



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Departamento de Morfologia

Laboratório de Biologia e Genética de Peixes

**DESENVOLVIMENTO DE CULTURA DE CÉLULAS ADERENTES EM
PEIXES NEOTROPICAIS E SUA APLICAÇÃO EM ESTUDOS CITOGENÉTICOS**

Fabilene Gomes Paim

Botucatu / SP

Março de 2018



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

Departamento de Morfologia

Laboratório de Biologia e Genética de Peixes

**DESENVOLVIMENTO DE CULTURA DE CÉLULAS ADERENTES EM PEIXES
NEOTROPICAIS E SUA APLICAÇÃO EM ESTUDOS CITOGENÉTICOS**

Doutoranda: Fabilene Gomes Paim

Orientador: Prof. Dr. Claudio de Oliveira

Co-orientador: Dr. Leandro Maia

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética) do Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor.

Botucatu / SP

Março de 2018

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

Paim, Fabilene Gomes.

Desenvolvimento de cultura de células aderentes em
peixes neotropicais e sua aplicação em estudos
citogenéticos / Fabilene Gomes Paim. - Botucatu, 2018

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

Orientador: Claudio de Oliveira

Coorientador: Leandro Maia

Capes: 20200005

1. Peixe - Genética. 2. Linhagem celular. 3.
Cromossomos. 4. Criopreservação. 5. Células - Cultura e
meios de cultura. 6. Citogenética.

Palavras-chave: FISH; Peixes dulcícolas; criopreservação;
cromossomos; linhagem celular.

Dedico a minha família, por apoiar meus sonhos
e conquistas, e ao meu pai (*in memoriam*) pela
admiração que tinha pela sua pequena cientista.

“A resposta que você der hoje talvez não valha mais amanhã. A resposta de hoje lhe parece certa, talvez amanhã seja contraditória. Melhor deixar espaço para a mudança, para a dúvida e diferentemente da sua casa feita de tijolos, o seu castelo nas nuvens pode estar sempre em construção”.

(Barbara S. Tammes, Livro Design interior, pg. 11).

Agradecimentos

Ao meu orientador Prof. Dr. Claudio de Oliveira, pelo exemplo de pesquisador e por todas as oportunidades oferecidas para o desenvolvimento deste trabalho. Obrigada pela confiança, incentivos, ensinamentos e amizade sempre.

Ao Prof. Dr. Fausto Foresti, pelo apoio e incentivo. Obrigada pelos conselhos e pelas conversas descontraídas. O senhor é um pesquisador por quem tenho muita admiração!

Ao Dr. Leandro Maia, pela ajuda no delineamento dos experimentos. Obrigada pelos ensinamentos e discussões na construção deste trabalho.

Ao técnico Renato Devidé, pela disposição em ajudar nas idas a campo e pela sua alegria e simpatia diariamente.

A Leticia Soares, por embarcar comigo nesse universo da citogenética. Obrigada pela paciência infinita, parceria e ajuda preciosa na construção deste trabalho.

A Najila Nolie e Maria Ligia, pela amizade e carinho sempre. Vocês são muito especiais para mim!

Aos colegas e grandes amigos do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes pelo ambiente saudável e descontraído. Cada um com jeito particular, sempre disposto e pronto a ajudar e ensinar naquilo que fosse possível. Obrigada pelos bons momentos durante o almoço e as risadas nas tardes do cafezinho!

Ao Prof. Dr. Diogo Teruo Hashimoto pela doação dos exemplares das espécies de peixes.

A Prof. Dr. Fernanda Landim por ter aberto as portas de seu laboratório para que pudesse iniciar meus primeiros experimentos e os seus alunos pela ajuda e paciência.

A Caroline Maia e Camila Dell'Aqua, pela ajuda nas análises, disponibilidade e discussão dos resultados da citometria de fluxo.

A Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu e ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas (Genética), pelo apoio e condições para a realização desta pesquisa.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade de tempo para avaliar e contribuir para este trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da Bolsa.

