

Maria Lígia Marques de Oliveira

**Mapeamento físico de sequências repetitivas de DNA no genoma
de espécies do gênero *Trichomycterus* (Siluriformes,
Trichomycteridae).**

Mestrado

Botucatu

2015

Maria Lígia Marques de Oliveira

Mapeamento físico de sequências repetitivas de DNA no genoma de espécies do gênero *Trichomycterus* (Siluriformes, Trichomycteridae).

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

Orientador: Prof. Dr. Fausto Foresti

Co-orientador: Dr. José Carlos Pansonato Alves

Botucatu

2015

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

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Oliveira, Maria Lígia Marques de.

Mapeamento físico de sequências repetitivas de DNA no
genoma de espécies do gênero *Trichomycterus* (Siluriformes,
Trichomycteridae). / Maria Lígia Marques de Oliveira. -
Botucatu, 2015

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de
Botucatu

Orientador: Fausto Foresti

Coorientador: José Carlos Pansonato Alves

Capes: 20204000

1. Peixe - Genética. 2. Análise de DNA. 3. Heterocromatina.
4. Marcadores genéticos. 5. Cromossomos.

Palavras-chave: DNA repetitivo; Heterocromatina; Marcadores
Citotaxonômicos; Rearranjos Cromossômicos; *Trichomycterus*.

Dedico ao meu avô Antônio Marques de Oliveira (*in memorian*) que me ensinou que para ser feliz, basta combinar simplicidade, esperança e um passeio de carruagem. E ao meu esposo André Batista Nobile, por todo amor e paciência.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Jorge e Mara, por tudo que fizeram por mim ao longo de uma vida. Sempre estiveram ao meu lado, com palavras de incentivo e afeto. Vocês são os anjos mais lindos que Deus poderia colocar para me guardar...Desejo ter sido merecedora de todo carinho e dedicação. Devo à vocês tudo o que conquistei.

A toda minha família, em especial minha irmã Ana Elisa que sempre me apoiou.

Ao meu orientador Prof. Dr. Fausto Foresti pela oportunidade, pela confiança depositada em mim, por todo incentivo na realização deste trabalho. O senhor é um exemplo de pessoa e pesquisador.

Ao meu co-orientador Dr. José Carlos Pansonato Alves, por toda ajuda.

Aos amigos e grandes profissionais Priscilla Cardim e Ricardo Utsunomia, que tanto se dedicaram e me ensinaram nestes dois anos de trabalho.

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

Ao professore Cláudio de Oliveira por ser um grande pesquisador, sempre dedicado aos alunos.

Aos amigos do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes que estão sempre dispostos a ajudar, e que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho: Vanessa Paes, Cristian Araia, Duílio Zerbinato, Érica Serrano, Cristiano Neves, e Viviani Sene.

Aos companheiros de laboratório, que deixaram os dias de rotina mais especiais (um café, uma palavra de incentivo, uma piada): Bruno Melo, Sâmia, Fabilene, Daniela, Luz, Cristiane, Patrícia, Gleysi, Fábio, Fernando Yuldi, Natália, Jeferson, Guilherme, Gabriel, Ricardo Britzke e Raquel.

Aos amigos Diogo Freitas, Felipe Pontieri, Rodrigo Makiyama, Bruno gamba, Rafael Borges, Roberta Caversan, Giovana Branco e Ana Paula Taioqui, pelos momentos de descontração.

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

A CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste projeto.

As minhas amigas Fernanda Yuuzi, Vanessa Enz, Gisele Oliveira, Janaine Honório, Aline Gomes, Caroline Catharino, Bruna Lima, Josi Crestani, Talita Gomes e Vanessa Nahsan, pelo companheirismo e apoio em todos os momentos. Infelizmente não podemos estar sempre juntas, mas vocês são muito especiais.

“Eterno, é tudo aquilo que dura uma fração de segundos, mas com tamanha intensidade, que se petrifica, e nenhuma força jamais o resgata....”

Carlos Drummond de Andrade

Resumo

No presente estudo, foram analisadas citogeneticamente cinco espécies de peixes pertencentes ao gênero *Trichomycterus*: *T. diabolus*, *T. iheringi*, *T. zonatus*, *Trichomycterus* cf. *mimonha* e *Trichomycterus* sp., provenientes de diferentes bacias hidrográficas brasileiras. Foram utilizadas as técnicas de citogenética clássica (coloração com Giemsa, localização das RONS pela marcação com nitrato de Prata e bandamento C) e cito-moleculares (Hibridação Fluorescente *in situ* – FISH com sondas de DNAr 5S e 18S e o snDNA U2). Todas as espécies apresentaram número diploide de $2n=54$ cromossomos com variações em sua fórmula cariotípica. *Trichomycterus diabolus*, *T. iheringi*, *T. zonatus* e *Trichomycterus* cf. *mimonha* apresentaram seu cariótipo com $34m + 12sm + 8st$ e *Trichomycterus* sp. apresentou $36m + 10sm + 8st$, além da ocorrência de cromossomos supranumerários. As espécies também revelaram diferenças em relação ao tamanho dos dois primeiros pares cromossômicos do cariótipo, onde *Trichomycterus* sp. e *T. diabolus* apresentaram o primeiro e segundo metacêntrico de tamanho semelhante e maiores em relação aos demais cromossomos, enquanto em *T. zonatus*, *Trichomycterus* cf. *mimonha* e *T. iheringi* apenas o primeiro metacêntrico foi considerado o maior par. O bandamento C evidenciou blocos heterocromáticos intersticiais nos pares 2, 3, 7, 8, 19 e 23 de *T. iheringi* e no par 18 de *T. diabolus*, sendo que as demais espécies apresentaram blocos centroméricos de diferentes tamanhos espalhados por quase todo o cariótipo. As RONS foram identificadas em apenas um par cromossômico e foram coincidentes com a hibridação fluorescente *in situ* realizada com a sonda para DNAr 18S, com exceção de *T. zonatus* e *Trichomycterus* sp. que apresentaram marcações centroméricas no primeiro par e em um pequeno metacêntrico, respectivamente. A hibridação com a sonda para DNAr 5S revelou resultados mais diversos, sendo detectado um par para *T. diabolus* e *T. iheringi*, dois pares em *T. zonatus* e *Trichomycterus* sp. e três pares em *Trichomycterus* cf. *mimonha*. Além disso, todas as espécies apresentaram clusters de DNAr 5S e 18S em sentença, com exceção de *T. iheringi*. De forma oposta, o snDNA U2 está distribuído de forma conservada e em sentença com o DNAr 18S nas espécies *T. diabolus*, *T. cf. mimonha* e *Trichomycterus* sp. Ainda, todas estas espécies apresentaram a co-localização destes genes com sítios de DNAr 5S. Os dados apresentados revelaram significativos marcadores citotaxonômicos para este grupo de peixes e contribuíram com informações de interesse para o conhecimento do processo de diferenciação entre as espécies de *Trichomycterus*.

Abstract

In the present study five species of fish from the genus *Trichomycterus* were analyzed cytogenetically, including *T. diabolus*, *T. iheringi*, *T. zonatus*, *Trichomycterus* cf. *mimonha* and *Trichomycterus* sp., collected at different Brazilian basins. The analyses involved classical (Giemsa conventional staining, localization of NORs for silver nitrate marking and C-banding) and molecular cytogenetic techniques (fluorescent *in situ* hybridization with ribosomal 5S and 18S, and U2 snDNA probes). All species showed diploid number of $2n = 54$ chromosomes with variations in karyotype formula. *Trichomycterus diabolus*, *T. iheringi*, *T. zonatus* and *Trichomycterus* cf. *mimonha* presented their karyotype with $34m + 12sm + 8st$ and *Trichomycterus* sp. presented $36m + 10sm + 8st$, besides the occurrence of supernumerary chromosomes. The species also reveals differences in relation to the size of the first two chromosome pairs of the karyotype, where *Trichomycterus* sp. and *T. diabolus* presented the first and second metacentric with similar size and larger than the other chromosomes, while in *T. zonatus*, *Trichomycterus* cf. *mimonha* and *T. iheringi* only the first metacentric was considered the largest pair. The constitutive heterochromatin showed interstitial blocks in pairs 2, 3, 7, 8, 19 and 23 in *T. iheringi* and the par 18 in *T. diabolus* and the other species presented centromeric blocks with different sizes spread throughout the greater part of the karyotype. NORs were identified in only one chromosome pair and were coincident with the fluorescent *in situ* hybridization using probes of 18S rDNA, except for *T. zonatus* and *Trichomycterus* sp. that showed additional centromeric signals on the first pair and other small metacentric, respectively. FISH using the probes of 5S rDNA was differentially distributed in the different species, with one chromosome pairs detected in *T. diabolus*, two pairs in *T. iheringi*, *T. zonatus* and three pairs in *Trichomycterus* sp. and *T. cf. mimonha*. In addition, all species showed the clusters of 5S and 18S rDNA in syntenic, except for *T. iheringi*. Conversely, the snDNA U2 was distributed conservatively and syntenic with the 18S rDNA in *T. diabolus*, *T. cf. mimonha* and *Trichomycterus* sp. Finally, all analyzed species showed co-localization of these two genes and the 5S rDNA. The presented data showed significant cytotaxonomic markers for this group of fish and important information to understanding the process of differentiation between the species of *Trichomycterus*.

Sumário

1 Introdução	1
1.1 Citogenética e Peixes Neotropicais.....	1
1.2 Avanços na Citogenética de Peixes Neotropicais.....	1
1.3 Considerações sobre a família Trichomycteridae.....	3
1.4 Cromossomos Supranumerários.....	5
2 Objetivos.....	6
3 Materiais e métodos	7
3.1 Materiais	7
3.1.1 Espécies estudadas e locais de coleta.....	7
3.2 Métodos.....	8
3.2.1 Estimulação de Mitoses.....	9
3.2.2 Obtenção de Cromossomos Metafásicos.....	9
3.2.3 Detecção das Regiões Organizadoras de Nucléolos (RONs) através da Impregnação com Nitrato de Prata (AgNO ₃).....	10
3.2.4 Identificação da Heterocromatina Constitutiva	11
3.2.5 Extração de DNA genômico	12
3.2.6 Preparação das sondas de DNA para hibridação fluorescente <i>in situ</i> (FISH)	12
3.2.6.1 Preparação das sondas de DNAr 18S e 5S	12
3.2.6.2 Preparação da sonda de snDNA U2	13
3.2.7 Hibridação Fluorescente <i>in situ</i>	13
3.3 Estudos Cariotípicos.....	15
4 Resultados e Discussão	16
4.1 Capítulo 1- Caracterização citogenética de cinco espécies do gênero <i>Trichomycterus</i> (Siluriformes, Trichomycteridae).....	16
4.2 Capítulo 2- Mapeamento físico dos genes DNAr 18S e snDNA U2 em três espécies do gênero <i>Trichomycterus</i> (Siluriformes, Trichomycteridae).....	16

5 Considerações finais	38
6 Referências Bibliográficas	40

1 Introdução

1.1 A Citogenética e os Peixes Neotropicais

Os peixes constituem mais da metade do número total de representantes entre os vertebrados existentes, com aproximadamente 27.977 espécies descritas. Deste total, 26.761 espécies são Actinopterygii, indivíduos que possuem nadadeiras com raios, 1.100 são Chondrichthyes, formados por tubarões, raias e quimeras, 108 são Myxinoidea e Petromyzontoidea, que abrange os grupos de feiticeiras e lampreias e oito são Sarcoptrygii (Nelson 2006). A região Neotropical está localizada na área compreendida pela América Central e América do Sul, com aproximadamente 5000 espécies de peixes de água doce descritas até o momento (Reis *et al.* 2013).

Do ponto de vista citogenético, já foram analisadas 3.425 espécies e/ou subespécies de peixes em todo o planeta, sendo que este número representa um pouco mais de 12% do total de espécies de peixes existentes, relacionadas em 62 ordens, 515 famílias, 27977 espécies. No entanto, para algumas ordens e famílias, ainda não existe nenhum tipo de informação cromossômica disponível, enquanto ordens como Characiformes, Cypriniformes e Siluriformes são as que se encontram mais bem estudadas sob o ponto de vista cariotípico (Arai 2011).

As análises das informações citogenéticas disponíveis apontam que os peixes Neotropicais de água doce estão bem representados, existindo dados citogenéticos disponíveis para os principais grupos, notadamente para os Characiformes, Siluriformes e Gymnotiformes (Oliveira *et al.* 2007). Estes dados cariotípicos demonstram que os peixes desta região geográfica apresentam alta variabilidade cariotípica, com a ocorrência de significativos polimorfismos cromossômicos intra e interespecíficos, que vão desde a variação nos números diploides e fórmulas cariotípicas até a ocorrência de cromossomos B e cromossomos sexuais (Oliveira *et al.* 2007).

