) sugerem que os cromossomos B tiveram uma origem intraespecífica nessa espécie.

Os dados de WCP aqui obtidos para *M. australis*, *M. cf. forestii*, *M. oligolepis* e *M. bonita* demonstram alta eficiência do processo de dupla amplificação com o kit WGA4 e das sondas produzidas para a identificação desses elementos supranumerários. O que se observa são sinais fluorescentes nos cromossomos B e, em alguns casos, na região do braço curto dos cromossomos onde estão localizadas as RONS, além de algumas regiões de outros cromossomos do complemento A (NASCIMENTO et al., 2020; SANTOS et al., 2021; SCUDELER et al., 2015; UTSUNOMIA et al., 2016). Tais informações parecem reforçar a hipótese da participação do par cromossômico portador das RONS na origem dos cromossomos B no clado 5, como já proposto por Scudeler et al. (2015) e Utsunomia et al. (2016). Pode ser especulado ainda que eventos relacionados à origem destes elementos genômicos tenham ocorrido anteriormente aos processos de especiação do clado, não sendo descartada a possibilidade de que rearranjos cromossômicos, transposição gênica e acúmulo de DNA repetitivo também possam ter ocorrido, uma vez que tais eventos citológicos têm sido identificados nos processos de origem e diferenciação dos cromossomos B em diferentes organismos.

4.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

As referências correspondentes ao capítulo encontram-se no final desta tese

Tabela 4.7 – Dados citogenéticos do clado 4

Clado 4 (MARIGUELA et al., 2013) ou Clado <i>Moenkhausia</i> (MIRANDE, 2019).									
Espécie	Localidade	2n	Fórmula Cariotípica	NF	Ag- RON/Par	18S/Par	5S/Par	B	Referências
<i>M. intermedia</i>	Lagoa do Mato	50	50m/sm	100	6(m/sm)	*	*	0-1	(PORTELA; GALETTI; BERTOLLO, 1988)
	Rio Paraná		16m+34sm		*	*	*	-	(PORTELA-CASTRO; JÚLIO-JÚNIOR, 2002)
	Rio Mogi-Guaçu		16m+34sm		2(m)	2(m)	*		(DANTAS et al., 2007)
	Córrego Pindapoy Grande		16m + 28sm + 6st		12(sm)	*	*	1-3	(SÁNCHEZ; TAKAGUI; FENOCCHIO, 2021)
	Córrego Yabebiry								
<i>M. costae</i>	Rio São Francisco	50	50m/sm	100	6(m/sm)	*	*	-	(PORTELA; GALETTI; BERTOLLO, 1988)
<i>M. dichrourea</i>	Rio Cuiabá	50	32m+14sm+4st	100	*	*	*	-	(MIYAZAWA, 1997)
	Rio Iguaçu		26m+24sm		*	2(m)	10(m);17(sm)		(PAIZ, 2013)
	Córrego Pindapoy Grande		22m + 22sm + 6st	100	16(sm)	*	*	-	(SÁNCHEZ; TAKAGUI; FENOCCHIO, 2021)
	Córrego Mártires								
<i>M. nigromarginata</i>	Rio Mombuca	50	14m+32sm+4a	96	16(sm)	16(sm)	19(sm);24,25(a)	-	(NASCIMENTO et al., 2020)
	Rio Verde						24,25(a)		
<i>M. bonita</i>	Córrego São José	50	12m+26sm+8st+4a	96	19(sm)	19(sm)	4chr(sm);21,25(a)	0-2	**
	Rio Paraná	50	14m+24sm+8st+4a	96	3(m)	3(m)	8,14(sm); 20,22(st)	0-1	(RANUCCI et al., 2021)
	Índios River				3(m)	3(m)	9(sm); 23 (st)	0-2	

Fonte: Adaptado de Ranucci et al. (2021).

Legenda: 2n = número diploide. m = metacêntrico. sm = submetacêntrico. st = subtelocêntrico. a = acrocêntrico. NF = Número Fundamental. chr = cromossomos. B = cromossomos supranumerários. * = não estabelecido. ** = espécie analisada no presente trabalho.

Tabela 4.8 – Dados citogenéticos do clado 5

Clado 5 (MARIGUELA et al., 2013), Clado <i>Bario</i> (MIRANDE, 2019) ou Grupo <i>Moenkhausia oligolepis</i> / <i>M. sanctaefilomenae</i> (REIA et al., 2019)									
Espécie	Localidade	2n	Fórmula Cariotípica	NF	Ag-RON/Par	18S/Par	5S/Par	B	Referências
<i>M. australis</i>	Ribeirão Mamoeiro	50	8m+32sm+10st	100	18(sm)	18(sm)	6chr	0-3	**
	Córrego Corredeira								
<i>M. sanctaefilomenae</i>	Rio Capivara	50	48m/sm+2a	98	19(m/sm);B	*	*	0-8	(FORESTI; ALMEIDA-TOLEDO; TOLEDO, 1989)
	Rio Aquapey		48m/sm+2st	100	*	*	*	0-3	(ALBERDI; FENOCCHIO, 1997)
	Rio Paraná		12m+36sm+2st		*	*	*	0-2	(PORTELA-CASTRO; JÚLIO JÚNIOR; NISHIYAMA, 2001)
	Afluente do Rio Capivara		12m+36sm+2st		3chr(sm)	6chr(m);4chr(sm); B	*	0-6	(DANTAS et al., 2007)
	Rio Batalha		6m+16sm+28st		6(m);B	*	*	0-8	(HASHIMOTO et al., 2012)
	Rio Batalha				6(m);B	6(m);B	1,2(m);5,7(sm)	0-6	(UTSUNOMIA et al., 2016)
	Rio Novo				6(m)	6(m)	1,2(m); 5,6,7 (sm); 17,18(st)	-	
	Rio Araquá		6m+44sm		*	7,12,15,17(sm)	*	0-6	(SCUDELER et al., 2015)
	Córrego Mané Teixeira				*	7,10,14,15,17(sm)	*		
	Riacho Olaria				*	4,7,10,15(sm); B	*		
	Córrego Guaçu		8m+36sm+6st		24(st)	*	*	0-8	(FERNANDES; ALVES, 2017)
	Córrego Yabebiry		12m + 32sm + 6st		13(sm)	*	*	1-3	(SÁNCHEZ; TAKAGUI; FENOCCHIO, 2021)
<i>M. oligolepis</i>	Córrego Corredeira	50	12m+32sm+6st	100	23(st)	23(st)	1,2(m);6,8,10(sm)	0-4	(NASCIMENTO et al., 2020)
	Serraria dos padres		10m+26sm+14st		17(sm)	7 chr	21chr	0-2	
	Córrego Pedro Correia		10 +32sm+8a	92	*	6(sm)	1(m)	0-10	(SANTOS et al., 2021)
	Córrego Taboquinha			*	*	*			
	Ribeirão Mamoeiro		10m+34sm+6st	100	8(sm)	8(sm)	6chr	0-3	**
<i>M. forestii</i>	Ribeirão do Sapo	50	10m+32sm+8st	100	22(st)	22(st)	1,2(m);6,8,10 (sm)	0-3	(NASCIMENTO et al., 2020)
	Rio Paraná		10m+28sm+10st+2a	98	3(m)	3(m)	8,14(sm);20,22(st)	0-2	(RANUCCI et al., 2021)
	Córrego Águas Claras		6m+38sm+6st	100	16(sm)	8(sm)	8chr	0-4	**

Fonte: Adaptado de Ranucci et al. (2021).

Legenda: 2n = número diploide. m = metacêntrico. sm = submetacêntrico. st = subtelocêntrico. a = acrocêntrico. NF = Número Fundamental. chr = cromossomos. B = cromossomos supranumerários. * = não estabelecido. ** = espécie analisada no presente trabalho.

CAPÍTULO 5 IMUNOLOCALIZAÇÃO DE PROTEÍNAS DO COMPLEXO SINAPTONÊMICO (SYCP3) INDICA PAREAMENTO REGULAR DOS CROMOSSOMOS B DE *MOENKHAUSIA AUSTRALIS* E *MOENKHAUSIA BONITA* (CHARACIFORMES, CHARACIDAE)

5.1 RESUMO

Os peixes do gênero *Moenkhausia* apresentam os cromossomos B como elementos extras geralmente de tamanho reduzido, sendo variáveis em morfologia e número nos indivíduos portadores. No entanto, nesse grupo de peixes não está claro o comportamento dos cromossomos B durante os *checkpoints* das divisões celulares mitóticas ou meióticas. No presente trabalho, foi analisado o comportamento mitótico e meiótico dos cromossomos B nas espécies *Moenkhausia australis* e *Moenkhausia bonita*. Por meio da aplicação da técnica de pintura cromossômica, foram obtidas sondas B específicas de ambas as espécies de *Moenkhausia*, que permitiram a observação de um processo regular de disjunção das cromátides-irmãs dos cromossomos B durante a anáfase mitótica e preparações cromossômicas destas duas espécies. Em adição, a pintura cromossômica com as sondas B específicas em espermatócitos revelou que os cromossomos B não realizam pareamento com os cromossomos do complemento A durante o estágio de paquíteno em ambas as espécies. A aplicação da técnica de imunofluorescência em espermatócitos de *M. australis* e *M. bonita* revelou a formação de 25 bivalentes nas células paquitênicas, representando o perfeito pareamento dos cromossomos do complemento padrão A, bem como a presença de um elemento cromossômico de pequeno tamanho representando o cromossomo B em ambas as espécies. Os resultados encontrados, além de identificarem o isolamento dos cromossomos B em relação aos demais componentes do complemento normal, possivelmente indicam uma precisa disjunção das cromátides-irmãs durante as anáfases mitóticas. Além disso, a regularidade nas sinapses meióticas dos cromossomos B pode ter um papel essencial, garantindo o não acionamento dos *checkpoints* de cromossomos não-sinápticos, o que permite a continuação da gametogênese e resulta na manutenção dos cromossomos B em populações naturais destas espécies de *Moenkhausia*.

Palavras-chave: imunodeteção; pintura cromossômica; prófase I; cromossomos B; segregação cromossômica.

5.2 ABSTRACT

Fish of the genus *Moenkhausia* present B chromosomes as extra elements usually of reduced size, being variable in morphology and number in the carrying individuals. However, in this group of fish, the behavior of B chromosomes during the checkpoints of mitotic or meiotic cell division is unclear. In the present work, the mitotic and meiotic behavior of B chromosomes in the species *Moenkhausia australis* and *Moenkhausia bonita* was analyzed. By applying the chromosome painting technique, specific B probes of both species were obtained, which allowed us to observe a regular process of disjunction of the sister chromatids of the B chromosomes during mitotic anaphase in chromosome preparations of these two species. In addition, chromosome painting with the specific B probes in spermatocytes revealed that the B chromosomes do not match with the A complement elements during the pachytene stage in both species. The application of the immunofluorescence technique in spermatocytes of *M. australis* and *M. bonita* revealed the formation of 25 bivalents in the pachytene cells, representing the perfect pairing of the chromosomes of the standard complement A, as well as the presence of a small chromosomal element representing the B chromosome in both species. The results obtained, in addition to identifying the isolation of the B chromosomes in relation to the components of the normal complement, indicate a precise disjunction of the sister chromatids during the mitotic anaphase. Furthermore, the regularity in the meiotic synapses of the B chromosomes may play an essential role, ensuring the non-triggering of non-synaptic chromosome checkpoints, which allows the continuation of gametogenesis and results in the maintenance of B chromosomes in natural populations of these *Moenkhausia* species.

Keywords: immunodetection; chromosome painting; prophase I; B chromosomes; chromosomal segregation.