A minha família, por tornar tudo tão leve e alegre, em especial a minha mãe pelo amor incondicional as suas filhas. As minha irmãs, Fau e Noca, pelo carinho e amizade. Aos meus sobrinhos Júlia e Pedro, pelo carinho e alegria. E o mais novo, Henrique, que ainda nem chegou, mas já enche de amor o coração dessa tia. Vocês são minhas riquezas! Ao meu cunhado, Lucas e meu padrasto Aurélio por todo apoio e cuidado sempre.

As minhas amigas pela torcida constante, especialmente, Joara e Dinha que acreditaram em mim deste quando eu embarquei neste sonho. “Porque você é impossível de esquecer...”.

A Deus pelo cuidado diário e por permitir que tudo isso seja possível! “Não fui eu que lhe ordenei? Seja forte e corajoso!”

A todas as pessoas que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

Resumo

Embora a ictiofauna Neotropical seja considerada a mais diversa do mundo, apenas 12,2% das espécies de peixes tiveram cariótipos descritos. A dificuldade de se obter preparações cromossômicas de boa qualidade para algumas espécies de peixes Neotropicais ainda é um dos grandes desafios na área de Citogenética, principalmente para peixes de pequeno e grande porte. Uma alternativa é uso de metodologias indiretas, tais como cultura de células, amplamente utilizada e estabelecida em mamíferos, entretanto para peixes ainda é pouco empregada pela dificuldade de padronização da técnica de isolamento e manutenção das culturas celulares. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo o desenvolvimento de uma metodologia de cultura de células aderentes para obtenção de cromossomos mitóticos em peixes neotropicais, estabelecendo linhagens celulares de diferentes espécies e a determinação de suas características citogenéticas. Seis espécies de peixes Neotropicais da ordem Characiformes foram utilizadas para obtenção das culturas primárias, desenvolvimento e criopreservação das linhagens celulares e análise citogeneticamente. Para obtenção das linhagens, células de tecido muscular foram isoladas usando enzimas proteolíticas. As células isoladas foram cultivadas em frascos ou placas tratadas com um filme à base de gelatina e mantidas à 27,5°C, 5% CO₂ em meio completo (DMEM+soro fetal bovino+antibióticos+antimicóticos). Quando as células cobriram toda a superfície do substrato, elas foram transferidas para novos frascos para obtenção das preparações cromossômicas e criopreservação. As preparações cromossômicas das linhagens celulares foram realizadas em diferentes passagens nas espécies e os cromossomos metafásicos obtidos apresentaram morfologia nítida e definida com grande número de metáfases por lâminas e, o número modal (2n) nas espécies foi mantido mesmo após o processo de criopreservação e sucessivos subcultivos. Além disso, o uso dessa tecnologia possibilitou a localização de sequências repetitiva de DNA em *Colossoma macropomum* e *Piaractus mesopotamicus*. No total, 28 linhagens celulares foram congeladas em diferentes passagens para as seis espécies com o número de células viáveis superiores 90% e depois de descongeladas a viabilidade celular foi superior a 50%. Esses resultados representam uma grande inovação para área de citogenética de peixes neotropicais e a aplicação desta metodologia poderá sanar algumas lacunas existentes de grupos de peixes ainda poucos explorados citogeneticamente pela dificuldade de obter preparações cromossômicas de boa qualidade que são cruciais para o sucesso de várias experiências. Além disso, essa técnica tornou possível a criação do primeiro banco de células de peixes neotropicais para América Latina.

Palavras-chave: Peixes dulcícolas, linhagem celular, cromossomos, FISH, criopreservação.