1.2 Avanços na Citogenética de Peixes Neotropicais

A aplicação de técnicas de bandamento cromossômico, notadamente as de bandas C, bandas de endonucleases de restrição e a de localização de sequências repetitivas nos cromossomos por meio de hibridação in situ fluorescente (FISH), permitiu um rápido e consistente desenvolvimento dos estudos citogenéticos nos últimos anos e tem possibilitado uma contribuição mais efetiva não só para estudos taxonômicos e filogenéticos, como também para uma maior compreensão da estrutura cromossômica dos representantes deste grupo de

organismos (Almeida-Toledo *et al.* 2000, Phillips e Reed 1996; Oliveira e Wright 1998). O DNA repetitivo engloba a organização de sequências genômicas com característica de repetição e é caracterizado por apresentar alta variabilidade, constituindo uma fração considerável do genoma da maioria dos eucariotos (Wagner *et al.* 1993; Charlesworth *et al.* 1994). Esse DNA repetitivo pode ser classificado em três classes principais, sendo a primeira composta por repetições in tandem, que inclui as sequências de DNAs satélites, minissatélites e microssatélites; a segunda classe é composta basicamente por elementos transponíveis (TEs) que englobam sequências de transposons e retrotransposons, enquanto a terceira classe é composta por famílias multigênicas, representadas por sequências repetidas codificadoras, como é o caso de genes ribossomais e histônicos (Sumner 2003; Nagoda *et al.* 2005).

A aplicação de metodologias de estudos citogenéticos em nível molecular, notadamente pela técnica de FISH, é possível realizar a identificação de porções diferenciadas da cromatina nos cromossomos, a obtenção de informações mais precisas acerca da presença de sequências específicas de DNA, a ampliação do conhecimento sobre a estrutura e função cromossômica, a detecção de rearranjos cromossômicos, a construção de mapas gênicos e até mesmo estabelecimento de relações filogenéticas entre os componentes dos grupos biológicos (revisão em Phillips e Reed 1996; Oliveira e Wright 1998; Henning *et al.* 2008).

O mapeamento cromossômico de DNA repetitivo vem sendo utilizado com sucesso nos estudos citogenéticos em peixes. Nos últimos anos, a localização física de elementos transponíveis nos cromossomos mitóticos permitiu avanços no entendimento da dinâmica e evolução dessa classe de DNA repetitivo no genoma das espécies. Utilizando o mapeamento de elementos retrotransponíveis *Rex1* e *Rex3* em peixes da família Loricariidae, Ferreira *et al.* (2010) observaram um padrão de distribuição disperso em regiões eucromáticas e heterocromáticas para ambos os elementos, sugerindo que estas sequências estariam evoluindo juntas ou pela ação do mesmo mecanismo. Por outro lado, mapeando os elementos *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* em peixes ciclídeos, além de observarem a distribuição destas sequências de forma dispersa no genoma, Valente *et al.* (2010) também detectaram grandes blocos pericentroméricos marcados em algumas espécies, postulando que esses elementos são capazes de se acumular em regiões genômicas específicas dentro de cada grupo de peixes.

A detecção de repetições teloméricas também vem sendo realizada com frequência, visando elucidar os processos envolvidos na evolução cariotípica em diferentes grupos. Estudando dois citótipos de *Gymnotus carapo* que se apresentaram com 40 e 42 cromossomos, Milhomem *et al.* (2008) detectaram a existência de sítios teloméricos intersticiais (ITS) nos cromossomos do citótipo com $2n=40$, que possivelmente foram

originados a partir de fusão cêntrica ocorrida envolvendo cromossomos do citótipo com $2n=42$ cromossomos, sugerindo a existência de espécies crípticas neste grupo.

Além das abordagens citadas, o mapeamento físico de sequências repetitivas codificadoras também tem colaborado para um melhor entendimento da diversificação cromossômica em alguns grupos dos peixes. Hashimoto *et al.* (2011), ao localizarem os genes para histonas H1 e DNAr 5S em três espécies do gênero *Astyanax*, afirmaram que a presença destes genes em sintenia em um único par cromossômico seria uma condição comum para esse gênero. Além disso, postularam que *A. bockmanni* e *A. fasciatus* são mais relacionados entre si do que *A. altiparanae* pelo fato de ambas as espécies possuírem clusters adicionais de 5S DNAr em um par cromossômico acrocêntrico, característica não compartilhada pela última espécie. Ainda, o sequenciamento dos genes confirmou os resultados filogenéticos obtidos pela citogenética.

Estudos como estes fornecem informações sobre a organização estrutural de determinadas sequências repetitivas e sua dinâmica no cariótipo dos organismos, revelando a importância do DNA repetitivo na evolução de genomas dos eucariotos, bem como permitem investigar as forças evolutivas às quais estas sequências estão submetidas.

1.3 Considerações sobre a família Trichomycteridae

A família Trichomycteridae representa um dos mais importantes componentes taxonômicos de Loricarioidea, com cerca de 210 espécies conhecidas e numerosas formas ainda não descritas (Ferraris 2007). Esta família de peixes está dividida em oito subfamílias representadas como Copionodontinae, Glanapteryginae, Sarcoglanidinae, Stegophilinae (incluindo Pareiodontinae), Trichogeninae, Trichomycterinae, Tridentinae e Vandelliinae e caracteriza-se como um grupo monofilético, pois exibe sete sinapomorfias, a maioria das quais concentradas no arco opercular suspensivo, estrutura altamente modificada que permite que esses peixes possam ancorar em qualquer substrato ou em qualquer tecido de seus hospedeiros (de Pinna 1998). Por outro lado, a subfamília Trichomycterinae caracteriza-se como um grupo não monofilético que inclui atualmente oito gêneros e aproximadamente 100 espécies (Wosiacki 2002). O gênero *Trichomycterus*, considerado o mais especioso dentro de Trichomycterinae, apresenta cerca de 120 espécies descritas (Sarmiento-Soares *et al.* 2011) e caracteriza-se pela grande diversidade de formas, ampla distribuição pela região Neotropical e por geralmente formar populações geograficamente isoladas, na maioria das vezes em cabeceiras de riachos, resultando num elevado grau de endemismo (de Pinna e Wosiacki 2003; Wosiacki e de Pinna 2007).

Apesar do grande número de espécies e da ampla distribuição dos representantes da subfamília Trichomycteridae pela região Neotropical, apenas alguns estudos citogenéticos foram realizados em representantes deste grupo (Arratia e Campos 1997; Borin e Martins-Santos 1999; Sato *et al.* 2004; Torres *et al.* 2004). O número diplóide entre os representantes deste grupo varia de $2n=50$ cromossomos em *Trichomycterus* sp. (Arratia e Campos 1997) até $2n=64$ em *Vandellia cirrhosa* (Scheel 1973), embora a maioria das espécies desta família apresente $2n=54$ cromossomos (Sato *et al.* 2004). No entanto, entre as espécies de *Trichomycterus* foi observada significativa diferenciação em relação ao número diplóide, que variou de $2n=50$ em *Trichomycterus* sp. (Arratia e Campos 1997) a $2n=62$ em *T. laucaensis* (Arratia e Veloso 1980), bem como com relação a espécies portadoras de cromossomos B (Borin e Martins-Santos 2000; Torres *et al.* 2002) e casos de triploidia natural (Borin *et al.* 2002).

Os estudos citogenéticos mais significativos relacionados às espécies de *Trichomycterus* foram realizados em *T. davisii*, *T. stawiarski* e *Trichomycterus* sp. (Borin e Martins-Santos 2000), espécies que apresentam cariótipos com 54 cromossomos, provenientes do rio Iguaçu, bacia do Rio Paraná. Nestas análises, a heterocromatina foi localizada em pequenos blocos centroméricos, intersticiais e/ou terminais em diferentes pares cromossômicos nos cariótipos dos representantes das três espécies, indicando que esta porção cromatínica poderia estar desempenhando importante papel no processo de diferenciação cariotípica deste grupo. Por outro lado, as RONS foram localizadas em posição intersticial no segundo par de cromossomos para as três espécies, foram banda-C negativas e intensamente marcadas pelo fluorocromo Cromomicina A3, que evidenciou, além dos sítios ribossomais, as regiões heterocromáticas do primeiro par metacêntrico e do primeiro par submetacêntrico, indicando a existência de regiões heterocromáticas ricas em bases GC nestes cromossomos (Borin e Martins-Santos 2000), bem como a natureza heterogênea da heterocromatina constitutiva presente nos cromossomos destas espécies.

Pode ser considerado, portanto, que análises citogenéticas em nível molecular, com mapeamento físico de diferentes sequências repetitivas, poderão fornecer maiores informações sobre os mecanismos envolvidos na manutenção da macroestrutura cromossômica e também sobre os polimorfismos observados na microestrutura cariotípica deste grupo de peixes.

1.4 Cromossomos supranumerários

Os cromossomos B, também conhecidos como supranumerários, são considerados elementos genômicos adicionais presentes no genoma dos eucariotos, não fazendo parte do complemento padrão cromossômico, denominado como complemento A, por não se enquadrarem às leis Mendelianas de hereditariedade (Camacho *et al.* 2000). Esses elementos ocorrem em cerca de 15% das espécies eucarióticas (Jones 1982) e já foram registrados em espécies de fungos, plantas e animais (Camacho *et al.* 2005). Atualmente, muitos estudos vêm sendo realizados em busca de uma melhor compreensão sobre a origem, função e evolução destes elementos no genoma dos organismos.

A presença de cromossomo B já foi relatada em cerca de 38 espécies de peixes da região Neotropical (Oliveira *et al.* 2007). Alguns trabalhos envolvendo estudos sobre a estrutura a composição destes cromossomos em peixes, como os realizados em *Astyanax scabripinnis* (Mestriner *et al.* 2000), *Prochilodus lineatus* (Maistro *et al.* 1999; Jesus *et al.*, 2003 e Artoni *et al.* 2006) e *Characidium* (Pansonato-Alves *et al.* 2014), apontam para a origem dos cromossomos B existentes possivelmente a partir de elementos genômicos do complemento A.

Embora um padrão de estrutura cariotípica esteja bem estabelecido para os representantes do gênero *Trichomycterus*, casos de polimorfismos numéricos devidos à existência de cromossomos supranumerários já foram evidenciados, como aqueles encontrados em *Trichomycterus paolence* (Torres *et al.* 2002), *Trichomycterus davis* (Borin e Martins-Santos 2000) e *Trichomycterus diabolus* (Torres *et al.* 2004). Entretanto, são necessárias mais análises citogenéticas entre os representantes deste grupo de peixes para se determinar com mais precisão o real significado destes elementos genômicos na sua evolução.

2 Objetivos

Os objetivos do presente trabalho consistiram em analisar o cariótipo e aprofundar os estudos citogenéticos moleculares em diferentes espécies e populações de peixes do gênero *Trichomycterus* provenientes de diferentes componentes hidrográficos brasileiros, utilizando o mapeamento de sequências repetitivas, com a finalidade de:

- ampliar o conhecimento geral sobre as características do genoma neste grupo de peixes, estabelecendo e comparando a estrutura cariotípica de espécies que estão isoladas em diferentes componentes hidrográficos;
- mapear as sequências repetitivas do tipo DNAr 5S, 18S e snRNA U2 que constituem porções representativas do genoma destas espécies, consideradas como componentes chaves para a compreensão dos mecanismos de evolução e diferenciação cariotípica;
- verificar se as sequências de DNA repetitivo mapeadas fisicamente representam causa ou consequência do processo de diferenciação cromossômica dentre os *Trichomycterus*.
- identificar os mecanismos envolvidos no processo de diferenciação e evolução cromossômica deste grupo, bem como as relações entre as espécies na sua diversificação.

3 Materiais e Métodos

3.1 Materiais

3.1.1 Espécies estudadas e locais de coleta

No presente trabalho foram analisadas cinco espécies de peixes do gênero *Trichomycterus*, sendo *T. iheringi*, *T. diabolus*, *T. zonatus*, *T. cf. mimonha* e *Trichomycterus* sp. coletados em diferentes componentes de bacias hidrográficas brasileiras, conforme indicado na Tabela 1; Figuras 1 e 2. De cada indivíduo foram retirados fragmentos de tecido renal para estudos citogenéticos e também fragmentos do fígado, que foram fixados em etanol 95% para estudos moleculares posteriores. Os exemplares utilizados na amostragem foram fixados em formol 10%, conservados em álcool 70% e após identificação, foram depositados na coleção de Peixes do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes do Departamento de Morfologia, UNESP de Botucatu-SP.

Tabela 1. Exemplares de peixes do gênero *Trichomycterus* analisadas. LBP: Coleção de Peixes Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP. N: Número de espécimes analisadas.