5.3 RESUMEN

En el género *Moenkhausia* los cromosomas B son elementos adicionales generalmente de pequeño tamaño y variables en morfología y número. Sin embargo, en este grupo de peces, el comportamiento de los cromosomas B durante los *checkpoints* de las divisiones celulares mitóticas o meióticas no está claro. En el presente trabajo se analizó el comportamiento meiótico y mitótico de los cromosomas B de *Moenkhausia australis* y *Moenkhausia bonita*. Mediante la pintura cromosómica, utilizando sondas B específicas para ambas especies de *Moenkhausia*, se observó que en anafase mitótica se producía una disyunción regular de las cromátidas hermanas de los cromosomas B de *M. australis* y *M. bonita*. Empleando inmunofluorescencia en espermatoцитos de *M. australis* y *M. bonita* observamos la formación de 25 bivalente que representan los cromosomas A, así como la presencia de un complejo sinaptonémico de pequeño tamaño que representa el cromosoma B en ambas especies. Los resultados aquí encontrados indican posiblemente una disyunción precisa de las cromátidas hermanas en anafase mitótica. Además, la regularidad en las sinapsis meióticas de los cromosomas B, puede desempeñar un papel esencial para garantizar que no se activen los *checkpoints* de los cromosomas no sinápticos, lo que permite que continúe la gametogénesis y tiene como resultado el mantenimiento de los cromosomas B en las poblaciones naturales de *Moenkhausia*.

Palabras clave: inmunodetección; pintura cromosómica; profase I; cromosomas B; segregación cromosómica.

5.4 INTRODUÇÃO

Os cromossomos adicionais que não são essenciais e nem estão presentes em todos os indivíduos da população de uma determinada espécie são chamados de supranumerários, acessórios ou cromossomos B, sendo assim denominados por representarem elementos extras ao conjunto regular de cromossomos do complemento padrão A (CAMACHO; SHARBEL; BEUKEBOOM, 2000; JONES; REES, 1982). O primeiro relato de cromossomos supranumerários foi há mais de um século, observados em insetos Hemiptera (WILSON, 1907). A partir de então, esses elementos genômicos têm se tornado o objeto de estudo de vários pesquisadores e têm sido encontrados em numerosas espécies de plantas, animais e fungos (revisão em Camacho 2005). Em um banco de dados que sistematiza as informações de cromossomos B apresentado por D'Ambrosio et al. (2017), é relatada a presença de cromossomos B em células eucarióticas de aproximadamente três mil espécies, que se encontram registradas na base B-chrom (www.bchrom.csic.es).

O comportamento dos cromossomos B durante o ciclo de divisão celular mostra geralmente um padrão de herança não-mendeliana, que pode resultar no acúmulo destes elementos genômicos em populações naturais (revisão em Camacho et al. 2000). No entanto, não está claro se os processos de acúmulo ou perda cromossômica são acompanhados por resultados da dissomia de cromossomos homólogos ou pela não-disjunção de cromátides-irmãs (KOMLUSKI; STUKENBROCK; HABIG, 2022). Nesse cenário, a descrição de perdas de cromossomos B durante o ciclo de divisão celular mitóticas ou meióticas aparecem com frequência na literatura para fungos, animais e plantas (BALESDENT et al., 2013; KOMLUSKI; STUKENBROCK; HABIG, 2022; LI et al., 2022; PIRES; SAMPAIO; DIAS, 2015). A integridade do centrômero pode garantir a precisa segregação cromossômica em todos os eucariotos já estudados, porém, o centrômero pode não ser o único local de ancoragem dos microtúbulos do fuso aos cromossomos e, nesses casos, a segregação cromossômica pode, por vezes, ser conduzida por diferentes regiões de ancoragem dos microtúbulos, distribuídas ao longo de todo o comprimento dos cromossomos (ex.: cromossomos holocêntricos, revisado em Melters et al., 2012). Por fim, os mecanismos subjacentes à precisa disjunção e segregação cromossômica requer mais estudos (ANJUR-DIETRICH; KELLEHER; NEEDLEMAN, 2021; HARA; FUKAGAWA, 2020; LI et al., 2022).

Com o avanço das técnicas citogenéticas que incluem a microdissecção cromossômica e o sequenciamento massivo do DNA microdissecado, muitos estudos têm observado a presença de diferentes sequências de DNA repetitivos, genes de cópia única e pseudogenes distribuídos nos cromossomos B (revisado em RAJPAL et al., 2023; SILVA et al., 2022). Além disso, os

experimentos de pintura cromossômica têm contribuído para o levantamento de hipóteses sobre a origem desses elementos extras em diferentes espécies, tomando por base o compartilhamento de sequências entre os cromossomos do complemento A e os cromossomos B (revisão em Camacho et al. 2021; Rajpal et al. 2023).

De modo geral, os cromossomos B podem apresentar origem intraespecífica, quando decorrente de rearranjos do complemento padrão A de uma determinada espécie, ou origem interespecífica, como resultado de cruzamentos entre espécies distintas (CAMACHO; SHARBEL; BEUKEBOOM, 2000). A hipótese de origem interespecífica foi recentemente proposta para os cromossomos B de peixes da família Auchenipteridae (*Parauchenipterus galeatus* e *Trachelyopterus* sp.). Nessas espécies se observa uma estreita similaridade da distribuição de sequência telomérica [TTAGGG]_n, padrão de heterocromatina e ausência do microssatélite [GATA]_n nos cromossomos B (LUI et al., 2021). Estudos de pintura cromossômica têm mostrado a ocorrência de origem intraespecíficas em *Moenkhausia sanctaefilomenae* (SCUDELER et al., 2015; UTSUNOMIA et al., 2016) e *Moenkhausia oligolepis* (Santos et al. 2021). Além disso, dados de Sequenciamento de Nova Geração (NGS) corroboram a hipótese de origem intraespecífica dos cromossomos B de *M. sanctaefilomenae* (UTSUNOMIA et al., 2016). Especula-se que a ocorrência de cromossomos B em grupos intimamente relacionados de *Moenkhausia*, como ocorre com as espécies *M. australis*, *M. forestii*, *M. oligolepis* e *M. sanctaefilomenae*, é apresentada no Capítulo 4 desta tese e pode ser um indicativo da existência de sinapomorfia cromossômica neste grupo.

A ocorrência de cromossomos B já foi relatada em sete espécies do gênero *Moenkhausia* de diferentes populações, sendo que esses elementos extras variam em número, morfologia e tamanho (DANTAS et al., 2007; NASCIMENTO et al., 2020; PORTELA-CASTRO; JÚLIO JÚNIOR, 2002; RANUCCI et al., 2021). No entanto, as informações citogenéticas correspondem a pouco menos de 15% das espécies deste grupo, com referências apenas 14 das 98 espécies válidas de *Moenkhausia*, evidenciando a necessidade de uma ampliação de estudos cromossômico em outras espécies do gênero (DANTAS et al., 2007; FRICKE; ESCHMEYER; VAN DER LAAN, 2023; NASCIMENTO et al., 2020; PORTELA-CASTRO; JÚLIO JÚNIOR, 2002; RANUCCI et al., 2021).

Análises citogenéticas durante a meiose e mitose fornecem informações relevantes sobre o comportamento dos cromossomos B ao longo das fases da divisão celular. Nesse sentido, os cromossomos B de *M. sanctaefilomenae* foram observados, nos núcleos espermáticos, em diferentes números, podendo indicar a ocorrência de não-disjunção desses elementos extras ao longo das subsequentes fases da gametogênese (FORESTI; ALMEIDA-TOLEDO; TOLEDO,

1989). Em *Characidium gomesi* análises de células germinativas mostraram que os cromossomos B se comportam como univalentes e/ou bivalentes durante a prófase I (SERRANO et al., 2016). Resultados semelhantes foram encontrados em *Psalidodon paranae*, que apresentou meiócitos com 0B, 1B e 2B (SILVA et al., 2021). Nessa espécie, o cromossomo B é um isocromossomo e apresenta autopareamento durante a meiose I (SILVA et al., 2021). Em adição, as células com dois cromossomos B pode ocorrer tanto o autopareamento quanto o pareamento entre estes elementos quando se encontram fisicamente próximos no núcleo celular (SILVA et al., 2021). No entanto, a exata ocupação do território nuclear pelos cromossomos B ainda é questão não esclarecida, podendo ser especulado que o envoltório nuclear esteja participando da localização destes cromossomos. Os estudos em *P. paranae* e *C. gomesi* não mostram a ocorrência de recombinação meiótica entre os cromossomos B e os elementos do complemento A.

Durante a divisão meiótica, o processo de recombinação cromossômica é intermediado por um conjunto de proteínas que formam o Complexo Sinaptonêmico (SC). Essa estrutura trilaminar, formada por elementos laterais, transversais e central é responsável pela sinapse e facilita os eventos de recombinação entre os cromossomos homólogos durante a prófase I (revisado em ZICKLER; KLECKNER 1999). Dessa forma, o SC garante o contato físico e a estabilidade do pareamento entre os cromossomos homólogos que estão alinhados linearmente (revisado em ZICKLER; KLECKNER 2015). A imunodeteção de proteínas dos elementos laterais SYCP3 (*Synaptonemal complex protein 3*) possibilita uma boa observação da regularidade das sinapses geradas entre os cromossomos homólogos e vêm contribuindo para os estudos do comportamento meiótico dos cromossomos B de peixes (CARDOSO et al., 2022; SERRANO et al., 2016; SILVA et al., 2021).

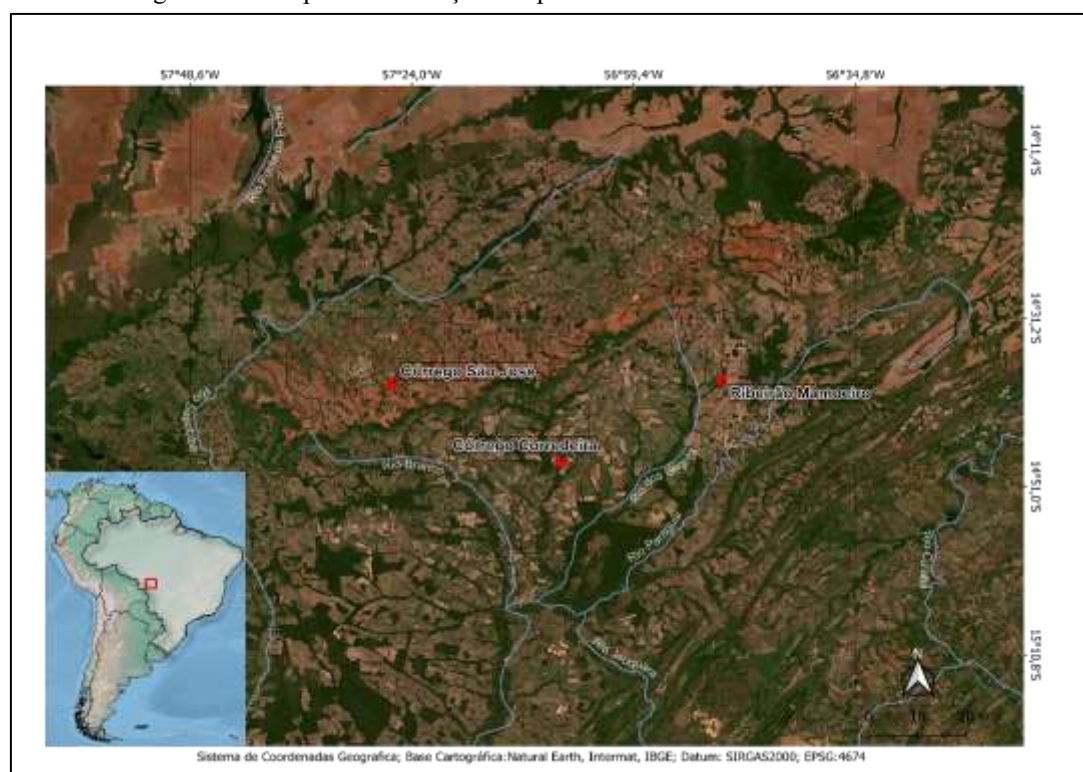
O presente trabalho busca investigar o comportamento dos cromossomos B em diferentes fases do ciclo mitótico e meiótico de *Moenkhausia australis* e *Moenkhausia bonita*. Os resultados podem apontar para: (i) a ocorrência de disjunção precisa das cromátides-irmãs dos cromossomos B em anáfases mitóticas; (ii) a ausência de recombinação meiótica entre os cromossomos do complemento A e os cromossomos B; e (iii) regularidade de pareamento ao longo do comprimento das sinapses dos cromossomos homólogos do complemento padrão A e dos cromossomos B. Esses processos poderiam se apresentar como mecanismos para garantir a manutenção dos cromossomos B e facilitar eventos de recombinação entre esses elementos genômicos em populações naturais de *Moenkhausia*.