Abstract

Although Neotropical ichthyofauna is considered the most diverse in the world, only 12.2% had karyotypes described. The difficulty of obtaining good quality chromosome preparations for some Neotropical fish species is still one of the major challenges in the area of cytogenetics, especially for small and large fish. An alternative is the use of indirect methodologies, such as cell culture, widely used and established in mammals, however for fish is still little used for the difficulty of standardization of the technique of isolation and maintenance of cell culture. Thus, the present study aimed to develop a methodology for adherent cell culture to obtain mitotic chromosomes in Neotropical fish, establishing cell lines of different species and the cytogenetic characteristics of these lines. Six species of Neotropical fish of the order Characiformes were used to obtain primary cell, development and cryopreservation of the cell lines and cytogenetic analysis. To obtain the cell lines, muscle tissue were isolated using proteolytic enzymes. The isolated cells were cultured in flasks or plates treated with a gelatin-based film and maintained at 27.5 °C, 5% CO₂ in complete medium (DMEM + fetal bovine serum + antibiotics + antimycotics). When the cells covered almost all surface of the substrate, they were transferred to new flasks to obtain chromosome preparations and cryopreservation. The chromosome preparations of the cell lines were performed in different passages in the species and the metaphase chromosomes obtained showed clear and defined morphology with a large number of metaphases per slide and the modal number (2n) in the species was maintained even after the cryopreservation process and successive subcultures. In addition, the use of this technology enabled the localization of repetitive DNA sequences in *Colossoma macropomum* and *Piaractus mesopotamicus*. In total, 28 cell lines were cryopreserved at different passage levels for the six species with viable cell numbers higher than 90% and after thawing the cell viability was greater than 50%. These results show a great innovation for the cytogenetic area of Neotropical fishes and the application of this methodology might correct some existing gaps in fish groups which have been a little explored cytogenetically due to the difficulty of obtaining good quality chromosome preparations that are crucial for the success of several experiments. In addition, this technique made possible the creation of the first Neotropical fish cell bank in Latin America.

Key words: Freshwater fish, cell lines, chromosomes, FISH, cryopreservation.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

- Figura 1: Morfologia fibroblastóide das células aderidas provenientes da digestão enzimática do tecido muscular de *Astyanax altiparanae* após 72 horas de cultivo (A). Essas células após 10 dias de cultivo apresentaram confluência celular superior a 80% (B) e quando subcultivadas apresentaram confluência em 48 e 72 horas de cultivo. Note as células fibroblastóides subcultivadas na terceira passagem após 72 horas (C). Em (D), colônias de células fibroblastóides na quarta passagem após seis dias pós- descongelamento. Essas células apresentaram confluência celular após 18 dias (E) e após subcultivadas essas células ocuparam a superfície do frasco em quatro dias. Note células pós-descongelamento na sexta passagem após 24 horas de subcultivadas (F). A barra em A, B e C 200µm e D, E e F 100µm em aumento de 10X.38
- Figura 2: Cromossomos metafásicos obtidos de células fibroblastóides de *Astyanax altiparanae* na quarta passagem antes do congelamento (A) e na sexta passagem pós-descongelamento (B). A barra equivale a 20 µm.....39

Capítulo 2

- Figura 1: Cultivo primário de células fibroblastóides do tecido muscular de *Astyanax altiparanae* após 72 horas de cultivo (A). Células subcultivadas na terceira passagem com confluência celular de 80% (B). Células fibroblastóides após 18 dias pós-descongelamento (D). Células de *A. altiparanae* subcultivadas depois do processo de criopreservação na sexta passagem (E). Cromossomos metafásicos obtidos de células fibroblastóides na quarta passagem (C) e na sexta passagem depois do processo de congelamento e descongelamento. A barra em A e B 200µm, D e E 100µm em aumento de 10X e C e F 100µm em aumento de 100X.....52
- Figura 2: Cultivo primário de células fibroblastóides do tecido muscular de *Astyanax bockmanni* após 72 horas de cultivo (A). Células subcultivadas na quarta passagem com confluência celular de 80% (B). Células fibroblastóides após 15 dias pós-descongelamento (D). Células de *A. altiparanae* subcultivadas depois do processo de

criopreservação na sexta passagem (E). Cromossomos metafásicos obtidos de células fibroblastóides na quinta passagem (C) e na sexta passagem depois do processo de congelamento e descongelamento. A barra em A e B 200µm, D e E 100µm em aumento de 10X e C e F 100µm em aumento de 100X.....53