Espécies	LBP	Localidade	N	Coordenadas
<i>T. iheringi</i>	LBP 10878	Rio Roseira – Tietê – Bofete, SP	5♀ 3♂	23°01'30"S 48°19'50"O
<i>T. diabolus</i>	LBP 10879	Rio Hortelã - Paranapanema – Botucatu, SP	4♀ 6♂	22°55'24"S 48°32'43"O
<i>T. zonatus</i>	LBP 10877	Rio Grande - Costeira do Sudeste – Ubatuba, SP	4♀ 13♂	23°23'41"S 45°07'17"O
<i>T. cf. mimonha</i>	LBP 10876	Rio Muzambo - Grande – Muzambinho, MG	6♀ 11♂	21°20'46"S 46°30'47"O
<i>Trichomycterus</i> sp	LBP 19564	Córrego da Quinta – Tietê – Itatinga, SP	4♀ 7♂	23°06'30,7"S 48°30'18,1"O

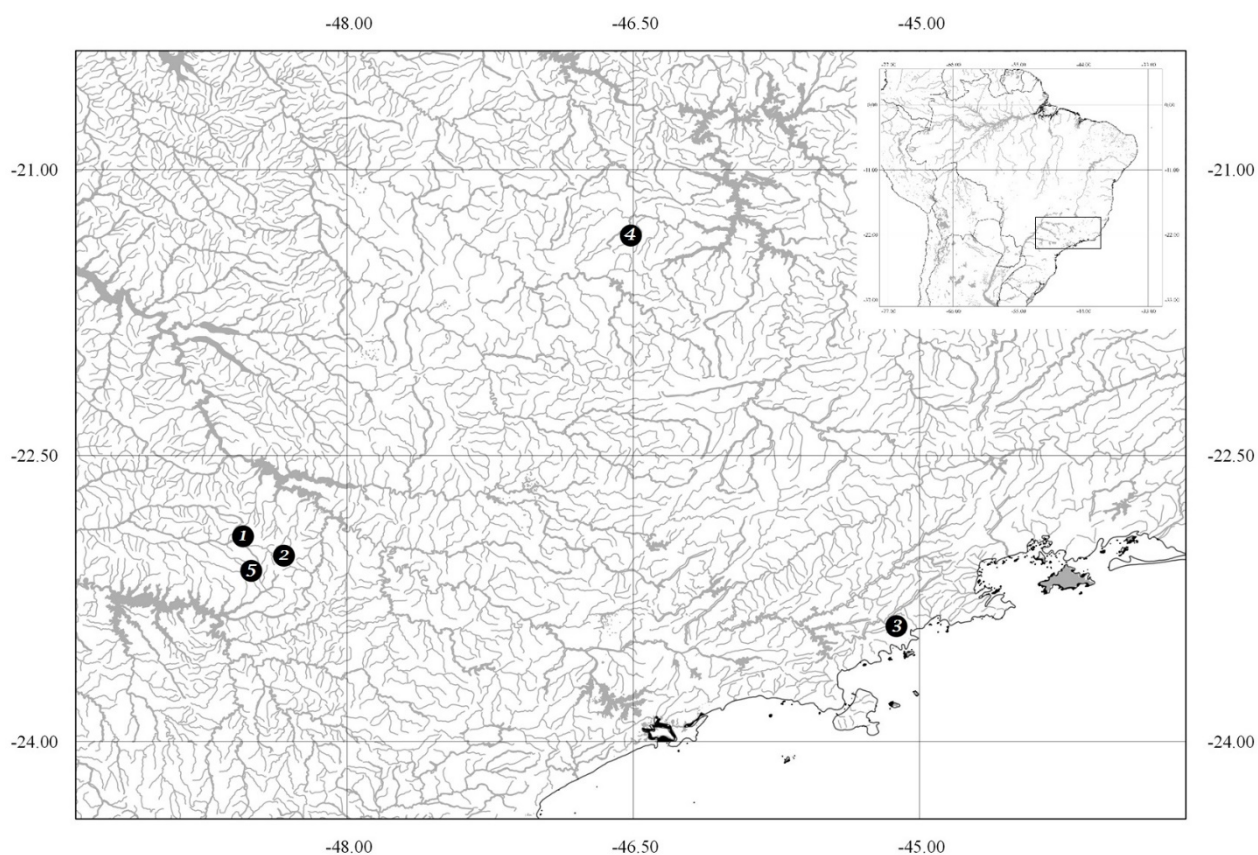


Figura 1. Mapa indicando os locais de coleta de espécies e populações de *Trichomycterus*. **1** Rio Roseira, bacia do Rio Tietê – Bofete, SP, *Trichomycterus iheringi*; **2** Rio Hortelã, bacia do Rio Paranapanema – Botucatu, SP, *T. diabolus*; **3** Rio Grande, bacia Costeira do Sudeste – Ubatuba, SP, *T. zonatus*; **4** Rio Muzambo, bacia do Rio Grande – Muzambinho, MG, *Trichomycterus* cf. *mimonha*; **5** Córrego da Quinta, bacia do Rio Tietê – Itatinga, SP, *Trichomycterus* sp.

3.2 Métodos

Nas análises citogenéticas convencionais foram utilizados os métodos de estimulação de mitoses (Cole e Leavens 1971), preparações diretas de células (Foresti *et al.* 1993), marcação das Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONs) segundo (Howell e Black 1980) e identificação da heterocromatina constitutiva (Sumner 1972).

Para a análise citogenética molecular foi utilizada a técnica de FISH na localização cromossômica das sequências de DNAr 5S e 18S, non-coding e DNA U2, sequências.

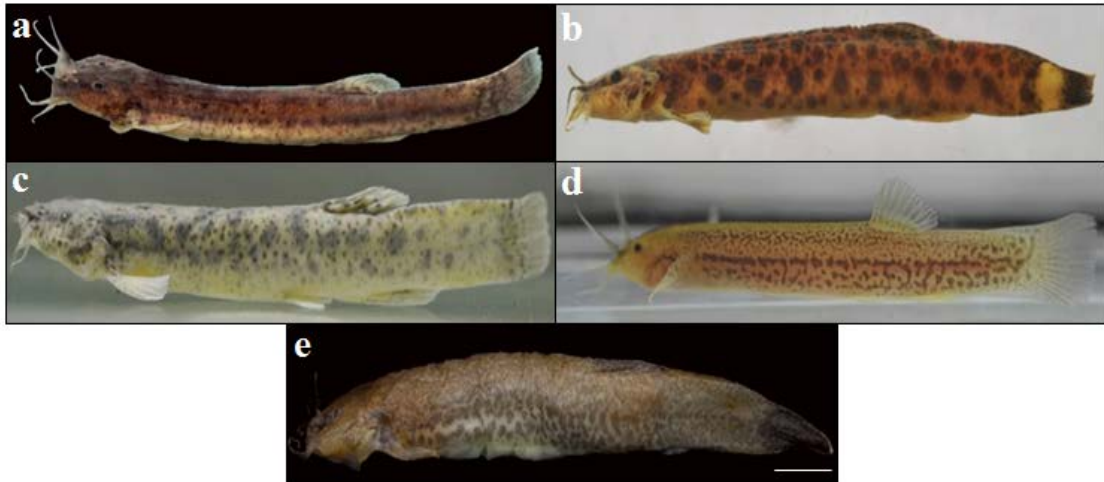


Figura 2: Fotos de exemplares das espécies analisadas. (a) *Trichomycterus iheringi*; (b) *T. diabolus*; (c) *T. zonatus*; (d) *Trichomycterus* cf. *mimonha*; (e) *Trichomycterus* sp. A barra equivale a 1cm.

3.2.1 Estimulação de Mitoses

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

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

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

3.2.2 Obtenção de Cromossomos Metafásicos

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

Materiais e Métodos

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

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

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

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

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

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

Materiais e Métodos

- Solução B (solução de nitrato de Prata): 1g de AgNO_3 dissolvida em 2 ml de água destilada.

Depois de preparadas, estas soluções devem ser mantidas em frascos escuros a 4°C.

O procedimento para a coloração das RONS é o seguinte:

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

3.2.4 Identificação da Heterocromatina Constitutiva

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

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

3.2.5 Extração do DNA genômico

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

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

3.2.6.1 Preparação das sondas de DNAr 18S e 5S

A sonda de DNAr 18S foi obtida por PCR (Polymerase Chain Reaction) a partir do DNA total de *Trichomycterus iheringi* usando os *primers* 18S F (5'CCG CTT TGG TGA CTC TTG AT 3') e 18S R (5'CCG AGG ACC TCA CTA AAC CA 3') (White *et al.* 1990). Esta sonda foi marcada com digoxigenina-11-dUTP (Roche Applied Science) por PCR e a detecção do sinal de hibridação foi realizada usando anti-digoxigenina-rodamina (Roche Applied Science). Os parâmetros para marcação foram: 31 µl de água Mili-Q, 5 µl de tampão da enzima Taq polimerase (10X), 5 µl de MgCl₂ (25mM), 1 µl de dATP, dCTP e dGTP e 0,7 µl de dTTP (2mM cada), 0,8 µl de digoxigenina-11-dUTP, 1µl de cada *primer* (10mM), 0,5 µl de Taq polimerase (5U/µL) e 2 µl de DNA molde. Total da reação: 50 µl.

O programa de PCR utilizado apresentou as seguintes condições:

	94°C ---- 2 min
35 ciclos	{ 95°C ---- 45 seg 54°C ---- 45 seg 72°C ---- 1 min e 30 seg
	72°C ---- 5 min
	12°C ---- manutenção

A sonda de DNAr 5S foi obtida por PCR (Polymerase Chain Reaction) a partir do DNA total de *Trichomycterus diabolus* usando os *primers* 5S F (5'TAC GCC CGA TCT CGT CCG ATC 3') e 5S R (5'CAG GCT GGT ATG GCC GTA ACG 3') (Pendás *et al.* 1994). Esta sonda foi marcada com biotina-16-dUTP (Roche Applied Science) por PCR, sendo a detecção do sinal de hibridação foi realizada usando Avidina-fluoresceína conjugada (FITC). Os parâmetros para marcação foram: 33 µl de água Mili-Q, 2 µl de tampão da enzima Taq polimerase (10X), 5 µl de MgCl₂ (25mM), 1 µl de dATP, dCTP e dGTP e 0,5 µl de dTTP (2mM cada), 2 µl de biotina-16-dUTP, 1 µl de cada *primer* (10mM), 0,5µl de Taq polimerase (5U/µL) e 2 µl de DNA molde. Total da reação: 50µl.

O programa de PCR utilizado apresentou as seguintes condições:

	94°C ---- 2 min	
35 ciclos	{	95°C ---- 45 seg
		54°C ---- 45 seg
		72°C ---- 1 min e 30 seg
	72°C ---- 5 min	
	12°C ---- manutenção	

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

3.2.6.2 Preparação da sonda de snDNA U2

A sonda utilizada para detecção de sequências snDNA U2 foi obtida por PCR (Polymerase Chain Reaction) a partir do DNA total de *Trichomycterus iheringi* usando os *primers* U2F (59-ATC GCT TCT CGG CCT TAT G-39) e U2R (59-TCC CGG CGG TAC TGC AAT A-39) (Bueno *et al.* 2013). Esta sonda foi marcada com digoxigenina-11-dUTP (Roche Applied Science) por PCR e a detecção do sinal de hibridação foi realizada usando anti-digoxigenina-rodamina (Roche Applied Science). Os parâmetros para marcação foram: 31 µl de água Mili-Q, 5 µl de tampão da enzima Taq polimerase (10X), 5 µl de MgCl₂ (25mM), 1 µl de dATP, dCTP e dGTP e 0,7 µl de dTTP (2mM cada), 0,8 µl de digoxigenina-11-dUTP, 1µl de cada *primer* (10mM), 0,5 µl de Taq polimerase (5U/µL) e 2 µl de DNA molde. Total da reação: 50 µl.

O programa de PCR utilizado apresentou as seguintes condições:

	94°C ---- 2 min	
35 ciclos	{	95°C ---- 45 seg
		55°C ---- 45 seg
		72°C ---- 1 min e 30 seg
	72°C ---- 5 min	
	12°C ---- manutenção	

3.2.7 Hibridação Fluorescente in situ (FISH)

O mapeamento das sondas de DNAr 5S, 18S e snDNA U2 em cromossomos metafásicos foi realizado por hibridação fluorescente *in situ* de acordo com o procedimento estabelecido por Pinkel *et al.* (1986), com modificações conforme descrito abaixo:

Etapa 1: Preparação das lâminas

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

Etapa 2: Detecção dos sinais correspondentes

Após a hibridação as lâminas foram lavadas 2 vezes em solução de formamida 15%/0,2xSSC a 42°C por 10 minutos cada. Em seguida, foram lavadas 3 vezes em solução de 0,1xSSC a 60°C por 5 minutos cada e uma vez em solução Tween 0,5%/4xSSC à temperatura ambiente por 5 minutos. Após as lavagens, as lâminas foram cobertas com 50 µL de solução de bloqueio (leite em pó, 20xSSC, e água) por 15 minutos e lavadas 2 vezes em Tween 0,5%/4xSSC a temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram incubadas com 30 µL de solução de bloqueio com anticorpo (24 µL de solução de bloqueio e 6 µL de antidigoxi-rodamina) por 1 hora em câmara úmida e escura a 37°C. Posteriormente, foram lavadas 3 vezes em Tween 0,5%/4xSSC por 5 minutos, desidratadas em série de etanol 70%, 85% e 100% a -20°C por 5 minutos em cada banho, secas e cobertas com 22 µL de Vectashield® Mounting Medium com DAPI (Vector). As lâminas foram analisadas em um fotomicroscópio óptico de fluorescência (Olympus BX61) e as imagens metafásicas foram capturadas usando o programa Image Pro Plus, 6.0 software (MediaCybernetics).