5.5 MATERIAL E MÉTODOS

5.5.1 Amostragem

Nove espécimes de *M. australis* (4 fêmeas e 5 machos) e dez espécimes de *M. bonita* (1 fêmea e 9 machos) foram coletadas em riachos de cabeceira da bacia do alto rio Paraguai (Figura 5.1). Todos os procedimentos experimentais foram executados sob a supervisão e com a aprovação dos órgãos ambientais do Brasil (autorização para coleta de espécimes: MMA/IBAMA/SISBIO – número 70988) e dos princípios éticos estabelecidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), seguido pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual Paulista e Instituto de Biociências de Botucatu (IBB/UNESP), sob aprovação nº 4790080722. Os espécimes foram coletados, eutanasiados, conservados em álcool 70%, identificados e depositados na coleção ictiológica do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes da UNESP em Botucatu, São Paulo, Brasil (Tabela 5.1).

Figura 5.1 – Mapa de localização dos pontos de coleta *M. australis* e *M. bonita*



Fonte: elaborado pelo autor (2023).

Legenda: Córrego Corredeira ponto de *Moenkhausia australis*; Córrego São José ponto de *Moenkhausia bonita*; Ribeirão Mamoeiro ponto de *Moenkhausia australis*.

Tabela 5.1 – Espécimes de *Moenkhausia* coletados

Espécies	Coordenadas	Localidade/Município	Sub-bacia hidrográfica	LBP	Nº Amostral	
					M	F
<i>Moenkhausia australis</i>	14°38'26.1" S, 56°49'41.7" W	Córrego Mamoeiro/ Denise - MT	Rio Bugres	32746 e 32747	4	4
	14°48'08.33" S, 57°07'25.18" W	Córrego Corredeira/ Denise - MT		32753	1	0
<i>M. bonita</i>	14°39'0.98" S, 57°26'11.62" W	Córrego São José/ Tangará da Serra - MT	Rio Sepotuba	32755 e 32756	9	1

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Legenda: LBP = Número de lote da coleção de Peixes Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, Instituto de Biociências, UNESP. F = fêmea. M = macho. * = em processo de registro.

5.5.2 Obtenção de preparações cromossômicas mitóticas e meióticas

A obtenção de cromossomos mitóticos foi realizada utilizando tecido renal e branquial, seguindo o protocolo descrito em Foresti et al. (1981), com algumas modificações. As preparações de cromossomos meióticos foram obtidas a partir de espermátócitos de *M. australis* e *M. bonita*, segundo protocolo de Araya-Jaime et al. (2015b).

5.5.3 Imunocoloração e anticorpos utilizados

A imunocoloração de cromossomos meióticos seguiu o protocolo de Araya-Jaime et al. (2015b). Foi utilizado o anticorpo primário *guinea pig* anti-MeSYCP3 (Iwai et al., 2004), diluído a 1:100 em PBS 1X. A detecção foi realizada com o anticorpo secundário *goat anti-guinea pig* IgG-FITC (Santa Cruz Biotechnology-sc2441), diluído a 1:100 em PBS 1x.

5.5.4 Hibridização *in situ* (FISH)

As preparações meióticas de *M. australis* e *M. bonita* foram submetidas a técnica de pintura cromossômica com sondas de cromossomos B microdissecados MaB para *M. australis* e MbB para *M. bonita*, conforme os passos descritos no Capítulo 4. A pintura cromossômica foi realizada por meio da utilização da técnica de FISH sob condições de alta estrigência (~ 77%), conforme descrito por Pinkel et al. (1986). A detecção de sinais fluorescentes foi realizada com anti-digoxigenina-rodamina (Roche), para as sondas marcadas com digoxigenina-11-dUTP (Roche) ou com avidina-FITC (Sigma), para as sondas marcadas com biotina-16-dUTP (Sigma). Após esses procedimentos, os cromossomos foram corados com Vectashield/DAPI. As sondas específicas de cromossomos B foram geradas a partir do cromossomo B acrocêntrico, microdissecado do indivíduo 85794 de *M. australis* (MaB) e do cromossomo B metacêntrico pequeno, microdissecado do indivíduo 106067 de *M. bonita* (MbB). Ambas as sondas foram

geradas por dois ciclos do *Genome Plex® Single Cell Whole Genome Amplification Kit - WGA4* e marcação utilizando o WGA3.

5.5.5 Coloração cromossômica

Para visualização e caracterização dos cromossomos B em metáfases mitóticas, os cromossomos foram corados por solução tamponada (pH 6,8) de Giemsa 5% durante 8 minutos. Por sua vez, a qualidade das preparações meióticas e visualização do SC foram realizadas por meio da técnica de coloração com Nitrato de Prata (AgNO_3), de acordo com o protocolo descrito por Howell and Black (1980).

5.5.6 Microscopia

As imagens de cromossomos mitóticos e meióticos foram obtidas utilizando o fotomicroscópio de epifluorescência (Olympus® BX61) equipado com câmera digital Olympus® DP80, com a aplicação do *software cellSens Dimension* versão 1 (Olympus®). As imagens obtidas foram manualmente tratadas e montadas com o editor de imagens Adobe Photoshop®.

5.6 RESULTADOS

Neste capítulo são expandidas as análises anteriormente apresentadas no capítulo 4 desta tese, para incluir células em metáfase e anáfase mitótica, assim como espermatócitos em prófase da primeira divisão meiótica, para acompanhar a organização e comportamento dos cromossomos B durante essas fases do ciclo celular.

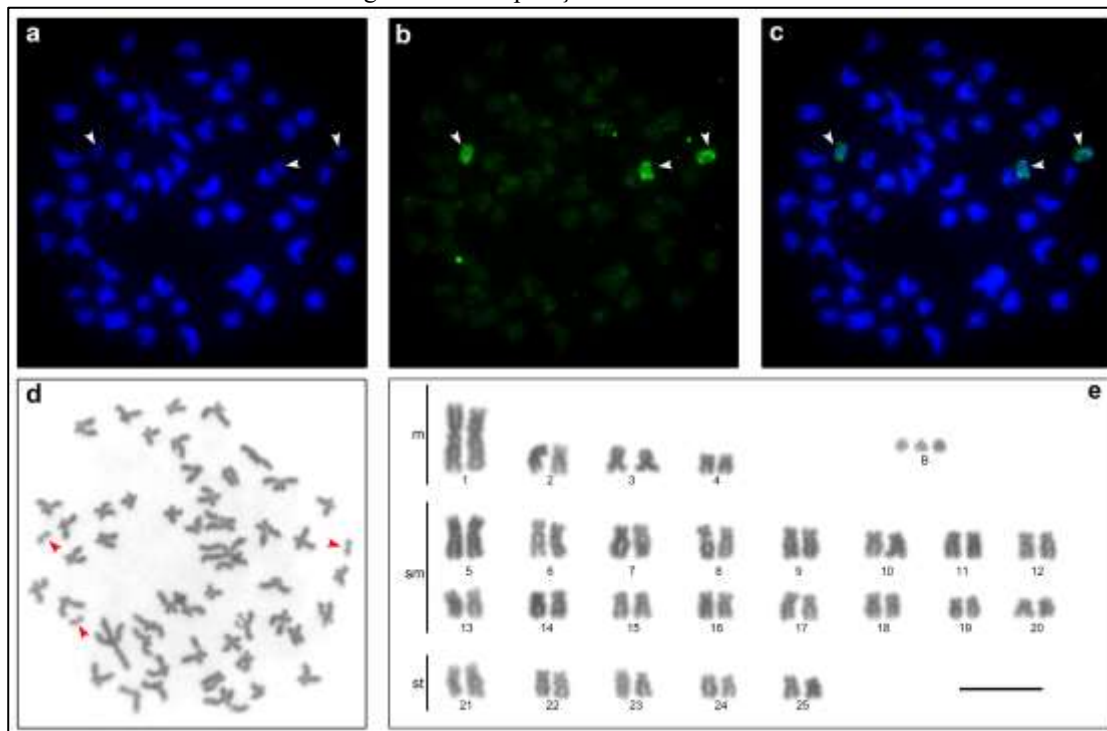
5.6.1 *Moenkhausia australis*

Um total de 410 células mitóticas de *M. australis* foram analisadas. Os espécimes apresentaram um número diploide modal de 50 cromossomos ($8m+32sm+10st$; $NF = 100$) (Figura 5.2). Em adição, foram observados cromossomos B em 38% ($n = 154$) das células analisadas em *M. australis*, que apresentaram variação de 0 a 3 cromossomos do tipo acrocêntrico pequeno nos portadores. Entretanto, esse elemento supranumerário foi observado apenas em células de indivíduos machos (Figura 5.2).

A pintura cromossômica, com a sonda B específica de *M. australis* foi eficiente na localização dos diferentes tipos de cromossomos B observados durante as metáfases e anáfases mitóticas e nos espermatócitos desta espécie. A sonda MaB pintou intensamente os três cromossomos B e algumas regiões dos cromossomos do complemento A. Adicionalmente,

notou-se uma região menos marcada próxima ao centrômero de dois cromossomos B, conforme exposto na Figura 5.2.

Figura 5.2 – Preparações mitóticas de *M. australis*

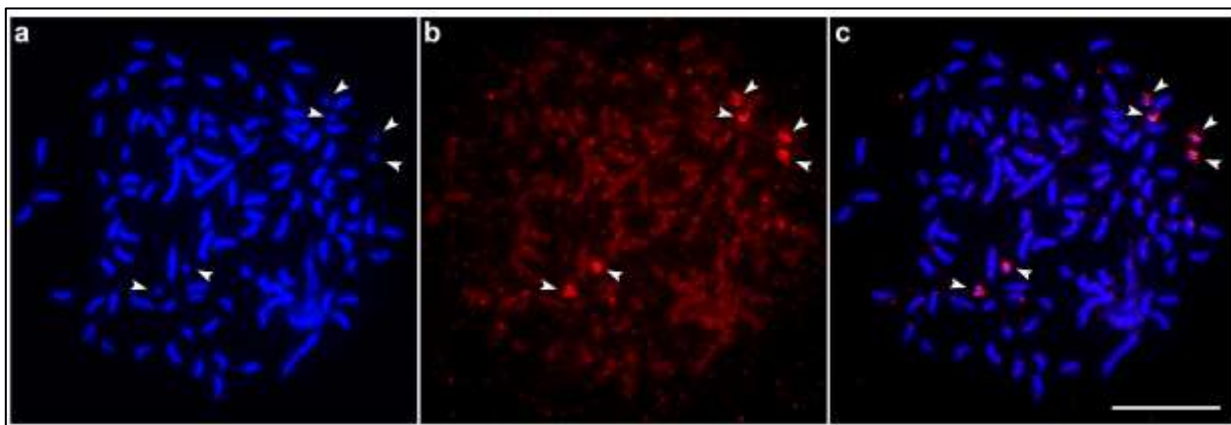


Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Legenda: em **a)** metáfase corada com DAPI (azul); **b)** metáfase após hibridação da sonda MaB; **c)** Sobreposição das imagens a e b. Observe os cromossomos B totalmente hibridizados e os cromossomos A sem sinal evidente. As cabeças de seta indicam os cromossomos B. Barra = 10 μ m.