Figura 3: Cultivo primário de células fibroblastóides do tecido muscular de *Astyanax paranae* após 48 horas de cultivo (A). Células subcultivadas na segunda passagem com confluência celular de 80% (B). Células fibroblastóides após 12 dias pós-descongelamento (D). Células de *A. paranae* subcultivadas depois do processo de criopreservação na quarta passagem (E). Cromossomos metafásicos obtidos de células fibroblastóides na terceira passagem (C) e na quarta passagem depois do processo de congelamento e descongelamento. A barra em A e B 200µm, D e E 100µm em aumento de 10X e C e F 100µm em aumento de 100X.....54

Figura 4: Cultivo primário de células fibroblastóides do tecido muscular de *Megaleporinus macrocephalus* após 72 horas de cultivo (A). Células subcultivadas na primeira passagem com confluência celular superior a 80% (B). Células fibroblastóides após cinco dias pós-descongelamento (D). Células de *M. macrocephalus* subcultivadas depois do processo de criopreservação na terceira passagem (E). Cromossomos metafásicos obtidos de células fibroblastóides na primeira passagem (C) e na terceira passagem depois do processo de congelamento e descongelamento. A barra em A e B 200µm, D e E 100µm em aumento de 10X e E e F 100µm em aumento de 100X.....55

Figura 5: Cultivo primário de células fibroblastóides do tecido muscular de *Colossoma macropomum* e *Piaractus mesopotamicus* após 72 horas de cultivo (A e D). Células subcultivadas na primeira passagem com confluência celular superior a 80% (B e E). Cromossomos metafásicos obtidos de células fibroblastóides de *C. macropomum* e *P. mesopotamicus* na segunda passagem (C e F). A barra em A, B, C e D 200µm em aumento de 10X e C e F 100µm em aumento de 100X.....56

Capítulo 3

Figura 1: Metafases de *Colossoma macropomum* e *Piaractus mesopotamicus* após os experimentos de FISH com sondas de DNAr 18S, DNAr 5S, snRNA U1 e snRNA U2. A barra equivale 20 µm.....66

LISTA DE TABELAS

Material e Métodos

TABELA 1: Espécies de peixes Neotropicais analisadas neste estudo, número de indivíduos (N), sexo - ♀ para fêmeas, ♂ para machos, NI não identificado, local de coleta.....	21
---	----

Capítulo 2

TABELA 1: Sumário dos experimentos de cultivo primário e subcultivos das espécies analisadas nesse estudo.	57
TABELA 2: Sumário dos experimentos de criopreservação das linhagens celulares das espécies analisadas nesse estudo utilizando o método de exclusão de Azul de trypan.....	58
TABELA 3: Sumário dos resultados das análises de viabilidade, apoptose e necrose das linhagens celulares analisadas nesse estudo por citometria de fluxo utilizando Anexina V e iodeto de propídeo.....	59

Capítulo 3

TABELA 1: Primers usados na amplificar os fragmentos dos genes DNAr 18S, DNAr 5S, RNAsn U1 e RNAsn U2.....	67
--	----

SUMÁRIO

1.	Introdução	15
1.1.	Estudos citogenéticos em Peixes Neotropicais	15
1.2.	Culturas de células aderentes e linhagens celulares	17
1.3.	Cultura de células para estudos cromossômicos em peixes	18
2.	Objetivos	19
2.1.	Objetivo principal	19
2.2.	Objetivos Específicos.....	20
3.	Material e Métodos.....	20
3.1	Material	20
3.1.1	Espécies estudadas e locais de coleta	20
3.2	Métodos	22
3.2.1	Obtenção da cultura primária e desenvolvimento das linhagens celulares.....	22
3.2.2	Criopreservação e teste viabilidade celular	24
3.2.3	Análise de apoptose e necrose.....	25
3.2.4	Obtenção dos cromossomos mitóticos	25
3.2.5	Análise dos dados citogenéticos.....	26
3.3	Hibridação <i>in situ</i> fluorescente (FISH).....	26
4.	Resultados e Discussão.....	29
	Capítulo 1: Um novo protocolo de cultura de células para peixes neotropicais	30
	Capítulo 2: Banco de linhagens celulares de peixes neotropicais para estudos citogenéticos.....	40
	Capítulo 3: Mapeamento cromossômico de sequências de DNA repetitivos em linhagens celulares de espécies da família Serrasalminidae Bleeker, 1859 (Characiformes)	60
5.	Considerações finais.....	68