3.3 Estudos Cariotípicos

As preparações cromossômicas convencionais e com hibridação *in situ* foram analisadas em fotomicroscópio óptico (Olympus BX61), estabelecendo-se o número diplóide modal presente em cada espécie ou população amostrada no presente trabalho. As melhores metáfases foram capturadas com software Image Pro Plus, 6.0 (MediaCybernetics), sendo as imagens com fluorocromos capturadas separadamente utilizando filtros UV específicos, coloridas e sobrepostas no mesmo software Image Pro Plus, 6.0 (MediaCybernetics).

Os cromossomos foram recortados usando o software Adobe Photoshop versão 11.0 - Adobe System e organizados em pares de homólogos em classes e em ordem decrescente de tamanho para a montagem dos cariótipos, sendo classificados em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a), com base na proposição de Levan *et al.* (1964).

4 Resultados e Discussão

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

4.1 Capítulo 1

Caracterização citogenética de cinco espécies do gênero *Trichomycterus* (Siluriformes, Trichomycteridae).

4.2 Capítulo 2

Mapeamento físico de genes repetitivos e dinâmica da evolução cariotípica em espécies do gênero *Trichomycterus* (Siluriformes, Trichomycteridae).

Capítulo 1

Caracterização citogenética de cinco espécies do gênero *Trichomycterus* (Siluriformes, Trichomycteridae)

Resumo

O gênero *Trichomycterus* é o mais especioso dentro da subfamília Trichomycterinae e exibe uma grande diversidade com relação à sua estrutura cariotípica. No presente trabalho foram analisados exemplares de cinco espécies de peixes do gênero *Trichomycterus*, coletados em componentes de diferentes bacias hidrográficas brasileiras, com o uso de técnicas de citogenética clássica de coloração convencional com Giemsa, bandamento C e impregnação com nitrato de Prata e moleculares, com a realização de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com sondas de DNAr 5S e 18S. Os resultados revelaram que o número diplóide de $2n = 54$ cromossomos se manteve conservado nas espécies analisadas. Além disso, a espécie *Trichomycterus* sp. apresentou em suas células de 0 a 5 cromossomos supranumerários, identificando uma situação mitoticamente instável destes elementos. A hibridação com a sonda para DNAr 5S revelou marcações variadas enquanto o DNAr 18S se apresentou mais conservado, sendo que estas sequências se mantiveram co-localizadas em todas as espécies, exceto em *T. iheringi*, sugerindo ser esta sintenia uma condição provavelmente ancestral neste grupo. Ainda, o bandamento C evidenciou variações na distribuição da heterocromatina constitutiva entre as espécies. Os resultados mostraram que as variações cromossômicas não estão restritas apenas às diferenças nas fórmulas do cariótipo deste grupo de peixes, como era suposto, mas também devido intensas variações na microestrutura genômica das espécies.

Introdução

Os peixes do gênero *Trichomycterus* são popularmente conhecido como "cambevas" e pertencem à família Trichomycteridae, sendo que este grupo é composto por cerca de 160 espécies válidas (Froese e Pauly 2014) e está amplamente distribuído na região Neotropical (Sarmiento-Soares *et al.* 2011). Em geral, as espécies de *Trichomycterus* apresentam uma grande variedade de formas e constituem populações isoladas em nascentes, o que resulta num alto grau de endemismo (de Pinna e Wosiacki 2003; Wosiacki e Garavello 2002; Wosiacki e de Pinna 2007).

Estudos citogenéticos realizados em representantes deste gênero evidenciaram uma variação cariotípica considerável, tanto na macro quanto na microestrutura cariotípica, com o número diploide variando de $2n=50$ cromossomos em *Trichomycterus* sp. (Arratia e Campos

1997) a $2n=62$ cromossomos em *T. laucaensis* (Arratia e Veloso 1980). Sato *et al.* (2004) afirmaram que tais diferenças poderiam ser encontradas apenas para as espécies trans-andinas, enquanto as espécies cis-andinas teriam mantido um número diplóide conservado de 54 cromossomos, exceto *T. diabolus* do rio Tietê, que teve seu cariótipo descrito com $2n=56$ cromossomos (Torres *et al.* 2004). Além disso, as variações sobre a localização cromossômica de regiões organizadoras de nucléolo (RONS) e até mesmo a ocorrência de cromossomos supranumerários já foram relatadas nos componentes deste grupo (Borin e Martins-Santos 2000; Torres *et al.* 2002). No presente estudo foi realizada uma análise citogenética comparativa entre cinco espécies do gênero *Trichomycterus*, coletadas em componentes de diferentes bacias hidrográficas brasileiras utilizando métodos de citogenética clássica e molecular, com o objetivo de elaborar hipóteses para estabelecer os mecanismos envolvidos na diversificação cariotípica neste grupo de peixes, através da descrição e comparação dos aspectos cromossômicos entre as espécies.

Material e Métodos

Neste estudo foram utilizados exemplares de cinco espécies de *Trichomycterus* (*T. iheringi*, *T. diabolus*, *T. zonatus*, *Trichomycterus* cf. *mimonha* e *Trichomycterus* sp.) coletados em componentes de diferentes bacias hidrográficas brasileiras conforme relacionado na Tabela 1. Após os procedimentos da coleta de material para obtenção de preparações cromossômicas e identificação dos exemplares, estes foram depositados na coleção do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (LBP) do Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências da Unesp, Botucaru, SP. Os exemplares foram sacrificados com uma dose letal de benzocaína antes dos procedimentos de preparação cromossômica. Para a estimulação e obtenção dos cromossomos metafásicos foi utilizada a técnica descrita por Cole e Leavens (1971) para anfíbios e répteis e adaptado para os peixes por Oliveira *et al.* (1988).

A técnica utilizada para obtenção de cromossomos metafásicos seguiu a descrição de Foresti *et al.* (1993), com algumas adaptações. Essa metodologia envolve basicamente, a inibição da polimerização dos microtúbulos pela colchicina e a hipotonização das células em suspensão *in vitro*, seguindo-se a fixação celular pela mistura de metanol/ácido acético. A marcação das RONS pelo nitrato de Prata seguiu a técnica proposta por Howell e Black (1980) e o bandamento C foi realizado seguindo o protocolo descrito por Sumner (1972).

O mapeamento dos sítios de DNAr 18S e 5S nos cromossomos metafásicos foi realizado com a aplicação da técnica de FISH, de acordo com o procedimento estabelecido por Pinkel *et al.* (1986). A sonda de DNAr 18S foi obtida por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) a partir do DNA total de *Trichomycterus iheringi* e a sonda de DNAr 5S também foi obtida por PCR a partir de DNA total de *T. diabolus*. A sonda de DNAr 18S foi marcada com digoxigenina-11-dUTP (Roche Applied Science) e a detecção do sinal de hibridação foi realizada usando anti-digoxigenina-rodamina (Roche Applied Science). A sonda de DNAr 5S foi marcada com biotina-16-dUTP (Roche Applied Science) e a detecção do sinal de hibridação foi realizada usando avidina-fluoresceína conjugada (FITC).

Para montagem dos cariótipos, os cromossomos foram organizados em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm) e subtelocêntricos (st), dependendo da razão entre os braços (Levan *et al.* 1964) e arranjados em ordem decrescente de tamanho.

Resultados

A análise citogenética realizada nos exemplares das cinco espécies de *Trichomycterus* estudadas neste trabalho revelou igual número diploide de $2n=54$ cromossomos, com variações nas fórmulas cariotípicas (Tabela 1). Assim, *Trichomycterus diabolus*, *T. iheringi*, *T. zonatus* e *Trichomycterus* cf. *mimonha* apresentaram fórmula cariotípica de $34m + 12sm + 8st$ (Figuras 1a, c, e, g), enquanto *Trichomycterus* sp (população do Ribeirão da Quinta) apresentou a fórmula cariotípica de $36m + 10sm + 8st$ (Figura 1i). Além disso, *Trichomycterus* sp. mostrou uma variação intraespecífica quanto ao número de cromossomos, devido à presença de 0 a 5 cromossomos B mitoticamente instáveis em suas células (Figuras 1i e j).

Considerando a localização cromossômica das RONS e o tamanho dos dois primeiros pares cromossômicos de cada espécie, os resultados foram notavelmente variáveis. Desta forma, o primeiro par metacêntrico pode ser considerado o maior do cariótipo nas espécies *T. cf. mimonha*, *T. zonatus* e *T. iheringi* (Figuras 1g, e, a), enquanto em *T. diabolus* e *Trichomycterus* sp. o primeiro e o segundo par metacêntrico são semelhantes em tamanho e os maiores do cariótipo (Figuras 1c, i). As RONS foram localizadas no braço longo do primeiro par metacêntrico em *Trichomycterus* sp. (Figura 1i), no braço longo do segundo par metacêntrico em *T. diabolus* (Figuras 1c), no braço curto do primeiro par submetacêntrico em *T. cf. mimonha* e *T. zonatus* (Figuras 1g, e) e no braço longo deste mesmo par em *T. iheringi*, (Figuras 1a). Como regra geral, todas as espécies apresentaram blocos de heterocromatina associados às

regiões das RONS. Além destas marcações, o bandamento C evidenciou blocos heterocromáticos intersticiais adicionais, apresentando-se nos pares 2, 3, 7, 8, 19, 23 em *T. iheringi* (Figura 1b) e no par 18 em *T. diabolus* (Figura 1d). As demais espécies apresentaram blocos de heterocromatina de tamanhos variados na região pericentroméricos da maioria dos cromossomos do cariótipo (Figuras 1f, h, j).

A aplicação da técnica de FISH com sonda de DNAr 18S revelou marcação fluorescente concordante com os resultados obtidos pela marcação com nitrato de Prata, exceto em *Trichomycterus* sp. e *T. zonatus* que apresentaram marcação em um pequeno metacêntrico e na também na região centromérica do primeiro par, respectivamente (Figuras 2e, c em vermelho). Em contrapartida, o mapeamento físico do DNAr 5S apresentou resultados diversos, com a marcação de um par de cromossomos em *T. diabolus* e *T. iheringi* (Figuras 2b, a em verde); de dois pares em *T. zonatus* e *Trichomycterus* sp. (Figuras 2c, e em verde) e de três pares em *T. cf. mimonha* (Figura 1d em verde). Em todas as espécies as marcações para sequências de DNAr 5S e 18S foram sintênicas, exceto para *T. iheringi* (Figura 2a).

Discussão

Os estudos citogenéticos apresentados neste trabalho estão de acordo com dados obtidos anteriormente em relação aos números diplóides para distintas espécies cis-andinas do gênero *Trichomycterus* (Sato *et al.* 2004). No entanto, comparando os resultados aqui obtidos com os dados disponíveis na literatura, merecem ser destacadas as diferenças existentes nas fórmulas cariotípicas encontradas, principalmente em relação ao número de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos. Tal variabilidade parece indicar que rearranjos cromossômicos estruturais tiveram um papel importante na diversidade cariotípica destas espécies e que inversões pericêntricas podem ter sido o principal mecanismo responsável pela diferenciação cariotípica deste grupo de peixes, conforme já discutido por Borin e Martins-Santos (2000).

Os resultados encontrados nas espécies analisadas estão de acordo com a hipótese acima e também evidenciaram a ocorrência de outros tipos de alterações cromossômicas interespecíficas significativas, tais como variações na quantidade e distribuição da heterocromatina constitutiva; diferenças quanto à localização cromossômica dos sítios ribossomais maiores e menores; e ainda a ocorrência de cromossomos supranumerários mitoticamente instáveis em uma das espécies estudadas. Diante deste cenário, pode se afirmar que alterações genômicas adicionais nos distintos níveis de resolução cromossômica também desempenham papel destacado na diversificação cariotípica de *Trichomycterus*.

Com base nos padrões gerais do cariótipo e posição das RONS, Sato *et al.* (2004) sub classificou as espécies do gênero *Trichomycterus* em dois grupos principais, sendo o primeiro composto pela espécie que apresentam o primeiro par metacêntrico como o maior do cariótipo e com as RONS localizadas no braço curto do primeiro par submetacêntrico, enquanto o segundo grupo era composto por espécies que apresentaram os componentes do primeiro e do segundo par de metacêntricos como os maiores cromossomos do cariótipo, estando as RONS localizadas no braço longo do par 2. De fato, algumas das espécies analisadas aqui se encaixam nesta classificação. No entanto, espécies como *T. iheringi* e *Trichomycterus* sp. não se enquadram perfeitamente em qualquer dos grupos pois, embora apresentem o tamanho dos cromossomos metacêntricos e as RONS localizadas de acordo com o primeiro e segundo grupo, respectivamente, a posição evidenciada pela impregnação com nitrato de Prata não os classifica em grupo algum. Desta forma, nossos dados indicam que os cariótipos de *Trichomycterus* não podem ser simplesmente divididos em dois grupos individuais, principalmente pela posição variável das RONS nas diferentes espécies deste grupo. Considerando que os cromossomos portadores de sítios DNAr 18S apresentaram tamanhos semelhantes em quase todas as espécies, sugerimos que a ocorrência de inversões pericêntricas neste cromossomo possa ter resultado na situação atualmente observada.