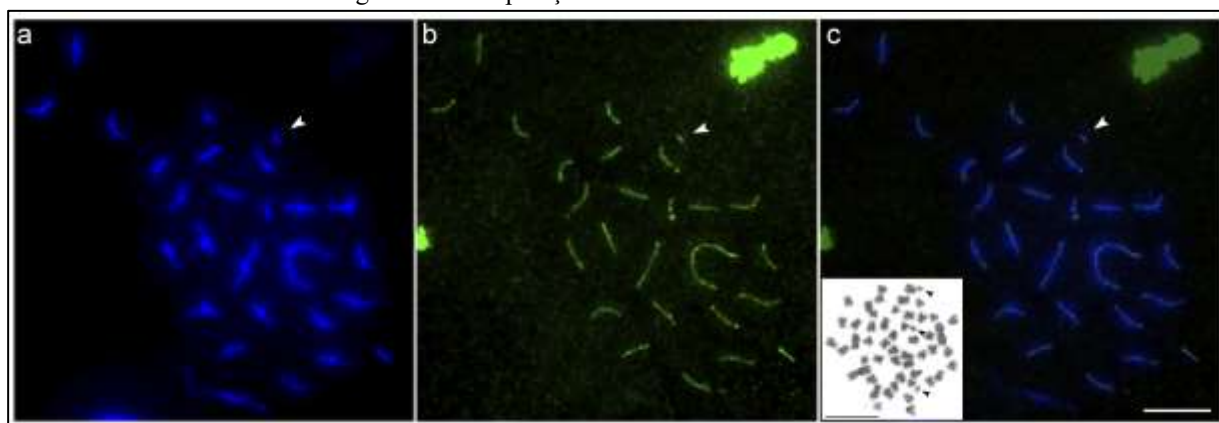
Interessantemente, nas células mitóticas em anáfase foi possível distinguir a regular disjunção das cromátides-irmãs do complemento padrão A e dos cromossomos B. Nessa condição, cada cromátides-irmãs dos cromossomos B se apresentaram separadas, podendo ser tracionadas individualmente para as extremidades opostas nas células filhas, sugerindo regularidade no processo de disjunção cromossômica (Figura 5.3).

Análises meióticas de espermatócitos imunocoloridos com anticorpos anti-SYCP3 em prófase I mostram a formação de 25 bivalentes, correspondendo aos cromossomos do complemento A, bem como a presença de elementos supranumerários de tamanho pequeno, correspondentes aos cromossomos B. Nos espermatócitos em paquíteno foi evidenciada uma aparente regularidade nas sinapses dos cromossomos A e B, não tendo sido observadas descontinuidades no SC de *M. australis* (Figura 5.4).

Figura 5.3 – Anáfase mitótica de *M. australis* submetida a pintura cromossômica com sonda MaB

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Legenda: em **a)** cromossomos corados com DAPI (azul); **b)** após hibridação da sonda MaB; **c)** sobreposição das imagens a e b. Observe a hibridação positiva sobre o cromossomo B. As cabeças de seta indicam o cromossomo B. A barra de escala é de 10 μm .

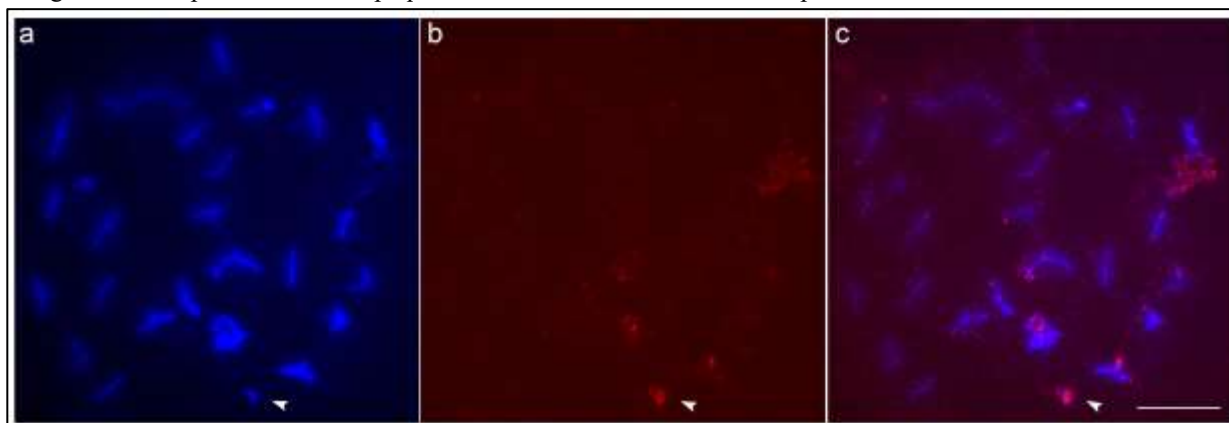
Figura 5.4 – Preparações meióticas e mitóticas de *M. australis*

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Legenda: em **a)** Cromossomos meióticos corados com DAPI (azul); **b)** imunodeteção da proteína SYCP3 com anticorpo anti-medaka SYCP3 (em verde); **c)** Sobreposição das imagens a e b, em destaque metáfase mitótica corada com Giemsa 5%. As cabeças de seta indicam os cromossomos B. Observe a formação de 25 bivalentes correspondente ao complemento padrão A e a presença de um possível polivalente pequeno correspondendo o cromossomo B. Observe o pareamento contínuo e regular ao longo do comprimento dos bivalentes. A barra de escala é de 10 μm .

A identificação do cromossomo B foi possível por meio da técnica de FISH com sonda MaB em paquítenos de *M. australis* (Figura 5.5). Nota-se um sinal de hibridação semelhante ao das células mitóticas e revela-se o tamanho diminuto do cromossomo B, em relação aos cromossomos A (Figura 5.5).

Figura 5.5 – Espermatócitos em paquíteno de *M. australis* submetidos a pintura cromossômica com sonda MaB



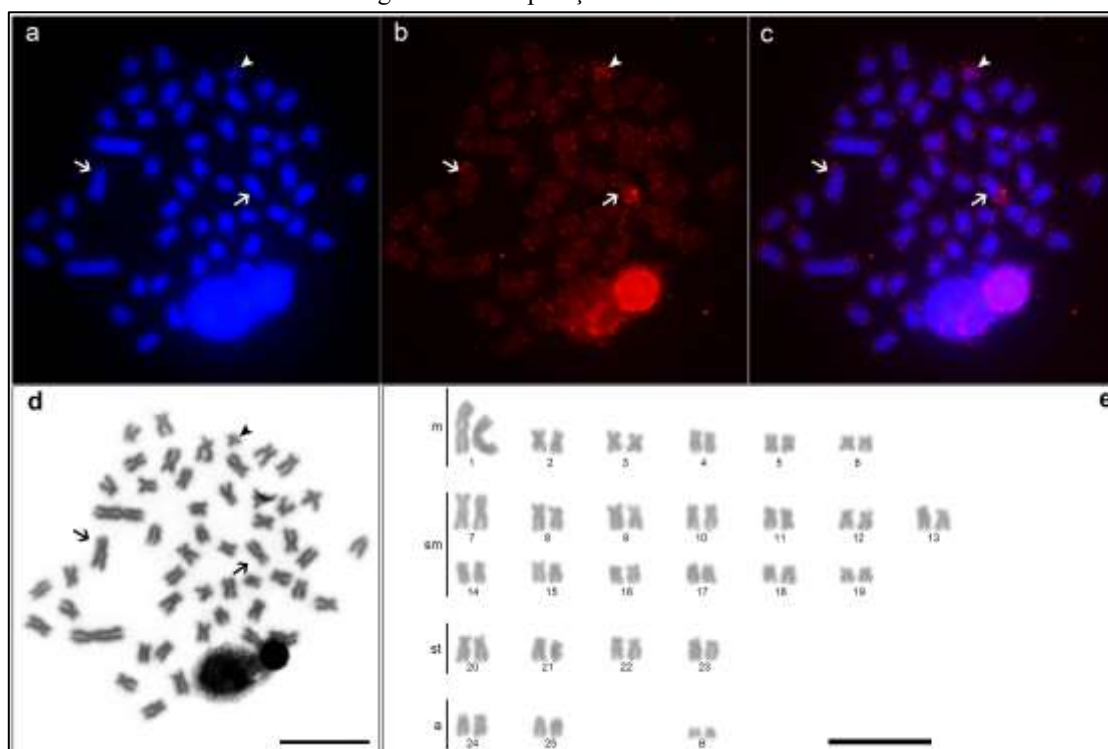
Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Legenda: em **a)** cromossomos em paquítenos corados com DAPI (azul); **b)** paquítenos após hibridação da sonda MaB; **c)** sobreposição das imagens a e b. Observe a hibridação positiva sobre o cromossomo B. As cabeças de seta indicam o cromossomo B. A barra de escala é de 10 μ m.

5.6.2 Moenkhausia bonita

Um total de 129 células de *M. bonita* foram analisadas, sendo que os espécimes apresentaram um número diploide modal de 50 cromossomos (12m+26sm+8st+4a; NF = 96) (Figura 5.6). Foi identificada a presença de cromossomos B do tipo metacêntrico pequeno em 84% (n = 109) das células analisadas, que apresentaram variação de 0 a 2 cromossomos nos portadores em indivíduos de ambos os sexos (Figura 5.6).

A pintura cromossômica com a sonda MbB foi eficiente na localização dos diferentes tipos de cromossomos B observados em metáfases e anáfases mitóticas, assim como nos espermatócitos em paquíteno de *M. bonita* (Figura 5.6).

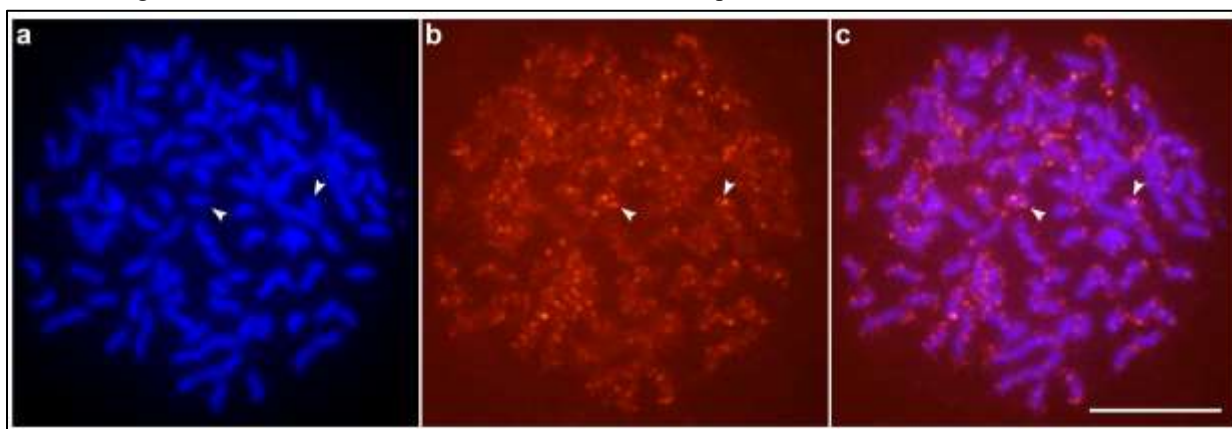
Figura 5.6 – Preparações mitóticas de *M. bonita*

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Legenda: em **a**) metáfase corada com DAPI (azul); **b**) metáfase após hibridação da sonda MbB; **c**) Sobreposição das imagens a e b. Observe os cromossomos B totalmente hibridizados e os cromossomos A sem sinal evidente. As setas indicam o par cromossômico portador das RONS. As cabeças de seta indicam os cromossomos B. A barra de escala é de 10 μ m.