6.	Referências bibliográficas	69
----	----------------------------------	----

1. Introdução

1.1. Estudos citogenéticos em Peixes Neotropicais

A região Neotropical compreende desde a parte sul do México até a América do Sul e, abriga a mais rica e mais diversificada fauna de peixes do mundo. Estima-se que existam para essa região, 5160 espécies de peixes de água doce, alocadas em 739 gêneros, 69 famílias e 20 ordens, o que representa um terço de todos os peixes dulcícolas existentes no planeta (Reis et al. 2016). A maior parte dessa diversidade está agrupada dentre os Characiformes e Siluriformes, mas há ainda lacunas de informações em muitos grupos (Albert e Reis 2011).

Toda essa diversidade tem sido objeto de estudo em diferentes áreas, entre elas, na Citogenética. Essa área começou se destacar a partir do desenvolvimento de metodologias que permitiram a obtenção de preparações cromossômicas de qualidade (Bertollo et al. 1978; Foresti et al. 1981) tornando uma ferramenta para avaliação da biodiversidade não apenas na região Neotropical, mas em outras partes do mundo. De fato, o número de estudos citogenéticos cresceu após as publicações destas metodologias e tem resultado não apenas em descrição cariotípica, mas também em estudos com abordagens citotaxonômicas, aplicabilidade na aquicultura, filogenia e evolução cariotípica, bem como na identificação de híbridos de peixes cultivados (Porto-Foresti et al. 2008; Hashimoto et al. 2009; Vicari et al. 2010; Tenório et al. 2013; Ramirez et al. 2017).

Há vários motivos que tornam os peixes bons modelos para estudos citogenéticos, entre eles, a enorme variação cromossômica encontrada em alguns grupos, como por exemplo, nos Characiformes, onde é possível observar dois padrões de variações cromossômicas. Nas famílias Anostomidae, Crenuchidae, Chilodontidae, Hemiodontidae, Prochilodontidae e Parodontidae quase não há modificações quanto ao número e estrutura cromossômica, enquanto nas famílias Characidae, Curimatidae, Erythrinidae, e Lebiasinidae existem uma maior variação quanto ao número cromossômico, variando de $2n = 22$ a 102 cromossomos (Arai 2011). Outro grupo que também se destaca pela sua diversificação cromossômica são os Siluriformes, como na família Ariidae com variação pequena do número diploide, $2n = 54$ a 56 cromossomos, em contrapartida nos Callichthyidae e Loricariidae essas alterações são maiores com número diploide de $2n = 44$ a 120 cromossomos e $2n = 38$ a 80 cromossomos, respectivamente (Arai 2011).