O bandamento C revelou que o acúmulo da heterocromatina constitutiva é notavelmente distinto entre as espécies de *Trichomycterus*. Assim, algumas espécies apresentam blocos heterocromáticos consideravelmente pequenos e fracos, como observado em *T. diabolus*, enquanto outras apresentam blocos centroméricos e pericentroméricos conspícuos, como em *T. iheringi*. Tal variação poderia ser explicada pelo papel desempenhado por elementos transponíveis ou por recombinação ectópica na propagação da heterocromatina (Gray 2000; Vicari *et al.* 2010). Além disso, é importante ressaltar que as regiões heterocromáticas próximas ao centrômero podem facilitar quebras cromossômicas, e por consequência, levar à ocorrência de inversões pericêntricas nos cromossomos que carregam as RONS.

O mapeamento físico dos sítios de DNAr 18S revelou apenas um par cromossômico contendo essas regiões nas espécies analisadas, com exceção de *Trichomycterus* sp. e *T. zonatus* que apresentaram dois pares cromossômicos portadores desta sequência. Além disso, a co-localização encontrada entre os sítios ribossômicos de 5S e 18S em todas as espécies, exceto em *T. iheringi*, independentemente da razão entre os braços destes cromossomos reforça a hipótese da ocorrência de inversão pericêntrica envolvendo a região das RONS. Curiosamente, esta condição de sintenia entre os genes ribossômicos também foi detectada para outras espécies de

peixes estreitamente relacionados à *Trichomycterus* (Ziemniczak *et al.* 2012). Embora aparente representar uma condição generalizada, conservada e plesiomórfica no gênero em estudo, a co-localização entre o 5S e o 18S parecem ter surgido de forma independente várias vezes durante a história evolutiva de organismos diferentes e, provavelmente não tem qualquer efeito significativo de valor adaptativo para as espécies (Drouin e Moniz de Sá 1995; Vierna *et al.* 2011).

Sequências de DNAs ribossômicos têm sido extensivamente mapeados em várias espécies de teleósteos e os resultados revelam um elevado grau de variação entre diferentes espécies e grupos em relação à sua localização cromossômica (revisão em Gornung, 2013; Rebordinos *et al.* 2013). Tal diversificação pode ser associada a vários mecanismos de dispersão no genoma, incluindo recombinação ectópica e eventos de transposição com a participação de elementos de DNA circular e transponíveis extra cromossômicos (Raskina *et al.* 2008; Nguyen *et al.* 2010; Panzera *et al.* 2012; Rebordinos *et al.*, 2013). Considerando que os cromossomos portadores dos sítios de DNAr 18S de *Trichomycterus* possivelmente são homólogos em todas as espécies, podemos concluir que os *clusters* de DNAr 5S são altamente dinâmicos neste grupo. Notavelmente, uma vez que a co-localização entre os sítios de DNAr 18S e 5S parece ser uma condição plesiomórfica em *Trichomycterus*, os eventos de dispersão do DNAr 5S ocorreram de forma diferente em relação ao do DNAr 18S. Por exemplo, o DNAr 5S poderia ter sido transposto para outro local genômico, independentemente do DNAr 18S, com a manutenção da co-localização, como ocorre em *T. cf. mimonha* e *T. zonatus*; ou o DNAr 5S poderia ter sido transposto para outro local genômico, independentemente do DNAr 18S e perturbando a condição sintênica, como em *T. iheringi*.

Vários estudos têm evidenciado a importância dos elementos transponíveis como mediadores de extensa multiplicação e disseminação de sítios de DNA ribossômico pelo genoma das espécies (da Silva *et al.* 2011; Nakajima *et al.* 2012; Pansonato-Alves *et al.* 2013; Symonová *et al.* 2013). Em geral, esses elementos podem estar associados aos espaçadores intergênicos das famílias ribossômicas (da Silva *et al.* 2011), ou mesmo flanqueando estas regiões (Nakajima *et al.* 2012). Assim, devido à variação considerável da localização cromossômica dos sítios de DNAr 5S em *Trichomycterus*, sugerimos que este gene ribossomal poderia estar associado a elementos transponíveis, os quais teriam favorecido a dispersão destas sequências nas diferentes espécies.

Os polimorfismos numéricos encontrados em *Trichomycterus* sp. devem-se a presença de cromossomos supranumerários em seu genoma. Em geral, esse tipo de cromossomo é considerado dispensável no genoma e não frequentemente não está associado a qualquer função

ou a vantagem seletiva para as espécies portadoras (Camacho *et al.* 2000). Tais cromossomos podem ter sua origem a partir de outras espécies (origem interespecífica) ou provir de elementos do genoma da própria espécie hospedeira (origem intraespecífica). Neste último caso, os cromossomos B podem ter se originado como subproduto de rearranjos genômicos, tais como quebras cromossômicas (Houben *et al.* 2013) e de isocromossomos Silva *et al.* (2014). Esta hipótese reforça a intensa dinâmica genômica das espécies de *Trichomycterus* e como consequência, algumas espécies puderam manter os cromossomos B como remanescentes de rearranjos cromossômicos que ocorreram durante a história evolutiva deste grupo. Além disso, a natureza heterocromática destes elementos está em conformidade com a evolução molecular dos cromossomos B que envolve o silenciamento de genes, heterocromatinização e acumulação de sequências de DNA repetitivo (Camacho *et al.* 2000).

Os resultados apresentados corroboram a hipótese de que alterações cromossômicas como inversão pericêntrica atuam como um importante mecanismo de diversificação para o gênero *Trichomycterus*. Além disso, as variações detectadas para a heterocromatina constitutiva, a distribuição de sequências repetitivas e a ocorrência de cromossomos B também parecem desempenhar um papel importante na diversificação cariotípica deste grupo.

Referências

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

Tabela 1: Exemplos de peixes do gênero *Trichomycterus* analisadas. Local de coleta. 2n: número diploide. Fórmula cariotípica.

Espécies	Localidade	2n	Fórmulas
<i>T. iheringi</i>	Rio Roseira – Tietê – Bofete, SP	54	34m + 12sm + 8st
<i>T. diabolus</i>	Rio Hortelã - Paranapanema – Botucatu, SP	54	34m + 12sm + 8st
<i>T. zonatus</i>	Rio Grande - Costeira do Sudeste – Ubatuba, SP	54	34m + 12sm + 8st
<i>T. cf. mimonha</i>	Rio Muzambo - Grande – Muzambinho, MG	54	34m + 12sm + 8st
<i>Trichomycterus sp</i>	Córrego da Quinta – Tietê – Itatinga, SP	54-57	36m+10sm+8st

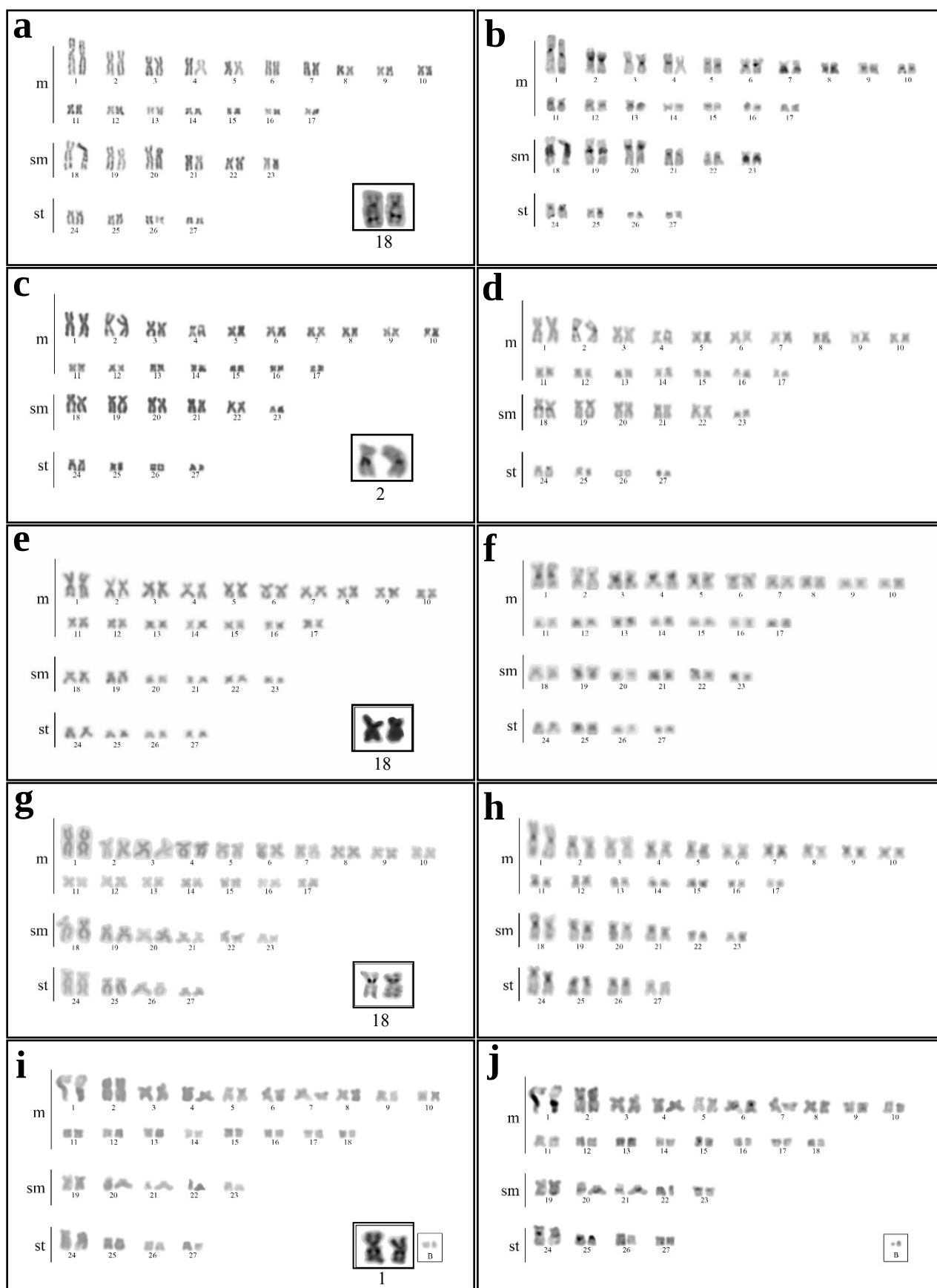


Figura 1: Cariótipos das espécies de *Trichomycterus* analisadas após coloração convencional com Giemsa, impregnação por nitrato de Prata e bandamento C, respectivamente. Em *T. iheringi* (a, b), em *T. diabolus* (c, d), em *T. zonatus* (e, f), em *Trichomycterus cf. mimonha* (g, h) e em *Trichomycterus sp.* (i, j). Em destaque cromossomos Bs de *Trichomycterus sp.* (i, j).

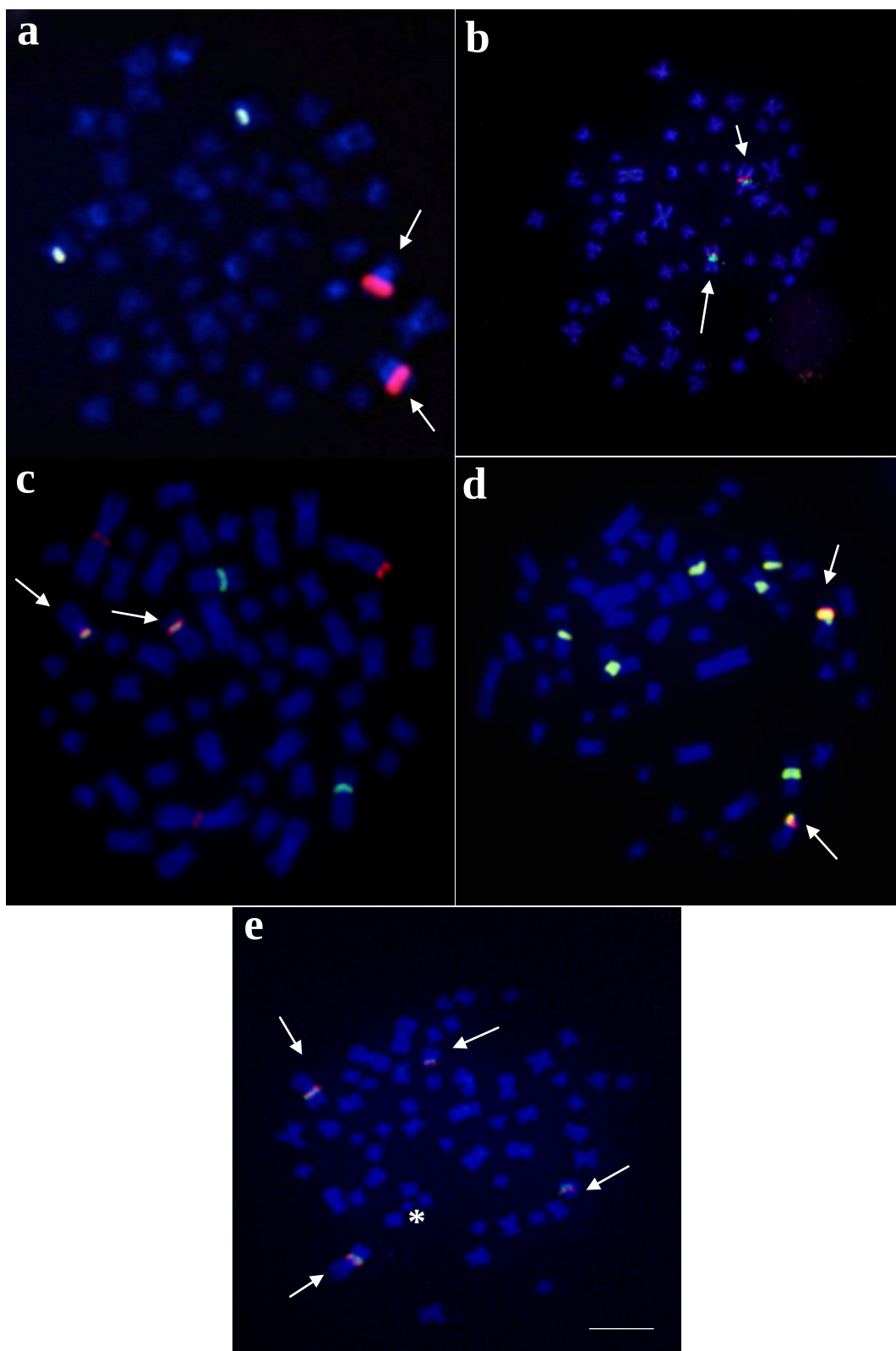


Figura 2: Padrão de distribuição dos genes DNAr 5S (verde) e 18S (vermelho) em metáfases dos representantes das cinco espécies de *Trichomycterus* analisadas. Em a *T. iheringi*, em b *T. diabolus*, em c *T. zonatus*, em d *Trichomycterus* cf. *mimonha*, e em e *Trichomycterus* sp. As setas brancas indicam o par portador da sintenia. O asterisco branco destaca o cromossomo B da espécie *Trichomycterus* sp.