Algumas particularidades foram observadas no comportamento dos cromossomos nas diferentes fases dos processos de divisão celular nesta espécie. A sonda MbB marcou, de modo evidente, os cromossomos B e o braço curto de um par cromossômico do complemento padrão A, possivelmente os cromossomos portadores da RONS. Do mesmo modo, foi observada uma diferença de intensidade de sinais de pintura entre os cromossomos B nas células analisadas (Figura 5.6). Tanto os cromossomos B quanto os cromossomos do complemento padrão A de *M. bonita* apresentaram aparente processo regular de disjunção das cromátides irmãs durante a anáfase (Figura 5.7).

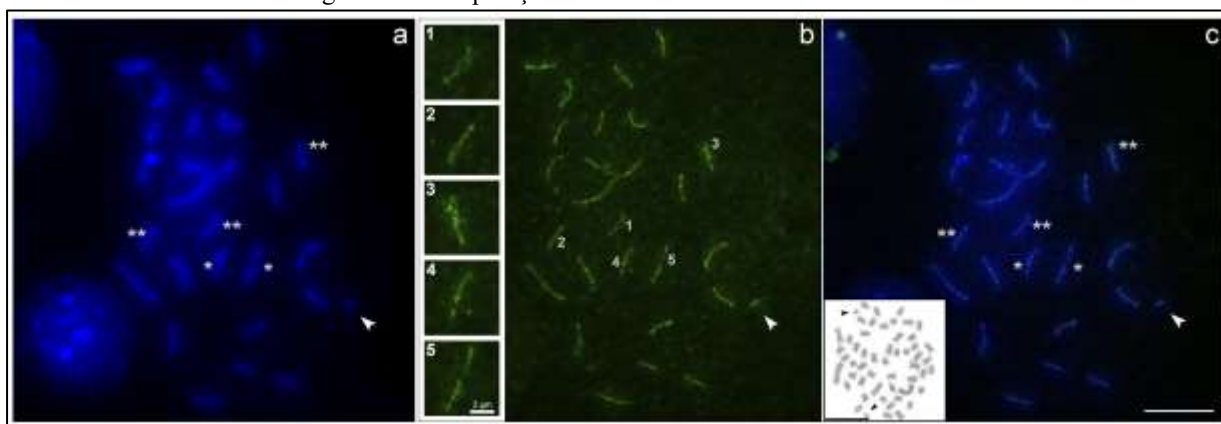
Figura 5.7 – Anáfase mitótica de *M. bonita* submetida a pintura cromossômica com sonda MbB



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Legenda: em **a)** cromossomos corados com DAPI (azul); **b)** após hibridação da sonda MbB; **c)** sobreposição das imagens a e b. Observe a hibridação positiva sobre o cromossomo B. As cabeças de seta indicam o cromossomo B. A barra de escala é de 10 μ m.

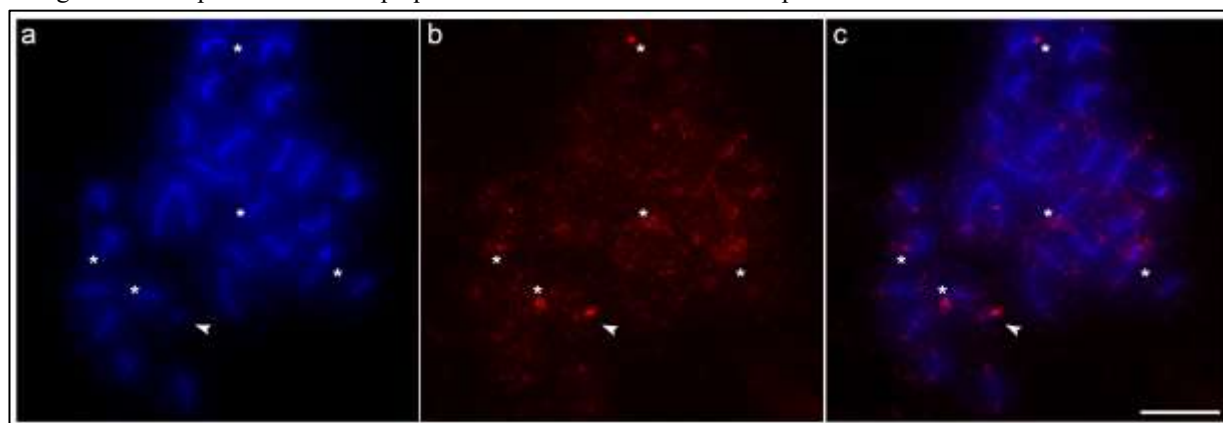
As análises meióticas de espermatócitos imunocoloridos com anticorpos anti-SYCP3 em prófase I mostram a formação de 25 bivalentes, correspondentes aos cromossomos do complemento A, bem como a presença de elementos supranumerários de tamanho pequeno, possivelmente formado pelos cromossomos B. Nas células em fase de paquíteno, foi evidenciada uma aparente regularidade na formação das sinapses dos cromossomos B. No entanto, em algumas porções do complexo sinaptonêmico dos cromossomos do complemento A, foram observadas descontinuidades e estruturas em forma de “bolha”, representando regiões de não pareamento (Figura 5.8).

Figura 5.8 – Preparações meióticas e mitóticas de *M. bonita*

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Legenda: em **a**) Cromossomos meióticos corados com DAPI (azul); **b**) imunodeteção da proteína SYCP3 com anticorpo anti-medaka SYCP3 (em verde); **c**) Sobreposição das imagens a e b, em destaque metáfase mitótica corada com Giemsa 5%. As cabeças de seta indicam os cromossomos B. Observe a formação de 25 bivalentes correspondente ao complemento padrão A e a presença de um elemento pequeno correspondendo ao cromossomo B. Observe a descontinuidades no pareamento (*) e as bolhas (**) em alguns trechos do SC dos cromossomos A. A barra de escala é de 10 μm.

A identificação do cromossomo B foi possível por meio da aplicação da técnica de FISH utilizando a sonda MbB em paquítenos de *M. bonita* (Figura 5.9). Nota-se um sinal de hibridação semelhante ao das células mitóticas, revelando o tamanho diminuto do elemento genômico supranumerário em relação aos cromossomos do complemento A (Figura 5.9).

Figura 5.9 – Espermatócitos em paquíteno de *M. bonita* submetidos à pintura cromossômica com sonda MbB

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Legenda: em **a**) cromossomos em paquítenos corados com DAPI (azul); **b**) paquítenos após hibridação de sonda MbB; **c**) sobreposição das imagens a e b. Os asteriscos destacam os sinais de hibridações positivas sobre os cromossomos A e as cabeças de seta indicam o cromossomo B. A barra de escala é de 10 μm.

5.7 DISCUSSÃO

As espécies de peixes do gênero *Moenkhausia* possuem uma macroestrutura cariotípica conservada, evidenciando uma baixa variação do número diploide e poucas ocorrências de cromossomos acrocêntricos (DANTAS et al., 2007; PORTELA-CASTRO; JÚLIO JÚNIOR, 2002). Entretanto, distintos rearranjos podem ser observados na microestrutura cariotípica das espécies (NASCIMENTO et al., 2020; RANUCCI et al., 2021; UTSUNOMIA et al., 2016) e a presença de cromossomos B é uma característica citogenética intrigante nos componentes desse gênero.

Desde os primeiros registros no final dos anos 80, os cromossomos B em espécies de *Moenkhausia* vêm ganhando destaque nas pesquisas citogenéticas (FORESTI; ALMEIDA-TOLEDO; TOLEDO, 1989; PORTELA; GALETTI; BERTOLLO, 1988; SANTOS et al., 2021; SCUDELER et al., 2015; UTSUNOMIA et al., 2016). Resultados obtidos a partir de pinturas cromossômicas têm demonstrado a similaridade entre os cromossomos B e os cromossomos do complemento A portadores das RONS, indicando uma possível origem intraespecífica do B em *M. sanctaefilomenae* (SCUDELER et al., 2015; UTSUNOMIA et al., 2016). A origem intraespecífica também é sugerida para os cromossomos B de *M. oligolepis*, no caso um isocromossomo B (Santos et al. 2021). É importante destacar que o mapeamento físico de diferentes sequências de DNA repetitivo nos cromossomos B, como sequências de DNAr 18S, histonas H1 e H3, e de DNAs satélites (MS3 e MS7), abre novos cenários nos estudos da citogenética de *Moenkhausia* (FORESTI; ALMEIDA-TOLEDO; TOLEDO, 1989; HASHIMOTO et al., 2012; NASCIMENTO et al., 2020; UTSUNOMIA et al., 2016) e permite análises comparativas entre espécies filogeneticamente próximas conforme apresentado no Capítulo 4 desta tese.

Pinturas cromossômicas realizadas no presente trabalho em células mitóticas revelaram um processo regular de disjunção das cromátides irmãs dos cromossomos B durante a anáfase mitótica de *M. australis* e *M. bonita*. Essa observação permite sugerir que as regiões geradoras de força nos cromossomos como os cinetócoros possam estar ativas, possibilitando a perfeita e correta separação das cromátides irmãs nos cromossomos B e, consequentemente, possam migrar independentemente para polos opostos da célula ou subsequente eliminação por atraso na anáfase (LI et al., 2022). O fato de não serem observadas células somáticas contendo mais de três cromossomos B em *M. australis* ou mais de dois cromossomos B em *M. bonita* pode corroborar esta hipótese. De acordo com Li et al. (2022) o centrômero do cromossomo B é um componente chave no processo de eliminação de cromossomos, uma vez que a ausência de ligação das fibras do fuso a esses pontos nos cromossomos pode causar a ocorrência de não disjunção, com a

consequente não migração estes elementos para os polos das células filhas. Em espécimes da planta *Aegilops speltoides* foi verificado que a principal causa de eliminação dos cromossomos B em células radiculares ocorre devido a anomalias na região centromérica destes elementos genômicos (LI et al., 2022). Contudo, a existência ainda de lacunas na compreensão total sobre os processos e mecanismos envolvidos na segregação cromossômica indicam a necessidade de estudos específicos nessa área (ANJUR-DIETRICH; KELLEHER; NEEDLEMAN, 2021; KOMLUSKI; STUKENBROCK; HABIG, 2022). Finalmente, células com número inferior a três cromossomos B podem representar um exemplo dos complexos padrões de mosaicismo (FRAGOULI et al., 2013; LI et al., 2022) ou da existência da ação de mecanismos de eliminação após anáfase, promovido por não disjunção ou segregação desigual dos cromossomos B durante a meiose (KOMLUSKI; STUKENBROCK; HABIG, 2022; PIRES; SAMPAIO; DIAS, 2015).