Além disso, a presença de diferentes sistemas de determinação de sexo encontrada em alguns grupos de peixes é outro aspecto que chama bastante atenção na área da pesquisa citogenética. São encontrados vários tipos de sistemas sexuais em peixes: sistemas simples com heterogametia masculina (XX/XY), como em *Hoplias malabaricus* (Born e Bertollo 2006) e no gênero *Eigenmannia* (Sene et al. 2014; Silva et al. 2015) e com heterogametia feminina (ZZ/ZW) como no gênero de *Megaleporinus* (Ramirez et al. 2017), *Characidium* (Scacchetti et al. 2015), *Hypostomus ancistroides* (Kanei et al. 2017), *Triportheus* (Yano et al. 2014; Yano et al. 2016), entre outros; e sistemas múltiplos do tipo $X_1X_1 \ X_2X_2 / X_1Y_1 \ X_2Y_2$ como em *Bunocephalus coracoideus* (Ferreira et al. 2016), tipo XX/ $XY_1 \ Y_2$ em *Gymnotus bahianus* (Almeida et al. 2015), tipo $X_1X_1 \ X_2X_2 / X_1X_2Y$ em *Harttia punctata* (Blanco et al. 2014) e no gênero *Eigenmannia* (Sene et al. 2014). E ainda sistemas sexuais derivados, como por exemplo, ZZ/Z0 descrito para *Eigenmannia trilineata* (Araya-Jaime 2017).

Outro aspecto também investigado dentro da citogenética de peixes é a ocorrência de cromossomos supranumerários. Esses cromossomos são elementos genômicos extras ao conjunto cromossômico padrão A e já foram descritos em fungos, plantas e animais (Camacho 2005). Em peixes, já foram descritos em mais de 60 espécies de peixes neotropicais (Carvalho et al. 2008), sendo os gêneros *Astyanax*, *Moenkhausia*, *Prochilodus* e *Characidium* estão entre os mais estudados, especialmente quanto à origem, composição, distribuição, comportamento e função desses cromossomos (Silva et al. 2014, 2016; Utsunomia et al. 2016; Melo et al. 2017; Serrano et al. 2017).

Embora a região Neotropical apresente toda essa diversidade de peixes e um cenário que proporciona estudos citogenéticos e evolutivos, o conhecimento citogenético dessa rica ictiofauna ainda é deficiente. Estima-se que apenas 12,2% das espécies de peixes tiveram o cariótipo descrito, sendo 344 espécies de Characiformes, 440 espécies de Siluriformes, 354 espécies de Cyprinodontiformes e 139 espécies de Cichlidae (Perciformes), enquanto dados para a maioria das outras ordens ainda são considerados escassos (Arai 2011).

A ausência de informações quanto à composição e estruturação cromossômica de muitas espécies de peixes pode ser atribuída a dois fatores relevantes, como os problemas enfrentados para manutenção dos animais vivos em laboratório, e a dificuldade em se obter preparações citogenéticas de boa qualidade usando metodologias já

existentes. Assim, o desenvolvimento de novas metodologias citogenéticas podem contribuir expressivamente para novos estudos em grupos ainda poucos explorados ou naqueles onde os problemas já levantados poderão ser melhores investigados.

1.2. Culturas de células aderentes e linhagens celulares

A cultura de células animais é uma técnica *in vitro* amplamente utilizada para isolar e manter células fora do seu ambiente original (Oyeleye et al. 2016), e tem sido uma ferramenta muito útil nos estudos sobre comportamento e funcionamento dos sistemas biológicos. Os primeiros ensaios com cultura de células ocorreram no início de século XX, para estudar o comportamento de células animais durante a homeostase e stress (Freshney 2005), desde então, o desenvolvimento de pesquisas com cultura de células ganhou grande destaque em diferentes áreas da virologia, morfogênese, citologia, citoquímica, toxicologia, biotecnologia e biologia molecular, em muitos animais e grupos de plantas (Sobhana et al. 2009; Helgason e Miller 2013).

Esse desenvolvimento ocorreu principalmente pelo aprimoramento da técnica e pela utilização de linhagens celulares que puderam ser propagadas por um maior período de tempo, tornando a tecnologia de cultura de células mais moderna e valiosa para estudar as funções e mecanismos de operações de diferentes tipos de células, incluindo células de insetos, de humanos, de roedores, e de outros animais (Oyeleye et al. 2016).