Capítulo 2

Mapeamento físico dos genes DNAr 18S e snDNA U2 em três espécies do gênero *Trichomycterus* (Siluriformes, Trichomycteridae).

Resumo

Embora o gênero *Trichomycterus* seja considerado o mais especioso dentro de *Trichomycterinae*, com mais de 160 espécies descritas, grande diversidade de formas e ampla distribuição pela região Neotropical, os estudos citogenéticos moleculares neste grupo de peixes ainda são escassos, o que deixa algumas lacunas para a construção de uma história evolutiva sobre sua diferenciação cariotípica. Com base em tais constatações, o presente trabalho teve como principal objetivo realizar o mapeamento citogenético comparativo de sequências repetitivas em três espécies de *Trichomycterus*: *T. diabolus*, *Trichomycterus* cf. *mimonha* e *Trichomycterus* sp. através a técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) dos genes de DNAr 5S, 18S e snDNA U2. Os resultados mostraram que os sítios de snDNA U2 estão distribuídos de forma conservada nas espécies analisadas e que está co-localizado com o DNA ribossomal 18S em apenas um par cromossômico de cada espécie, sendo este mesmo par também portador do DNAr 5S. Tais constatações podem revelar um estado de conservação acentuado para este par de cromossomos, que teria mantido estes três sítios juntos num processo de evolução em concerto durante a evolução cariotípica do gênero *Trichomycterus*.

Introdução

O genoma dos eucariotos é composto em sua maioria por sequências de DNA repetitivo que podem estar organizados de forma dispersa pelo genoma, como os elementos transponíveis ou na forma de repetições *in tandem*, como é o caso dos microssatélites, minissatélites e famílias multigênicas (Charlesworth *et al.* 1994; Maxon *et al.* 1983). Todas estas sequências são caracterizadas por apresentarem alta variabilidade em sua composição nucleotídica, tanto no número de cópias, bem como com relação à sua função, distribuição e organização genômica (Wagner *et al.* 1993; Charlesworth *et al.* 1994; López-Flores e Garrido-Ramos 2012).

Por sua natureza repetitiva, este tipo de sequência pode ser facilmente localizado nos cromossomos através da técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH). Estudos relativos à organização e mapeamento físico de sequências de DNA repetitivo têm permitido uma melhor caracterização dos processos envolvidos na diversificação cariotípica da ictiofauna Neotropical (Vicari *et al.* 2010). Além disso, estes dados também permitem uma melhor compreensão sobre a dinâmica evolutiva de cada classe de DNA repetitivo no genoma de

diferentes espécies, bem como sobre a possível função deste tipo de sequências e as consequências de sua localização (Haaf *et al.* 1993; Vicari *et al.* 2008).

Os peixes do gênero *Trichomycterus* estão amplamente distribuídos pela região Neotropical e apresentam cerca de 160 espécies descritas (de Pinna e Wosiacki 2003; Wosiacki e de Pinna 2007). Estudos citogenéticos realizados nos componentes deste grupo revelaram que, a despeito da conservação dos números diplóides em diferentes espécies cis-ândinas, uma notável diversificação cariotípica ocorreu durante a história evolutiva deste grupo, principalmente devido à extensa ocorrência de inversões pericêntricas e de eventos que determinaram o surgimento de cromossomos supranumerários e de casos de triploidia natural (Borin e Martins-Santos, 2000; Borin *et al.* 2002; Torres *et al.* 2002; Sato *et al.* 2004; Capítulo 1). Embora os cariótipos de diferentes espécies sejam altamente diferenciados, a ocorrência de sítios co-localizados de DNAr 5S e 18S aparenta ser uma característica comum a várias espécies deste grupo e, possivelmente, seja um caracter ancestral (Capítulo 1) e decorrente de processos de evolução em concerto.

Embora os estudos envolvendo o mapeamento citogenético de sítios de DNA repetitivo em cromossomos de peixes Neotropicais tenham se expandido consideravelmente nos últimos anos, a maioria deles refere-se à localização cromossômica de sítios ribossômicos, enquanto o conhecimento da distribuição de outras sequências, como os sítios snDNA está restrito apenas a poucas espécies. No entanto, estes estudos têm revelado situações interessantes como a presença de *clusters* alocados em cromossomos sexuais e cromossomos supranumerários, além da identificação destes sítios co-localizados nos cromossomos com outras sequências e famílias de DNA repetitivo (Merlo *et al.* 2010, 2012; Úbeda-Manzanaro *et al.* 2010; Supiwong *et al.* 2013; Utsunomia *et al.* 2014).

No presente estudo foi investigada a localização cromossômica de sítios de DNAr 5S, 18S e snDNA U2 em três espécies do gênero *Trichomycterus* coletadas em componentes de diferentes bacias hidrográficas brasileiras, com o objetivo de mapear fisicamente estas sequências de genes ribossomais e do snRNA U2, comparando a distribuição destes sítios na tentativa de melhor compreender a distribuição e organização destes tipos de DNA repetitivo e sua relação com os processos envolvidos na diferenciação cromossômica neste grupo de peixes.

Materiais e Métodos

No presente trabalho foram analisadas três espécies de peixes do gênero *Trichomycterus*, incluindo *T. diabolus*, *T. cf. mimonha* e *Trichomycterus* sp. provenientes de componentes de diferentes bacias hidrográficas brasileiras, conforme relacionado na Tabela 1. Após os procedimentos da coleta de material para obtenção de preparações cromossômicas e identificação dos exemplares, estes foram depositados na coleção do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (LBP) do Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências da Unesp, Botucaru, SP. Os exemplares foram sacrificados com uma dose letal de benzocaína antes dos procedimentos de preparação cromossômica. Para a estimulação e obtenção dos cromossomos metafásicos foi utilizada a técnica descrita por Cole e Leavens (1971) para anfíbios e répteis e adaptado para os peixes por Oliveira *et al.* (1988).

A técnica utilizada para obtenção de cromossomos metafásicos seguiu protocolo utilizado por Foresti *et al.* (1993), com algumas adaptações. Essa metodologia envolve basicamente, a inibição da polimerização dos microtúbulos pela colchicina e a hipotonização das células em suspensão *in vitro*, seguindo-se a fixação celular pela mistura de metanol/ácido acético.

O mapeamento físicos dos sítios de DNAr 5S, 18S e snDNA U2 nos cromossomos metafásicos foi realizado com a aplicação da técnica de FISH, de acordo com o procedimento estabelecido por Pinkel *et al.* (1986), com algumas adaptações. As sondas de DNAr 18S e o gene U2 foram obtidas por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) a partir do DNA total de *Trichomycterus iheringi*, enquanto a sonda de DNAr 5S foi obtida por PCR a partir de DNA total de *T. diabolus*. A sonda de DNAr 18S foi marcada com digoxigenina-11-dUTP (Roche Applied Science) e a detecção do sinal de hibridação foi realizada usando anti-digoxigenina-rodamina (Roche Applied Science). As sondas de DNAr 5S e snDNAr U2 foram marcadas com biotina-16-dUTP (Roche Applied Science) e a detecção do sinal de hibridação foi realizada usando avidina-fluoresceína conjugada (FITC).

Resultados

As três espécies de *Trichomycterus* analisadas no presente trabalho apresentaram número diploide conservado de 54 cromossomos com pequenas variações quanto à morfologia cromossômica (Tabela 1). Além disso, os exemplares de *Trichomycterus* sp. apresentaram uma variação intrapopulacional devido a presença de até 5 cromossomos supranumerários (Figura 1i, j; Capítulo 1).

O mapeamento físico realizado com sondas de DNAr 5S, 18S e snDNA U2 geraram sinais visíveis nos cromossomos mitóticos de todas as espécies, evidenciando grandes *clusters* para estas sequências. Além disso, o mapeamento revelou a colocação dos sítios 18S (em vermelho) e snDNA U2 (verde) em um grande par cromossômico nas três espécies, sendo o segundo par metacêntrico em *T. diabolus*, o primeiro par submetacêntrico em *Trichomycterus cf. mimonha* e o primeiro par metacêntrico em *Trichomycterus* sp (Figuras 1a, c, e, respectivamente).

Notavelmente, além da co-localização citada, sítios de DNAr 5S também estão alocados nestes mesmos pares cromossômicos nas três espécies analisadas (Figura 1b, d, f verde).

Discussão

O mapeamento físico dos genes para snRNA U2 evidenciou sinais de hibridação em apenas 1 par cromossômico em todas as espécies analisadas, corroborando estudos anteriores que evidenciaram um número reduzido de sítios para genes U em diferentes espécies de peixes analisadas (Utsunomia *et al.* 2014; Úbeda-Manzanaro *et al.* 2010). Além disso, foi possível observar que os sítios de DNAr 18S e snDNA U2 estão co-localizados em 1 único par cromossômico. Deve-se destacar que este mesmo par também carrega sítios de DNAr 5S (Capítulo 1), indicando que, provavelmente, estes cromossomos são homólogos nas três espécies. Desta forma, inversões cromossômicas do tipo pericêntricas parecem ter sido responsáveis pelas mudanças na posição destes genes no cariótipo das três espécies analisadas, o que reforça a hipótese de que este tipo de alteração cromossômica se apresenta como o principal mecanismo de diversificação nos cariótipos de *Trichomycterus* (Sato *et al.* 2004; Capítulo 1).

A ocorrência de *clusters* de DNAr 5S e 18S no mesmo par cromossômico não é uma característica comum dos eucariontes, uma vez que os genomas da maioria dos organismos geralmente apresenta sítios de DNAr 5S em cromossomos distintos do DNAr 18S (Madrioli *et al.* 2000; Sola *et al.* 2000; Martins e Galetti Jr. 2001). Martins e Galetti Jr. (2001) sugerem que estes genes requerem *loci* distantes, pois apresentam uma dinâmica funcional e mecanismos evolutivos distintos. No entanto, no gênero *Trichomycterus*, apenas a espécie *T. iheringi* foi reportada como portadora destas marcações em cromossomos separados, o que sugere uma condição derivada nesta espécie (Capítulo 1), com opção de uma evolução conjunta desses segmentos genômicos.

Exemplos de sequências repetitivas co-localizadas vêm sendo descritas em diferentes espécies de peixes nos últimos anos e, em alguns casos, é possível sugerir uma relação de causa/efeito entre estes sítios. Na espécie *Astyanax janeiroensis*, sítios do DNA satélite As51 parecem silenciar os genes ribossômicos 18S quando estão co-localizados (Vicari *et al.* 2008); por outro lado, a co-localização de elementos transponíveis do tipo *Rex3* com o DNAr 18S em *Astyanax bockmanni* levou os autores a proporem uma possível dispersão mediada por elementos transponíveis no genoma desta espécie (Silva *et al.* 2013). Por fim, Hashimoto *et al.* (2011) sugerem que a co-localização dos sítios para histona H1 e DNAr 18S em diferentes espécies de bagres poderia conferir alguma vantagem seletiva, o que estaria relacionado com a tendência de clusterização de genes *housekeeping* (genes com altas taxas de expressão necessários para funções celulares básicas) comumente observada em humanos (Lercher *et al.* 2002).

Os resultados obtidos referentes à co-localização cromossômica de três sítios de DNA repetitivos distintos (snDNA U2, DNAr 5S e 18S) em diferentes espécies de *Trichomycterus* corroboram com a hipótese de clusterização de genes *housekeeping*. Uma vez que esta associação se manteve conservada durante a história evolutiva deste grupo, pode ser sugerida uma possível vantagem seletiva para a manutenção desta conformação genômica. No entanto, destaca-se que a transcrição destas 3 famílias repetitivas é realizada por diferentes tipos de RNA polimerase (snDNA U2 – RNA polimerase I; DNAr 18S – RNA polimerase II e DNAr 5S – RNA polimerase III), o que aparentemente poderia não representar uma vantagem do ponto de vista transcricional. Nesse sentido, o mapeamento citogenético do snDNA U2 em espécies de *Trichomycterus* que não apresentam os genes ribossômicos co-localizados poderia fornecer dados mais significativos em relação à dinâmica evolutiva e funcional destes sítios nos genomas destas espécies.