Durante a meiose, os espermatócitos em estágio de paquíteno devem apresentar complexos sinaptonêmicos regulares, para manter os cromossomos homólogos fisicamente juntos e garantindo, assim, o não acionamento dos *checkpoints* meióticos. A ocorrência de sinapse regular entre os cromossomos B permite sugerir que esses cromossomos se pareiam regularmente na prófase I e a ocorrência de pareamento indica que, possivelmente, estes cromossomos possam estar sofrendo *crossing-overs*, permitindo a homogeneização de sequências entre eles. Esta condição permitiria explicar como as sondas de DNA de cromossomos inteiros, produzidas a partir de um único cromossomo B, pintam intensamente os demais cromossomos B de *M. australis* (dados apresentados no Capítulo 4 desta tese). Por sua vez, as descontinuidades observadas nos cromossomos A de *M. bonita* poderiam representar regiões ainda não pareadas ou ainda, serem o início da desmontagem do SC no início do diplóteno. No entanto, a ação de artefatos decorrentes da técnica de fixação do material também não pode ser descartada, devendo ser objeto de melhor investigação, conforme sugerido por Ortiz et al. (2021).

Análises dos cromossomos meióticos em outros grupos de peixes também evidenciam cromossomos B formando bivalentes regulares na fase de paquíteno durante a prófase I, como é o caso de evidências identificadas em *C. gomesi* (SERRANO et al., 2016), em *P. paranae* (SILVA et al., 2021) e em *Astatotilapia latifasciata* (CARDOSO et al., 2022). De modo geral, esses trabalhos demonstram a habilidade dos cromossomos B em superar os *checkpoints* meióticos, garantindo a continuação dos processos de espermatogênese e ovogênese, resultando na sua permanência em populações naturais. Entretanto, como sugerido por Serrano et al. (2016) e Silva et al. (2021), o posicionamento do cromossomo B no núcleo poderia ser decisivo na sua configuração como univalente ou bivalente durante a meiose, sendo que, contudo, os mecanismos

subjacentes desse processo ainda necessitam ser mais bem esclarecidos. Dada a grande complexidade dos mecanismos de *checkpoints* durante a meiose, investigar como os cromossomos B se segregam na gametogênese será um caminho interessante na investigação dos processos de manutenção desses elementos genômicos nas espécies e populações.

Neste contexto, considera-se que os estudos das variantes dos cromossomos B em outras populações são fundamentais para o entendimento dos processos que garantem a progressão meiótica e a manutenção destes elementos genômicos durante a gametogênese de *Moenkhausia*. A viabilização e utilização de outros anticorpos reativos que possam ser aplicados no estudo dos mecanismos envolvidos com a recombinação, metilação da cromatina e estruturação dos centrômeros, certamente poderão trazer novas informações a respeito do comportamento dos cromossomos B durante as diferentes fases do ciclo celular.

5.8 REFERÊNCIAS

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

CONCLUSÕES

Neste trabalho se descreveu a composição cariotípica de quatro espécies de *Moenkhausia* acrescentando novos dados aos conhecimentos citogenéticos sobre o gênero, a saber:

1. As espécies *M. australis*, *M. bonita*, *M. cf. forestii* e *M. oligolepis* apresentam $2n = 50$ cromossomos com fórmula cariotípica composta principalmente de cromossomos do tipo metacêntricos, submetacêntricos e subtelocêntricos. Tais características demonstram que o número e a morfologia dos cromossomos são conservados entre as espécies do gênero. Entretanto, as microestruturas cromossômicas (banda C, RONS e o DNAr 5S) são mais semelhantes entre as espécies filogeneticamente relacionadas.
2. Os sítios de DNAr 5S foram mapeados em múltiplos cromossomos de *M. australis*, *M. bonita*, *M. cf. forestii* e *M. oligolepis*, ocupando preferencialmente posição intersticial nos cromossomos. Por sua vez, os sítios de DNAr 18S se mostram simples, sendo mapeados no braço curto de um único par cromossômico nestas espécies.
3. As análises de microdissecção e pintura cromossômica proporcionaram novos marcadores que permitiu a identificação dos cromossomos B e a observação de sinais fluorescentes sobre alguns cromossomos A. Estas sondas podem ser utilizadas em estudos futuros que permitem delinear a origem, composição e evolução dos cromossomos B.
4. A pintura cromossômica em anáfases mitóticas, com as sondas específicas de cromossomos B, revelou uma regular disjunção das cromátides-irmãs dos cromossomos B em *M. australis* e *M. bonita*. Este resultado pode indicar a capacidade dos cromossomos B em aumentar sua ocorrência em células somáticas observados nestas espécies.
5. Os cromossomos B não realizam pareamento com os cromossomos do complemento A durante o estágio de paquíteno em *M. australis* e *M. bonita*. Além disso, a regularidade nas sinapses meióticas dos cromossomos B pode ter um papel essencial, garantindo o não acionamento dos *checkpoints*, o que permite a continuação da gametogênese e resulta na manutenção dos cromossomos B.

A descrição cariotípica apresentada nesta tese amplia as informações citogenéticas sobre espécies de *Moenkhausia*, por meio da utilização de técnicas de mapeamento de DNA repetitivo, descrição de cromossomos B e obtenção de novas sondas de DNA microdissecado.

CONCLUSIONES

En este trabajo se describe la composición cariotípica de cuatro especies de *Moenkhausia* añadiendo nuevos datos al conocimiento citogenético sobre el género, a saber:

1. Las especies *M. australis*, *M. bonita*, *M. cf. forestii* y *M. oligolepis* presentan $2n = 50$ cromosomas con fórmula cariotípica compuesta principalmente por cromosomas de tipo metacéntrico, submetacéntrico y subtelocéntrico. Tales características demuestran que el número y la morfología cromosómica se conservan entre las especies del género. Sin embargo, las microestructuras cromosómicas (banda C, RONS y el 5S DNAr) son más similares entre las especies filogenéticamente relacionadas.
2. Los sitios 5S DNAr fueron mapeados en múltiples cromosomas de *M. australis*, *M. bonita*, *M. cf. forestii* y *M. oligolepis*, ocupando preferentemente posición intersticial en los cromosomas. Por su parte, los sitios 18S DNAr son simples, estando mapeados en el brazo corto de un único par cromosómico en estas especies.
3. Los análisis de microdissección y pintura cromosómica proporcionaron nuevos marcadores que permitieron la identificación de cromosomas B y la observación de señales fluorescentes en algunos cromosomas A. Estas sondas pueden ser utilizadas en futuros estudios que permitan delinear el origen, composición y evolución de los cromosomas B.
4. La pintura cromosómica en anafases mitóticas, con las sondas específicas del cromosoma B, reveló una disyunción regular de las cromátidas hermanas de los cromosomas B en *M. australis* y *M. bonita*. Este resultado puede indicar la capacidad de los cromosomas B de aumentar su presencia en las células somáticas observadas en estas especies.
5. Los cromosomas B no se emparejan con los cromosomas del complemento A durante el paquitene en *M. australis* y *M. bonita*. Además, la regularidad en las sinapsis meióticas de los cromosomas B puede jugar un papel esencial, garantizando la no activación de los puntos de control, lo que permite la continuación de la gametogénesis y resulta en el mantenimiento de los cromosomas B.

La descripción cariotípica presentada en esta tesis amplía la información citogenética sobre las especies de *Moenkhausia*, mediante el uso de técnicas de mapeo de ADN repetitivo, la descripción de los cromosomas B y la obtención de nuevas sondas de ADN microdisseccionado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, S. F.; MARTINS, C. The modern view of B chromosomes under the impact of high scale omics analyses. **Cells**, Basel, v. 8, n. 2, p. 156, 2019. DOI 10.3390/cells8020156.
- ALBERDI, A. J.; FENOCCHIO, A. S. Karyotypes of five Tetragonopterinae species (Pisces, Characidae) from Argentina. **Cytologia**, Tokyo, v. 62, n. 2, p. 171–176, 1997. DOI 10.1508/cytologia.62.171.
- ALBERT, J. S. *et al.* Barrier displacement on a neutral landscape: toward a theory of continental biogeography. **Systematic Biology**, Oxford, v. 66, n. 2, p. 167–182, 2017. DOI 10.1093/sysbio/syw080.
- ALBERT, J. S.; REIS, R. E. Historical biogeography of neotropical freshwater fishes. **Systematic Biology**, Oxford, v. 61, n. 3, p. 543–545, 2012. DOI 10.1093/sysbio/syr113.
- ALBERT, J. S.; TAGLIACOLLO, V. A.; DAGOSTA, F. Diversification of neotropical freshwater fishes. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, Palo Alto, v. 51, n. 1, p. 27–53, 2020. DOI 10.1146/annurev-ecolsys-011620-031032.
- ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; FORESTI, F.; TOLEDO-FILHO, S. A. Karyotypic evolution in Neotropical freshwater fish. **Chromosomes today**, Birkhäuser Basel, v. 13, p. 169–182, 2000. DOI 10.1007/978-3-0348-8484-6.
- ANJUR-DIETRICH, M. I.; KELLEHER, C. P.; NEEDLEMAN, D. J. Mechanical mechanisms of chromosome segregation. **Cells**, Basel, v. 10, n. 2, p. 465, 2021. DOI 10.3390/cells10020465.
- ARAI, R. **Fish karyotypes: a check list**. Tokyo: Springer, 2011.
- ARAYA-JAIME, C. *et al.* Meiotic surface-spread and immunodetection for synaptonemal complex proteins in teleost fish. In: OZOUF-COSTAZ, C. *et al.* (org.). **Fish cytogenetic techniques**. Boca Raton: CRC Press, 2015a. p. 82–87. DOI 10.1201/b18534.
- ARAYA-JAIME, C. *et al.* Surface-spreading technique of meiotic cells and immunodetection of synaptonemal complex proteins in teleostean fishes. **Molecular Cytogenetics**, London, v. 8, n. 4, 2015b. DOI 10.1186/s13039-015-0108-9.
- AREFJEV, V. A. Chromosome complements of four characid species (Characidae, Teleostei). **Zoologicheskii Zhurnal**, Moscow, v. 68, n. 5, p. 82–91, 1989.
- BALESDENT, M-H. *et al.* The dispensable chromosome of *Leptosphaeria maculans* shelters an effector gene conferring avirulence towards *Brassica rapa*. **New Phytologist**, Oxford, v. 198, p. 887–898, 2013. DOI 10.1111/nph.12178.
- BARNUM, Kevin J.; O'CONNELL, Matthew J. Cell Cycle Regulation by Checkpoints. In: **Methods in Molecular Biology**. New York. v. 1170p. 29–40. DOI 10.1007/978-1-4939-0888-2_2.
- BENINE, R. C.; CASTRO, R. M. C.; SANTOS, A. C. A. A new *Moenkhausia* Eigenmann, 1903 (Ostariophysi: Characiformes) from Chapada Diamantina, rio Paraguaçu Basin, Bahia,

Northeastern Brazil. **Neotropical Ichthyology**, São Paulo, v. 5, n. 3, p. 259–262, 2007. DOI 10.1590/S1679-62252007000300004.

BENINE, R. C.; MARIGUELA, T. C.; OLIVEIRA, C. New species of *Moenkhausia* Eigenmann, 1903 (Characiformes: Characidae) with comments on the *Moenkhausia oligolepis* species complex. **Neotropical Ichthyology**, São Paulo, v. 7, n. 2, p. 161–168, 2009. DOI 10.1590/S1679-62252009000200005.

BERTOLLO, L. A. C.; TAKAHASHI, C. S.; MOREIRA FILHO, O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v. 1, n. 2, p. 103–120, 1978.

CABRAL-DE-MELLO, D. C.; MAREC, F. Universal fluorescence in situ hybridization (FISH) protocol for mapping repetitive DNAs in insects and other arthropods. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 296, n. 3, p. 513–526, 2021. DOI: 10.1007/s00438-021-01765-2.