Um grupo de células isoladas diretamente de órgãos ou tecidos de um indivíduo é conhecido como cultura primária. Essas células podem migrar do fragmento de tecido aderido ao substrato ou pela dissociação mecânica e/ou enzimático do tecido que irá produzir uma suspensão celular e, posteriormente, essas células serão fixadas ao substrato e assim começarão a proliferar. Tais células dependentes de um substrato são chamadas de células aderentes. Elas crescem em monocamadas e tem crescimento limitado pela superfície do substrato (Freshney 2010; Moraes et al. 2014; Oyeleye et al. 2016).

A afinidade das células aderentes com o substrato é considerada crucial para sua proliferação, por isso o processo de adesão celular é de fundamental importância na comunicação e regulação das células e no desenvolvimento e manutenção de tecidos. Esse processo é caracterizado pela fixação da célula ao seu substrato, achatamento da célula e, posteriormente proliferação da célula no substrato (Khalili e Ahmad 2015). De modo geral, culturas de células *in vitro* de vertebrados crescem em um substrato artificial

que permita a aderência e crescimento da célula, mas esse processo pode ser otimizado quando se faz um pré-tratamento no substrato com soro, colágeno, gelatina, laminina, fibronectina, entre outros (Freshney 2010). Tais tratamentos são particularmente úteis para estabelecer culturas de células que são difíceis de cultivar (Merten 2015).

Quando as células cobrem toda a superfície do substrato (confluência celular) é necessário transferir essas células para novos frascos, processo chamado de subcultivo (passagem ou repique). Geralmente, as células aderentes são desprendidas da superfície do frasco com tripsina (que clivam as proteínas de adesão) ou com espátulas especiais. Após o primeiro subcultivo, a cultura deixa de ser considerada primária, e passa a ser conhecida como linhagem celular. Diferentes das culturas primárias que são mais heterogêneas, as linhagens celulares são mais homogêneas e proliferam mais rapidamente (Freshney 2010).

Com a disseminada necessidade de substituição de animais pela estratégia dos 3Rs (*reduction, refinement e replacement*) (Doke e Dhawale 2015), o desenvolvimento de novas linhagens celulares é crescente. Atualmente, mais de 4000 linhagens celulares estão disponíveis no ATCC (American Type Culture Collection), destas, 150 linhagens são de células animais e de insetos (<https://www.atcc.org/>). A linhagem celular HeLa é uma das linhagens mais utilizadas e mais antigas, foi estabelecida de adenocarcinoma cervical de uma paciente chamada Henrietta Lacks e muito do conhecimento dos processos que ocorre nas células de animais, especialmente nas células humanas, foi adquirido pelos estudos com estas células HeLa (Masters 2002).

1.3. Cultura de células para estudos cromossômicos em peixes

Os peixes constituem um excelente modelo experimental para estudos no desenvolvimento de linhagens de células. De acordo com Wang et al. (2012) mais de 280 linhagens de células de fibroblastos de peixes estão atualmente disponíveis. A maioria foi estabelecida para espécies de peixes de água doce e peixes anádromos, sendo que muitas dessas linhagens foram desenvolvidas na Ásia (Lakra et al. 2011). Entretanto, a maior parte dessas linhagens não está disponível no catálogo da ATCC (<https://www.atcc.org/>).

Muitas linhagens de células têm sido estabelecidas e amplamente usadas em uma variedade de estudos, incluindo a detecção e isolamento de vírus (Chi et al. 1999; Fu et

al. 2015), avaliação da citotoxicidade em poluentes aquáticos (Fent 2001; Taju et al. 2013; Dubey et al. 2015), interação patógeno hospedeiro para elucidar questões relacionadas à imunidade inata (Jensen et al. 2013), mapeamento e expressão gênica (Wei et al. 2014; Mello et al. 2015; Kumar et al. 2016) e criação de bancos de germoplasma de peixes (Sobhana et al. 2009; Chen e Qin 2011; Wang et al. 2012).