Os resultados apresentados neste trabalho reforçam a ideia de que em *Trichomycterus* inversões pericêntricas tenham levado à modificações estruturais dos cromossomos portadores das RONS (Capítulo 1) e que uma dinâmica cariotípica variável fez destes homólogos importantes marcadores cromossômicos neste grupo, pois além do DNAr 18S, apresentam ainda sítios de DNAr 5S e snDNA U2.

Referências

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

Tabela 1: Exemplos de peixes do gênero *Trichomycterus* analisadas. Local de coleta. 2n: número diploide. Fórmula cariotípica.

Espécies	Localidade	2n	Fórmulas
<i>T. diabolus</i>	Rio Hortelã - Paranapanema – Botucatu, SP	54	34m + 12sm + 8st
<i>T. cf. mimonha</i>	Rio Muzambo - Grande – Muzambinho, MG	54	34m + 12sm + 8st
<i>Trichomycterus sp</i>	Córrego da Quinta – Tietê – Itatinga, SP	54-57	36m+10sm+8st

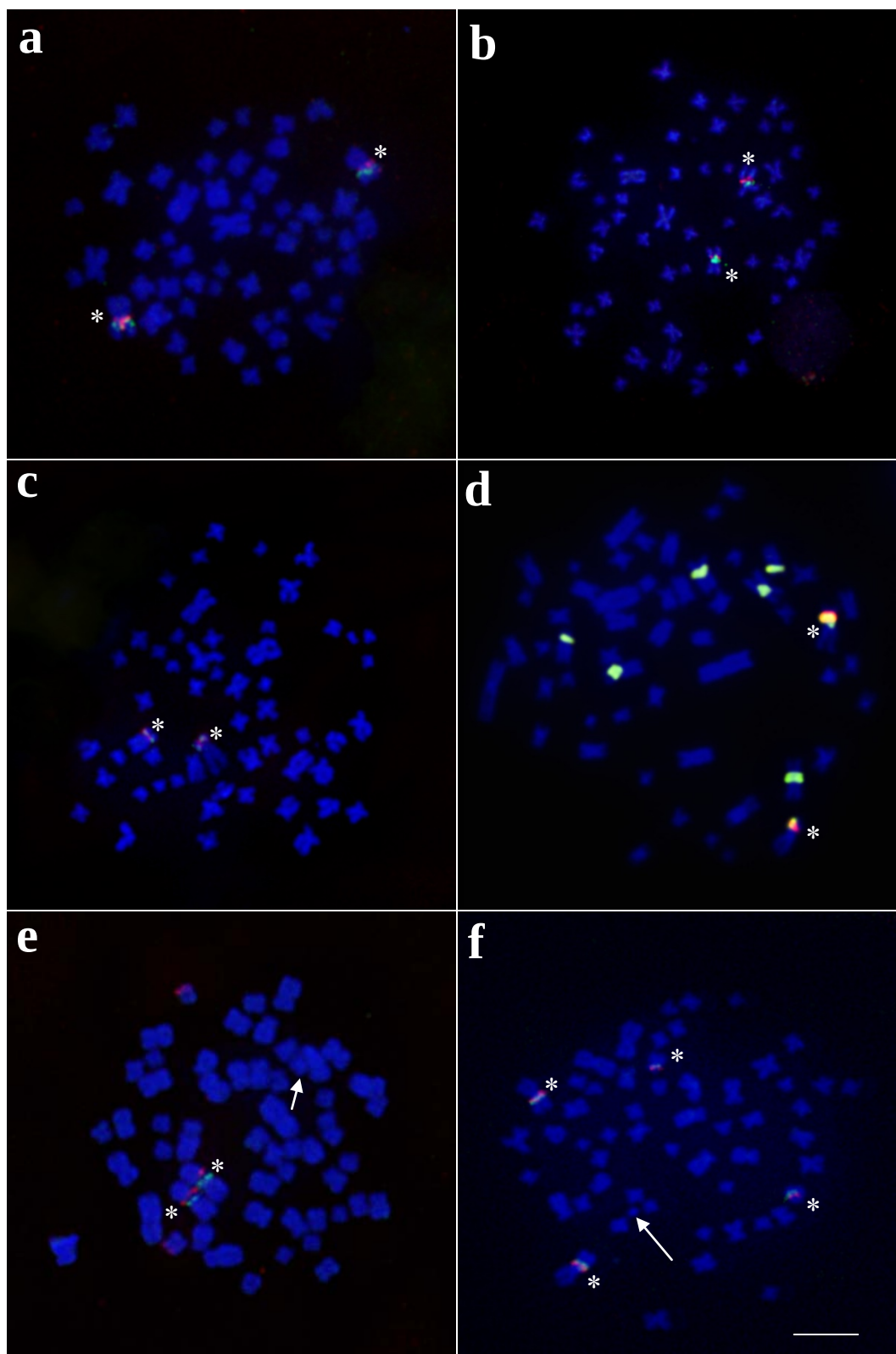


Figura 1: Padrão de distribuição de genes ribossomais e snDNA U2 nas três espécies de *Trichomycterus*. Os asteriscos brancos destacam o par portador do DNAr 18S (vermelho) e snDNA U2 (verde) sintênicos em *T. diabolus* (a), *Trichomycterus* cf. *mimonha* (c) e *Trichomycterus* sp (e). Em b, d, e estão representadas as marcações de DNAr 5S e 18S em *T. diabolus*, *Trichomycterus* cf. *mimonha* e *Trichomycterus* sp. respectivamente. As setas brancas indicam os supranumerários encontrados em *Trichomycterus* sp. (e, f). A barra equivale a 10µm.

5 Considerações Finais

Os estudos citogenéticos desenvolvidos em cinco espécies do gênero *Trichomycterus* trouxeram informações significativas relacionadas à evolução cariotípica neste grupo. Os resultados apresentados corroboram a ideia de uma macroestrutura cariotípica conservada entre os representantes cis-Andinos, que geralmente apresentam número diplóide de $2n=54$ cromossomos. No entanto, variações na quantidade e distribuição da heterocromatina constitutiva, diferenças quanto à localização cromossômica dos sítios ribossomais maiores e menores e ainda a ocorrência de cromossomos supranumerários mitoticamente instáveis como em *Trichomycterus* sp. parecem desempenhar um importante papel na diversificação cariotípica destes peixes.

De acordo com o observado nas cinco espécies deste estudo, o gênero *Trichomycterus* não deve ser restrito à uma subdivisão baseada na localização das RONS, nem tão pouco pelo tamanho do primeiro e/ou segundo pares de cromossomo metacêntricos. Tais afirmações se devem ao fato de que inversões pericêntricas, assim como alterações cromossômicas estruturais parecem contribuir de forma determinante para a dinâmica evolutiva do cariótipo destas espécies.

O mapeamento cromossômico de sequências de DNA ribossomal 5S e 18S mostrou que estas sequências estão co-localizadas em quatro das cinco espécies analisadas, uma característica pouco observada no genoma dos eucariotos. Porém, para o gênero *Trichomycterus*, esta sintenia parece ser uma condição derivada, uma vez que apenas *T. iheringi* não apresentou este atributo. Ainda, os resultados obtidos com a aplicação da técnica de *double FISH* utilizando sondas de snDNA U2 e DNAr 18S mostraram que este tipo de sintenia também ocorre entre estes dois genes e, quando comparados com os resultados do mapeamento com o DNAr 5S foi constatado que estes três tipos de DNA repetitivo estão localizados no mesmo par cromossômico em três espécies, corroborando com a hipótese de clusterização de genes *housekeeping*.

A observação desta associação conservada entre sítios de DNA repetitivo sugere uma possível vantagem seletiva para a manutenção desta conformação genômica durante o processo evolutivo deste grupo de peixes. Entretanto, vale ressaltar que estas três famílias multigênicas são transcritas por diferentes tipos de RNA polimerases (snDNA U2 – RNA polimerase I, DNAr 18S – RNA polimerase II e DNAr 5S – RNA polimerase III), o que aparentemente não representaria uma vantagem do ponto de vista transcricional.

Com base nos resultados apresentados, os pares cromossômicos portadores das RONS podem ser utilizados como importantes marcadores cromossômicos dentro do gênero *Trichomycterus*, uma vez que apresentam uma dinâmica cariotípica variável, ao mesmo tempo, a presença de sítios de DNAr 5S, 45S e snDNA U2.

6 Referências Bibliográficas

- Almeida-Toledo LF, Foresti F, Toledo-Filho SA. 2000a. Karyotypic evolution in Neotropical freshwater fish. *Chromosome Today*, 13: 169-182.
- Arai K. 2011. *Fish Karyotypes-Check List*. Springer, 1-347.
- Arratia G, Veloso A. 1980. Cariótipos de pezes *Tricomictéridos* (Siluriformes). *Archivos De Biología Y Medicina Experimentales*, 13:137.
- Arratia G, Campos H. 1997. Karyotype of diplomystid and certain loricarioid catfishes. *International Symposium on Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, pp 53-54.
- Artóni RF, Vicari MR, Endler AL, Cavallaro ZI, Jesus CM, Almeida MC, Moreira-Filho O, Bertollo LAC. 2006. Banding pattern of A and B chromosomes of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae), with comments on B chromosomes evolution. *Genetica*, 127: 277-284.
- Bertollo LAC, Takahashi CS, Moreira-Filho O. 1978. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Revista Brasileira de Genética*, 1: 103-120.
- Borin LA, Martins-Santos IC. 1999. Karyotype characterization of three species of the genus *Trichomycterus* (Teleostei, Siluriformes) from the Iguaçu River basin. *Genetica*, 106:215-221.
- Borin LA, Martins-Santos IC. 2000. Intra-individual numerical chromosomal polymorphism in *Trichomycterus davisi* (Siluriformes, Trichomycteridae) from the Iguaçu River basin in Brazil. *Genet Mol Biol*, 23:605-607.
- Borin LA, Martins-Santos IC, Oliveira C. 2002. A natural triploid in *Trichomycterus davisi* (Siluriformes, Trichomycteridae): mitotic and meiotic characterization by chromosome banding and synaptonemal complex analyses. *Genetica*, 115: 253–258.
- Bueno D, Palacios-Gimenez OC, Cabral-de Mello DC. 2013. Chromosomal mapping of repetitive DNAs in the grasshopper *Abracris flavolineata* reveal possible ancestry of the B chromosome and H3 histone spreading. *Plos one*, 8(6) e66532.
- Camacho JPM, Sharbel TF, Beukeboom LW. 2000. B chromosome evolution. *Phil Trans R Soc B Biol Sci*, 355: 163-178.
- Camacho JPM. B chromosomes. 2005. In: Gregory TR editor. *The evolution of the genome*. Elsevier, San Diego, p 223-286.
- Chalesworth B, Snlegowski P, Stephan W. 1994. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature*, 371: 215-220.

- Cole CJ, Levans CR. 1971. Chromosome preparations of amphibians and reptiles: improved technique. *Herpetol. Rev.*, 3: p 102.
- Drouin G, Moniz de Sá M. 1995. The concerted evolution of 5S ribosomal genes linked to the repeats of other multigene families. *Molecular Biology Evolution*, 12: 481-493.
- Ferraris CJ. 2007. Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. *Zootaxa* 1418: 1-628.
- Ferreira DC, Oliveira C, Foresti F. 2010. Elements *Rex1* and *Rex3* in three Fish species in the subfamily Hypoptopomatinae (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). *Cytogenetic and Genome Research*.
- Foresti F, Almeida-Toledo LF, Toledo-Filho SA. 1981. Polymorphic nature of nucleolus organizer regions on fishes. *Cytogenetic and Cell Genetics*, 31: 137-144.
- Foresti F, Oliveira C, Almeida-Toledo LF. 1993. A method for chromosome preparations from large specimens of fishes using in vitro short treatment with colchicine. *Experientia*, 49: 810-813.
- Froese R. and D. Pauly. Editors. 2014. FishBase. World Wide Web electronic publication: www.fishbase.org, December 02, 2014.
- Gornung E. 2013. Twenty years of physical mapping of major ribosomal RNA genes across the Teleosts: a review of research. *Cytogenetic and Genome Research* 141: 90–102.
- Gray YHM. 2000. It takes two transposons to tango. *Transposable-element-mediated chromosomal rearrangements. Trends in Genet* 16 (10): 461-468.
- Haff T, Schmid M, Steinlein C, Galetti PM, Willard H. 1993. Organization and molecular cytogenetics of a satellite DNA family from *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae). *Chromosome Research*, 1: 77-86.
- Hashimoto DT, Ferguson-Smith MA, Rens W, Foresti F, Porto-Foresti F. 2011. Chromosome Mapping of H1 Histone and 5S rRNA Gene Clusters in Three Species of *Astyanax* (Teleostei, Characiformes). *Cytogenet Genome Res*, 134:64–71.
- Henning F, Trifonov V, Ferguson-Smith MA, Almeida-Toledo LF. 2008. Non-homologous sex chromosomes in two species of the genus *Eigenmannia* (Teleostei: Gymnotiformes). *Cytogenetic and Genome Research*, 121: 55-58.
- Howell WM, Black DA. 1980. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: A 1-step method. *Experientia*, 36: 1014-1015.
- Houben A, Banaei-Moghaddam, AM, & Klemme S. 2013. Biology and evolution of B chromosomes (pp. 149-165). Springer Vienna.