CAMACHO, J. P. M. B Chromosomes. In: GREGORY, T. R. (ed.). **The evolution of the genome**. Cambridge: Academic Press, 2005. cap. 4, p. 223–286. DOI 10.1016/B978-012301463-4/50006-1. ISBN 978-0-12-301463-4.

CAMACHO, J. P. M. *et al.* Satellite DNA is an inseparable fellow traveler of B chromosomes. In: UGARKOVIĆ, Đ. (ed.). **Progress in molecular and subcellular biology**. New York: Springer, 2021. v. 60, p. 85–102. DOI 10.1007/978-3-030-74889-0_4.

CAMACHO, J. P. M.; SHARBEL, T. F.; BEUKEBOOM, L. W. B-chromosome evolution. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**. Series B: Biological Sciences, London, v. 355, n. 1394, p. 163–178, 2000. DOI 10.1098/rstb.2000.0556.

CARDOSO, A. L. *et al.* Meiotic behavior, transmission and active genes of B chromosomes in the cichlid *Astatotilapia latifasciata*: new clues about nature, evolution and maintenance of accessory elements. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 297, p. 1151–1167, 2022. DOI 10.1007/s00438-022-01911-4.

CARVALHO, R. A.; MARTINS-SANTOS, I. C.; DIAS, A. L. B chromosomes: an update about their occurrence in freshwater Neotropical fishes (Teleostei). **Journal of Fish Biology**, Oxford, v. 72, n. 8, p. 1907–1932, 2008. DOI 10.1111/j.1095-8649.2008.01835.x.

CASSEMIRO, F. A. S. *et al.* Landscape dynamics and diversification of the megadiverse South American freshwater fish fauna. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 120, n. 2, p. e2211974120, 2023. DOI 10.1073/pnas.2211974120.

CIOFFI, M. B.; BERTOLLO, L. A. C. Chromosomal distribution and evolution of repetitive DNAs in fish. **Genome Dynamics**, Basel, v. 7, p. 197–221, 2012. DOI 10.1159/000337950.

CIOFFI, M. B.; MARTINS, C.; BERTOLLO, L. A. C. 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**, London, v. 10, p. 271, 2010. DOI 10.1186/1471-2148-10-271.

- COLE, C. J. *et al.* Chromosome preparations of amphibians and reptiles: improved technique. **Herpetological Review**, Lawrence, v. 3, n. 6, p. 102, 1971. Disponível em: <https://www.dropbox.com/s/buwbmp3x5zrxnk8/HR%201971.3.6R.pdf?dl=1>. Acesso em: 29 jun. 2023.
- COSTA, W. J. E. M. Description of two new species of the genus *Moenkhausia* (Characiformes: Characidae) from the central Brazil. **Zoologischer Anzeiger**, Amsterdam, v. 232, n. 1–2, p. 21–29, 1994.
- D'AMBROSIO, U. *et al.* B-chrom: a database on B-chromosomes of plants, animals and fungi. **New Phytologist**, Oxford, v. 216, n. 3, p. 635–642, 2017. DOI 10.1111/nph.14723.
- DAGOSTA, F. C. P.; MARINHO, M. M. F.; BENINE, R. C. A new species of *Moenkhausia* Eigenmann (Characiformes: Characidae) from the upper rio Juruena basin, central Brazil. **Zootaxa**, Auckland, v. 4032, n. 4, p. 417, 2015. DOI 10.11646/zootaxa.4032.4.6.
- DAGOSTA, F. C. P.; PINNA, M. The fishes of the amazon: distribution and biogeographical patterns, with a comprehensive list of species. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, New York, v. 2019, n. 431, p. 1–163, 2019. DOI 10.1206/0003-0090.431.1.1.
- DANTAS, E. S. O. *et al.* Cytotaxonomy and Karyotype Evolution in *Moenkhausia* Eigenmann, 1903 (Teleostei, Characidae). **The Nucleus**, New York, v. 50, n. 3, p. 505–518, 2007.
- DVOŘÁK, J. Evidence for genetic suppression of heterogenetic chromosome pairing in polyploidy species of *Solanum*, sect. Petota. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, Ottawa, v. 25, n. 5, p. 530–539, 1983. DOI 10.1139/g83-080.
- EIGENMANN, C. H. New genera of south american fresh-water fishes, and new names for some old genera. **Smithsonian Miscellaneous Collections**, Washington, v. 45, n. 12, p. 144–148, 1903.
- FARIA, R.; NAVARRO, A. Chromosomal speciation revisited: rearranging theory with pieces of evidence. **Trends in Ecology & Evolution**, Amsterdam, v. 25, n. 11, p. 660–669, 2010. DOI 10.1016/j.tree.2010.07.008.
- FERNANDES, C. A.; ALVES, D. S. Occurrence of multiple euchromatic B microchromosomes in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Pisces, Characidae) from the Upper Paraná River Basin, Brazil. **Cytologia**, Tokyo, v. 82, n. 5, p. 547–550, 2017. DOI 10.1508/cytologia.82.547.
- FORESTI, F.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; TOLEDO FILHO, S. A. Polymorphic nature of nucleolus organizer regions in fishes. **Cytogenetic and Genome Research**, Basel, v. 31, n. 3, p. 137–144, 1981. DOI 10.1159/000131639.
- FORESTI, F.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; TOLEDO, S. A. Supernumerary chromosome system, C-banding pattern characterization and multiple nucleolus organizer regions in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Pisces, Characidae). **Genetica**, Dordrecht, v. 79, p. 107–114, 1989. DOI 10.1007/BF00057927.

FRAGOULI, E. *et al.* The origin and impact of embryonic aneuploidy. **Human Genetics**, Berlin, v. 132, p. 1001–1013, 2013. DOI 10.1007/s00439-013-1309-0.

FRICKE, R.; ESCHMEYER, W.; VAN DER LAAN, R. **Eschmeyer's catalog of fishes: genera, species, references**. San Francisco: California Academy of Sciences, 2023.

GRIBBLE, S. *et al.* Chromosome paints from single copies of chromosomes. **Chromosome Research**, Dordrecht, v. 12, p. 143–151, 2004. DOI 10.1023/B:CHRO.0000013167.12527.f0.

HARA, M.; FUKAGAWA, T. Dynamics of kinetochore structure and its regulations during mitotic progression. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 77, n. 15, p. 2981–2995, 2020. DOI 10.1007/S00018-020-03472-4.

HASHIMOTO, D. T. *et al.* Cytogenetic analysis of B chromosomes in one population of the fish *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Steindachner, 1907) (Teleostei, Characiformes). **Comparative Cytogenetics**, Sofia, v. 6, n. 2, p. 141–151, 2012. DOI 10.3897/CompCytogen.v6i2.1769.

HOUBEN, A. B Chromosomes – A matter of chromosome drive. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 8, p. 1–6, 2017. DOI 10.3389/fpls.2017.00210.

HOWELL, W. M.; BLACK, D. A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia**, Basel, v. 36, n. 8, p. 1014–1015, 1980. DOI 10.1007/BF01953855.

IWAI, T. *et al.* Changes in the expression and localization of cohesin subunits during meiosis in a non-mammalian vertebrate, the medaka fish. **Gene Expression Patterns**, Amsterdam, v. 4, n. 5, p. 495–504, 2004. DOI 10.1016/j.modgep.2004.03.004.

JÉZÉQUEL, C. *et al.* Freshwater fish diversity hotspots for conservation priorities in the Amazon Basin. **Conservation Biology**, Malden, v. 34, n. 4, p. 956–965, 2020. DOI 10.1111/cobi.13466.

JOHNSON POKORNÁ, M.; REIFOVÁ, R. Evolution of B chromosomes: from dispensable parasitic chromosomes to essential genomic players. **Frontiers in Genetics**, Lausanne, v. 12, 2021. DOI 10.3389/fgene.2021.727570.

JONES, R. N.; REES, H. **B chromosomes**. Cambridge: Academic Press, 1982.

KOMLUSKI, J.; STUKENBROCK, E. H.; HABIG, M. Non-Mendelian transmission of accessory chromosomes in fungi. **Chromosome Research**, Dordrecht, v. 30, p. 241–253, 2022. DOI 10.1007/s10577-022-09691-8.

KUMON, T.; LAMPSON, M. A. Evolution of eukaryotic centromeres by drive and suppression of selfish genetic elements. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, London, v. 128, p. 51–60, 2022. DOI 10.1016/J.SEMCDB.2022.03.026.

LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANDBERG, A. A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**, London, v. 52, n. 2, p. 201–220, 1964. DOI 10.1111/j.1601-5223.1964.tb01953.x.

- LI, D. *et al.* B-A chromosome translocations possessing an A centromere partly overcome the root-restricted process of chromosome elimination in *Aegilops speltoides*. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, Lausanne, v. 10, p. 1–9, 2022. DOI 10.3389/fcell.2022.875523.
- LIMA, F. C. T. *et al.* Genera *incertae sedis* in Characidae. In: REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS JUNIOR, C. J. (org.). **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. p. 106-169.
- LUI, R. L. *et al.* Possible common origin of B chromosomes in Neotropical fish (Siluriformes, Auchenipteridae) reinforced by repetitive DNA mapping. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 64, p. e21190494, 2021. DOI 10.1590/1678-4324-2021190494.
- MARIGUELA, T. C. *et al.* Molecular phylogeny of *Moenkhausia* (Characidae) inferred from mitochondrial and nuclear DNA evidence. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, Berlin, v. 51, n. 4, p. 327–332, 2013. DOI 10.1111/jzs.12025.
- MATTOX, G. M. T. *et al.* A new miniature species of *Priocharax* (Characiformes: Characidae) from the upper rio Ipixuna, Purus drainage, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, São Paulo, v. 19, n. 2, p. e210048, 2021. DOI 10.1590/1982-0224-2021-0048.
- MELO, B. F. *et al.* Accelerated diversification explains the exceptional species richness of tropical characoid fishes. **Systematic Biology**, Oxford, v. 71, n. 1, p. 78–92, 2022. DOI 10.1093/sysbio/syab040.
- MELTERS, D. P. *et al.* Holocentric chromosomes: convergent evolution, meiotic adaptations, and genomic analysis. **Chromosome Research**, Dordrecht, v. 20, p. 579–593, 2012. DOI 10.1007/s10577-012-9292-1.
- MIRANDE, J. M. Morphology, molecules and the phylogeny of Characidae (Teleostei, Characiformes). **Cladistics**, Hoboken, v. 35, n. 3, p. 282–300, 2019. DOI 10.1111/cla.12345.
- MIYAZAWA, C. S. **Citogenética de caracídeos da bacia do rio Paraguai: análises citotaxonômicas – evolutivas e considerações biogeográficas**. 1997. 176f. Tese (Doutorado). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1997.
- MORRONE, J. J. Biogeographical regionalisation of the Neotropical region. **Zootaxa**, Auckland, v. 3782, n. 1, p. 1, 2014. DOI 10.11646/zootaxa.3782.1.1.
- NASCIMENTO, C. N. *et al.* Molecular cytogenetic analyses reveal extensive chromosomal rearrangements and novel B chromosomes in *Moenkhausia* (Teleostei, Characidae). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 43, n. 4, p. 1-9, 2020. DOI 10.1590/1678-4685-gmb-2020-0027.
- NELSON, J. S.; GRANDE, T. C.; WILSON, M. V. H. **Fishes of the world**. 5th ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2016. DOI 10.1002/9781119174844.
- OLIVEIRA, C. *et al.* Supernumerary chromosomes, Robertsonian rearrangement and multiple NORs in *Corydoras aeneus* (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae). **Caryologia**, Pisa, v. 41, n. 3–4, p. 227–236, 1988. DOI 10.1080/00087114.1988.10797863.

- OLIVEIRA, C. *et al.* Phylogenetic relationships within the speciose family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive ingroup sampling. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 11, n. 1, p. 275, 2011. DOI 10.1186/1471-2148-11-275.
- ORTIZ, R. *et al.* Synaptonemal complex formation produces a particular arrangement of the lateral element-associated DNA. **Experimental Cell Research**, Orlando, v. 399, n. 2, 2021. DOI 10.1016/j.yexcr.2020.112455.
- PAIZ, L. M. **Citogenética como ferramenta no estudo da biodiversidade de “Lambaris” (Characiformes: Characidae) coletados à jusante do rio Iguaçu, Parque Nacional Do Iguaçu, Brasil.** 2013. 76f. Dissertação (Mestrado em conservação e manejo de recursos naturais). Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 2013.
- PANSONATO-ALVES, J. C. *et al.* Single origin of sex chromosomes and multiple origins of B chromosomes in fish genus *Characidium*. **PloS One**, San Francisco, v. 9, n. 9, p. e107169, 2014. DOI 10.1371/journal.pone.0107169.
- PARDO, M. C. *et al.* Mitotic instability of B chromosomes during embryo development in *Locusta migratoria*. **Heredity**, London, v. 74, n. 2, p. 164–169, 1995. DOI 10.1038/hdy.1995.24.
- PENDÁS, A. M. *et al.* Chromosomal mapping and nucleotide sequence of two tandem repeats of atlantic salmon 5S rDNA. **Cytogenetic and Genome Research**, Basel, v. 67, n. 1, p. 31–36, 1994. DOI 10.1159/000133792.
- PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J. W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 83, n. 9, p. 2934–2938, 1986. DOI 10.1073/pnas.83.9.2934.
- PIRES, L. B.; SAMPAIO, T. R.; DIAS, A. L. Mitotic and meiotic behavior of B chromosomes in *Crenicichla lepidota*: new report in the family Cichlidae. **Journal of Heredity**, Baltimore, v. 106, n. 3, p. 289–295, 2015. DOI 10.1093/jhered/esv007.
- PORTELA-CASTRO, A. L. B.; JÚLIO JÚNIOR, H. F. Karyotype relationships among species of the subfamily Tetragonopterinae (Pisces, Characidae): Cytotaxonomic and evolution aspects. **Cytologia**, Tokyo, v. 67, n. 3, p. 329–336, 2002. DOI 10.1508/cytologia.67.329.
- PORTELA-CASTRO, A. L. B.; JÚLIO JÚNIOR, H. F.; NISHIYAMA, P. B. New occurrence of microchromosomes B in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Pisces, Characidae) from the Paraná River of Brazil: analysis of the synaptonemal complex. **Genetica**, Dordrecht, v. 110, n. 3, p. 277–283, 2001. DOI 10.1023/A:1012742717240.
- PORTELA, A. L. B. S.; GALETTI JUNIOR, P. M.; BERTOLLO, L. A. C. Considerations on the chromosome evolution of Tetragonopterinae (Pisces, Characidae). **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 11, n. 2, p. 307–316, 1988.

- RAJPAL, V. R. *et al.* Comprehending the dynamism of B chromosomes in their journey towards becoming unselfish. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, Lausanne, v. 10, 2023. DOI 10.3389/fcell.2022.1072716.
- RANUCCI, L. *et al.* Occurrence of euchromatic B chromosomes in natural populations of *Moenkhausia bonita* and *M. forestii* (Pisces: Characidae). **Neotropical Ichthyology**, São Paulo, v. 19, n. 4, p. e210056, 2021. DOI 10.1590/1982-0224-2021-0056.
- RAVEN, P. H. *et al.* The distribution of biodiversity richness in the tropics. **Science Advances**, Washington, v. 6, n. 37, p. 5-10, 2020. DOI 10.1126/sciadv.abc6228.
- REBORDINOS, L.; CROSS, I.; MERLO, A. High evolutionary dynamism in 5S rDNA of fish: state of the art. **Cytogenetic and Genome Research**, Basel, v. 141, n. 2-3, p. 103–113, 2013. DOI 10.1159/000354871.
- REIA, L. *et al.* Taxonomy of *Moenkhausia australis* Eigenmann, 1908 (Characiformes, Characidae) with a discussion on its phylogenetic relationships. **Zootaxa**, Auckland, v. 4688, n. 2, p. 213–231, 2019. DOI: 10.11646/zootaxa.4688.2.3.
- REIA, L.; OLIVEIRA, C.; BENINE, R. C. *Moenkhausia andrica* (Characiformes: Characidae): a new species from the rio Tapajós basin, Brazil, with minute fin hooklets in females. **Journal of Fish Biology**, Oxford, v. 99, n. 4, p. 1380–1392, 2021. DOI 10.1111/jfb.14847.
- REIS, R. E. *et al.* Fish biodiversity and conservation in South America. **Journal of fish biology**, Oxford, v. 89, n. 1, p. 12–47, 2016. DOI 10.1111/jfb.13016.
- REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS, C. J. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: Edipucrs, 2003.
- ROSSI, A. R. Fish cytogenetics: present and future. **Genes**, Basel, v. 12, n. 7, p. 983, 2021. DOI 10.3390/genes12070983.
- RULL, V.; CARNAVAL, A. C. **Neotropical diversification: patterns and processes**. Cham: Springer International Publishing, 2020. (Fascinating Life Sciences). DOI 10.1007/978-3-030-31167-4.
- SÁNCHEZ, K. I.; TAKAGUI, F. H.; FENOCCHIO, A. S. Cytogenetic analyses in three species of *Moenkhausia* Eigenmann, 1903 (Characiformes, Characidae) from Upper Paraná River (Misiones, Argentina). **Caryologia**, Pisa, v. 74, n. 4, p. 3-10, 2021. DOI 10.36253/caryologia-1064.
- SANTOS, A. F. **Estudos citogenéticos em peixes dos gêneros *Bryconops* e *Moenkhausia* (Teleostei, Characidae, Tetragonopterinae)**. 1999. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, Fundação Universidade do Amazonas, São Carlos, 1999.
- SANTOS, L. P. *et al.* Chromosomal instability and origin of B chromosomes in the Amazonian glass tetra *Moenkhausia oligolepis* (Günther, 1864) (Characiformes, Characidae). **Cytogenetic and Genome Research**, Basel, v. 161, n. 5, p. 249–256, 2021. DOI 10.1159/000517091.

SCUDELER, P. E. S. *et al.* Whole chromosome painting of B chromosomes of the red-eye tetra *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Teleostei, Characidae). **Comparative Cytogenetics**, Sofia, v. 9, n. 4, p. 661–669, 2015. DOI 10.3897/CompCytogen.v9i4.5460.

SERRANO, E. A. *et al.* Meiotic behavior and H3K4m distribution in B chromosomes of *Characidium gomesi* (Characiformes, Crenuchidae). **Comparative Cytogenetics**, Sofia, v. 10, n. 2, p. 255–268, 2016. DOI 10.3897/COMPCYTOGEN.V10I2.7939.

SERRANO, E. A. *et al.* Origin of B chromosomes in *Characidium alipioi* (Characiformes, Crenuchidae) and its relationship with supernumerary chromosomes in other *Characidium* species. **Comparative Cytogenetics**, Sofia, v. 11, n. 1, p. 81–95, 2017. DOI 10.3897/CompCytogen.v11i1.10886.

SILVA, M. *et al.* Evolutionary dynamics of 5S rDNA and recurrent association of transposable elements in electric fish of the family Gymnotidae (Gymnotiformes): the case of *Gymnotus mamiraua*. **Cytogenetic and Genome Research**, Basel, v. 149, n. 4, p. 297–303, 2016. DOI 10.1159/000449431.

SILVA, D. M. Z. A. *et al.* B Chromosomes in *Psalidodon scabripinnis* (Characiformes, Characidae) species complex. **Animals**, Basel, v. 12, n. 17, p. 2174, 2022. DOI 10.3390/ani12172174.

SILVA, D. M. Z. A. *et al.* Chromosomal organization of repetitive DNA sequences in *Astyanax bockmanni* (Teleostei, Characiformes): dispersive location, association and co-localization in the genome. **Genetica**, Dordrecht, v. 141, n. 7–9, p. 329–336, 2013. DOI 10.1007/s10709-013-9732-7.

SILVA, D. M. Z. A. *et al.* Delimiting the origin of a B Chromosome by FISH Mapping, chromosome painting and DNA sequence analysis in *Astyanax paranae* (Teleostei, Characiformes). **PLoS One**, San Francisco, v. 9, n. 4, p. e94896, 2014. DOI 10.1371/journal.pone.0094896.

SILVA, D. M. Z. A. *et al.* Meiotic self-pairing of the *Psalidodon* (Characiformes, Characidae) iso-B chromosome: a successful perpetuation mechanism. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 44, n. 3, p. e20210084, 2021. DOI 10.1590/1678-4685-gmb-2021-0084.

SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**, Orlando, v. 75, n. 1, p. 304–306, 1972. DOI 10.1016/0014-4827(72)90558-7.

SYMONOVÁ, R. *et al.* Genome differentiation in a species pair of coregonine fishes: an extremely rapid speciation driven by stress-activated retrotransposons mediating extensive ribosomal DNA multiplications. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 13, n. 1, p. 42, 2013. DOI 10.1186/1471-2148-13-42.

TAGLIACOLLO, V. A. *et al.* Assessing extinction risk from geographic distribution data in Neotropical freshwater fishes. **Neotropical Ichthyology**, São Paulo, v. 19, n. 3, p. e210079, 2021. DOI 10.1590/1982-0224-2021-0079.

- TONELLA, L. H. *et al.* Neotropical freshwater fishes: a dataset of occurrence and abundance of freshwater fishes in the neotropics. **Ecology**, Washington, v. 104, n. 4, p. e3713, 2023. DOI 10.1002/ecy.3713.
- UTSUNOMIA, R. *et al.* Uncovering the ancestry of B chromosomes in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Teleostei, Characidae). **PLoS One**, San Francisco, v. 11, n. 3, p. e0150573, 2016. DOI 10.1371/journal.pone.0150573.
- VANEGAS-RÍOS, J. A.; BRITZKE, R.; MIRANDE, J. M. Geographic variation of *Moenkhausia bonita* (Characiformes: Characidae) in the rio de La Plata basin, with distributional comments on *M. intermedia*. **Neotropical Ichthyology**, São Paulo, v. 17, n. 1, 2019. DOI 10.1590/1982-0224-20170123.
- WALLACE, A. R. Wallace's geographical distribution of animals. **The American Naturalist**, Chicago, v. 11, n. 4, p. 232-238, 1877. DOI 10.1086/271871.
- WEITZMAN, S. H.; VARI, R. P. Miniaturization in south American fishes; an overview and discussion. **Proceedings of the Biological Society of Washington**, Washington, v. 101, n. 2, p. 444-465, 1988. DOI hdl.handle.net/10088/901.
- WILSON, E. B. The supernumerary chromosomes of Hemiptera. **Science**, New York, v. 26, p. 870-871, 1907.
- ZICKLER, D.; KLECKNER, N. Meiotic chromosomes: integrating structure and function. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 33, p. 603-754, 1999. DOI 10.1146/annurev.genet.33.1.603.
- ZICKLER, D.; KLECKNER, N. Recombination, pairing, and synapsis of homologs during meiosis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, Woodbury, v. 7, n. 6, p. a016626, 2015. DOI 10.1101/cshperspect.a016626.