- Jesus CM, Galetti Jr PM, Valentini SR, Moreira-Filho O. 2003. Molecular characterization and chromosomal location of two families of satellite DNA in *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae), a species with B chromosomes. *Genetica* 118: 25-32.
- Jones RN, Rees H. 1982. B Chromosome. Academic Press, London.
- Lercher MJ, Urrutia AO, & Hurst LD. 2002. Clustering of housekeeping genes provides a unified model of gene order in the human genome. *Nature genetics*, 31(2), 180-183.
- Levan A, Fredga K, Sandberg AA. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52: 201-220.
- López-Flores I, Garrido-Ramos M. 2012. The repetitive DNA content in eukaryotic genomes. In M. Garrido-Ramos (Ed.), *Repetitive DNA genome dynamics*, 1–28.
- Mandrioli M. 2000. Mariner-Like transposable elements are interspersed within the rDNA-associated heterochromatin of the pufferfish *Tetraodon fluviatilis* (Osteichthyes). *Chromosome Res* 8:177–179.
- Maistro EL, Foresti F, Oliveira C. 1999. R- and G-band patterns in *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characiformes, Characidae). *Genetics and Molecular Biology*, 22(2): 201-204.
- Martins C, Galetti Jr. PM. 2001. Two rDNA arrays in Neotropical fish species: is it a general rule for fishes? *Genetica*, 111: 439-446.
- Maxson R, Cohn R, Kedes L, Mohut T. 1983. Expression and organization of histone genes. *Ann Rev Gen* 17:239–277.
- Merlo MA, Cross I, Rodríguez- Rúa A, Manchado M & Rebordinos L. 2013. First approach to studying the genetics of the meagre (*Argyrosomus regius*; Asso, 1801) using three multigene families. *Aquaculture Research*, 44(6), 974-984.
- Merlo MA, Cross I, Chairi H, Manchado M, Rebordinos L. 2010. Analysis of three multigene families as useful tools in species characterization of two closely-related species, *Dicentrarchus labrax*, *Dicentrarchus punctatus* and their hybrids. *Genes Genet Syst*, 85:341–349.
- Merlo MA, Cross I, Palazón JL, Úbeda-Manzanaro M, Sarasquete C, Rebordinos L. 2012a. Evidence for 5S rDNA horizontal transfer in the toad- fish *Halobatrachus didactylus* (Schneider, 1801) based on the analysis of three multigene families. *BMC Evol Biol*, 12:201.

- Mestriner CA, Galetti Jr. PM, Valentini SR, Ruiz IRG, Abel LDS, Moreira-Filho O, Camacho JPM. 2000. Structural and functional evidence that a B chromosome in the characid fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome. *Heredity*, 85: 1-9.
- Milhomem SSR, Pieczarka JC, Crampton WGR, Silva DS, Souza ACP, Carvalho Jr. JR, Nagamachi CY. 2008. Chromosomal evidence for a cryptic species in the *Gymnotus carapo* species-complex (Gymnotiformes, Gymnotidae). *BMC Evolutionary Biology*, 9: 75.
- Nagoda N, Fukuda A, Nakashima Y and Matsuo Y. 2005. Molecular characterization and evolution of the repeating units of histone genes in *Drosophila americana*: coexistence of quartet and quintet units in a genome. *Insect Molecular Biology*, 14: 713-717.
- Nakajima RT, Cabral-de-Mello DC, Valente GT, Venere PC, Martins C. 2012. Evolutionary dynamics of rRNA gene clusters in cichlid fish. *BMC Evolutionary Biology*, 12: 198.
- Nelson JS. 2006. *Fishes of the World*. 4th Edition. Wiley, New Jersey.
- Nguyen P, Sahara K, Yoshido A, Marec F. 2010. Evolutionary dynamics of rDNA clusters on chromosomes of moths and butterflies (Lepidoptera). *Genetica* 138: 343–354.
- Oliveira C, Almeida-Toledo LF, Foresti F, Britski HA, Toledo-Filho SA. 1988a. Chromosome formulae of Neotropical freshwater fishes. *Rev. Brasil. Genet.*, 11: 577-624.
- Oliveira C, Wright JM. 1998. Molecular cytogenetic analysis of heterochromatin in the chromosomes of tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae). *Chromosome Research*, 6: 205- 11.
- Oliveira C, Foresti F, Almeida-Toledo LF. 2007. Karyotypic evolution in Neotropical fishes. In: *Fish Cytogenetics*. Pisano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F, Kapoor BG. Enfield, Science Publisher, 111-164.
- Pansonato-Alves JC, Serrano EA, Utsunomia R, Scacchetti PC, Oliveira C, Foresti F. 2013. Mapping five repetitive DNA classes in sympatric species of *Hypostomus* (Teleostei: Siluriformes: Loricariidae): analysis of chromosomal variability. *Rev Fish Biol Fisheries*, DOI 10.1007/s11160-013-9303-0.
- Pansonato-Alves JC, Serrano EA, Utsunomia R, Camacho JPM, Costa Silva GJ, Vicari MR, Artoni RF, Oliveira C, Foresti F. 2014. Single Origin of Sex Chromosomes and Multiple Origins of B Chromosomes in Fish Genus *Characidium*. *Plos One*, v.9, p. e107169

- Panzerá Y, Pita S, Ferreiro MJ, Ferrandis I, Lages C, Pérez R, Silva AE, Guerra M, Panzerá F 2012. High dynamics of rDNA cluster location in kissing bug holocentric chromosomes (Triatominae, Heteroptera). *Cytogenet Genome Res* 138: 56 - 67.
- Phillips RB, Reed KM. 1996. Application of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) techniques to fish genetics: a review. *Aquaculture*, 140: 197-216.
- de Pinna MCC. 1998. Phylogenetic relationships of Neotropical Siluriformes (Teleostei: Ostariophysi): historical overview and synthesis of hypotheses. IN: *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. (Malabarba, L.R., Reis, R.E., Vari, R.P., Lucena, Z.M.S., Lucena, C.A.S., eds). Porto Alegre: EDIPUCRS, pp. 279-330.
- de Pinna MCC, Wosiacki WB 2003. Family Trichomycteridae (pencil or parasitic catfishes), pp270-290. In R.E: Reis, S.O. Kullander, and C.J. Ferraris, Jr. (Eds.), *Checklist of the freshwater fishes of South and Central America*. EDIPUCRS, Porto Alegre, Brasil.
- Pinkel D, Straume T, Gray JW. 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83: 2934-2938.
- Raskina O, Barber JC, Nevo E, Belyayev A. 2008. Repetitive DNA and chromosomal rearrangements: speciation-related events in plant genomes. *Cytogenet Genome Res* 120:351–357.
- Reis RE. 2013. Conserving the freshwater fishes of South America. *International Zoo Yearbook*, 47:65-70.
- Sarmiento-Soares LM, Zanata AM & Martins-Pinheiro, R.F. 2011. *Trichomycterus payaya*, new catfish (Siluriformes: Trichomycteridae) from headwaters of rio Itapicuru, Bahia, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 9(2):261-271.
- Sato LR, Oliveira C, Foresti F. 2004. Karyotype description of five species of *Trichomycterus* (Teleostei, Siluriformes, Trichomycteridae). *Genetics and Molecular Biology*, 27(1): 45-50.
- Scheel JJ. 1973. Internal Report of Danmarks Akvarium, Charlottenlund, Denmark, 22 pp.
- da Silva M, Matoso DA, Vicari MR, Almeida MC, Margarido VP, Artioni RF. 2011. Physical mapping of 5S rDNA in two species of Knifefishes: *Gymnotus pantanal* and *Gymnotus paraguensis* (Gymnotiformes). *Cytogenetics and Genome Research* 134: 303–307.
- Silva DMZ, Pansonato-Alves JC, Utsunomia R, Daniel SN, Hashimoto DT, Oliveira C, Porto-Foresti F, Foresti F. 2013. Chromosomal organization of repetitive DNA

- sequences in *Astyanax bockmanni* (Teleostei, Characiformes): dispersive location, association and co-localization in the genome. *Genetica*, 141:329–336.
- Sola L, De Innocentiis S, Gornung E, et al. 2000. Cytogenetic analysis of *Epinephelus marginatus* (Pisces: Serranidae), with the chromosome localization of the 18S and 5S rRNA genes and of the (TTAGGG)_n telomeric sequence. *Mar. Biol.* 137: 47–51.
- Sumner AT. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research*, 75: 304–306.
- Sumner AT. 2003. Chromosomes: organization and function. London: Blackwell Publishing company.
- Supiwong W, Liehr T, Cioffi MB, Chaveerach A, Kosyakova N, et al. 2013. Karyotype and cytogenetic mapping of 9 classes of repetitive DNAs in the genome of the naked catfish *Mystus bocourti* (Siluriformes, Bagridae). *Mol Cytogenet*, 6:51.
- Symonová R, Majtánová Z, Sember A, Staaks GBO, Bohlen J, Freyhof J, Marie Rábová M, Ráb P. 2013. 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*, 13:42.
- Torres RA, Foresti F, Oliveira C. 2002. Occurrence of karyotypical mosaicism in *Trichomycterus paolence* (Teleostei, Trichomycteridae). *Caryologia*, 55:283–287.
- Torres RA, Oliveira C, Foresti F. 2004. Cytotaxonomic diagnosis of *Trichomycterus diabolus* (Teleostei: Trichomycteridae) with comments about its evolutionary relationships with co-generic species. *Neotropical Ichthyology*, 2(3): 123–125.
- Úbeda-Manzanaro M, Merlo MA, Palazón JL, Cross I, Sarasquete C, Rebordinos L. 2010. Chromosomal mapping of the major and minor ribosomal genes, (GATA)_n and U2 snRNA gene by double-colour FISH in species of the Batrachoididae family. *Genetica*, 138: 787–794.
- Utsunomia R, Scacchetti PC, Pansonato-Alves JC, Oliveira C, Foresti F. 2014. Comparative Chromosome Mapping of U2 snRNA and 5S rRNA Genes in *Gymnotus* Species (Gymnotiformes, Gymnotidae): Evolutionary Dynamics and Sex Chromosome Linkage in G. pantanal. *Cytogenetic and Genome Research*, 142: 286–292.
- Valente GT, Mazzuchelli J, Ferreira IA, Poletto AB, Fantinatti BEA, Martins C. 2010. Cytogenetic Mapping of the Retroelements *Rex1*, *Rex3* and *Rex6* among Cichlid Fish: New insights on the chromosomal distribution of transposable elements. *Cytogenetic and Genome Research*.

- Vicari MR, Artoni RF, Moreira-Filho O, Bertollo LAC. 2008. Diversification of a ZZ/ZW sex chromosome system in *Characidium* fish (Crenuchidae, Characiformes). *Genetica*, 134: 311-317.
- Vicari MR, Nogaroto V, Noieto RB, Cestari MM., Cioff MB, Almeida MC, Moreira-Filho, O, Bertollo LAC, Artoni RF. 2010. Satellite DNA and chromosomes in Neotropical fishes: Methods, applications and perspectives. *J Fish Biol*, 76: 1094-1116.
- Vierna J, Jensen KT, Martínez-Lage A, González-Tizón AM. 2011. The linked units of 5S rDNA and U1 snDNA of razor shells (Mollusca: Bivalvia: Pharidae). *Heredity*. doi:10.1038/hdy.2010.17.
- Wagner RP, Maguire MP, Stallings RL. 1993. Chromosomes: a synthesis. Wiley-Liss, Inc., New York.
- White TJ, Bruns T LS, Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic, San Diego. pp 315-322.
- Wosiacki VB. 2002. Estudo das relações filogenéticas de Trichomycterinae (Teleostei, Siluriformes, Trichomycteridae) com uma proposta de classificação. Tese de Doutorado (não publicada), Universidade de São Paulo, São Paulo, 324 p.
- Wosiacki VB, Garavello JC. 2002. Five new species of *Trichomycterus* from the rio Iguaçu (rio Paraná Basin), southern Brazil (Siluriformes: Trichomycteridae) *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, 5(1): 1-16
- Wosiacki VB, de Pinna MCC. 2007. Família Trichomycteridae: Trichomycterinae In: Buckup, P.A., Menezes, N. A. e Ghazzi, M. S. (Eds.) Catálogo das Espécies de peixes de água doce do Brasil. Rio de Janeiro, Museu Nacional, 195 p.
- Ziemniczak K, Barros AV, Rosa KO, Nogaroto V. 2012. Comparative cytogenetics of Loricariidae (Actinopterygii: Siluriformes): emphasis in Neoplecostominae and Hypoptopomatinae, *Ital. J. Zool.* 79:492–501.