A maioria dessas linhagens vem sendo cultivadas a partir de tecidos epiteliais, brânquias, coração, fígado, rim, ovário, cérebro, entre outros, embora embriões e nadadeiras sejam os tecidos mais utilizados, especialmente o tecido da nadadeira, pela sua alta capacidade regenerativa (Fryer e Lannan 1994). Essas foram propagadas usando meios e técnicas adaptadas que já foram desenvolvidas para células de mamíferos, com ajustes nas condições de cultivos, principalmente na temperatura de incubação (Wolf e Quimby 1976).

Tendo em vista a diversidade de espécies de peixes, a cultura de células ainda é pouco utilizada como ferramenta em estudos citogenéticos (Amemiya et al. 1984; Bejar et al. 1997; Zhang et al. 1998; Wang et al. 2012; Romanenko et al. 2015), principalmente pela dificuldade de padronização da técnica de isolamento e manutenção de culturas celulares. Por outro lado, essa metodologia tem se apresentado como uma excelente alternativa para obter preparações cromossômicas de qualidade e pode ser aplicada em estudos citogenéticos de espécimes de pequeno e grande porte, nas quais a aplicação dos protocolos comuns de preparação cromossômica não pode ser diretamente utilizada, ou ainda em espécies utilizadas em aquicultura ou ameaçadas de extinção, quando não há possibilidade de sacrifício dos animais (Amemiya et al. 1984). Outro ponto relevante para o uso de cultura de células como ferramenta para a citogenética, é que ela proporciona a montagem de um banco de células vivas, disponíveis a qualquer momento, sendo possível acessá-las sempre que alguma metodologia precise ser repetida, o que dispensa a ida ao campo para coletar novos espécimes.

2. Objetivos

2.1. Objetivo principal

O presente estudo teve como objetivo o desenvolvimento de uma metodologia de cultura de células aderentes para obtenção de cromossomos mitóticos em peixes

neotropicais, estabelecendo linhagens celulares de diferentes espécies e a determinação de suas características citogenéticas.

2.2. Objetivos Específicos

- Isolar e manter culturas primárias de células de fibroblasto de peixes de água doce;
- Estabelecer as linhagens celulares dessas espécies;
- Determinar a estrutura cromossômica dessas linhagens;
- Testar marcadores citomoleculares nos cromossomos dessas espécies;
- Criopreservar as linhagens de células obtidas.
- Obter cultivos celulares de linhagens criopreservadas.

3. Material e Métodos

3.1 Material

3.1.1 Espécies estudadas e locais de coleta

Foram analisadas seis espécies de peixes neotropicais da ordem Characiformes (Tabela 1). Para preparação das culturas primárias, pequenos fragmentos de tecido muscular de cada indivíduo foram retirados. Alguns animais foram coletados de acordo com as leis ambientais brasileiras, conforme permissão de coleta emitida pelo MMA/IBAMA/SISBIO de número 13843-1, enquanto outros animais foram doados pelo Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP), Jaboticabal-SP. Os procedimentos de coleta, manutenção e análise dos animais foram realizados de acordo com o regulamento internacional de experimentos com animais, seguindo pela Universidade Estadual Paulista (CEEAA/IBB/UNESP número de protocolo 1001-CEUA).

TABELA 1: Espécies de peixes Neotropicais analisadas neste estudo, número de indivíduos (N), sexo - ♀ para fêmeas, ♂ para machos, NI não identificado, local de coleta.

Ordem	Família	Espécie	N	Sexo	Tecido	Localidade
Characiformes	Characidae	<i>Astyanax altiparanae</i>	3	2♀;1♂	Músculo	Rio Jararaca, Bacia Parapapanema
		<i>Astyanax paranae</i>	7	2♀;2♂; 3NI	Músculo	Rio Cascatinha, Bacia do Tietê
		<i>Astyanax bockmanni</i>	1	NI	Músculo	Rio Jararaca, Bacia Parapapanema
	Anostomidae	<i>Megaleporinus macrocephalus</i>	12	5♀7♂	Músculo	CAUNESP, Jaboticabal
	Serrasalminidae	<i>Piaractus mesopotamicus</i>	6	NI	Músculo	CAUNESP, Jaboticabal
		<i>Colossoma macropomum</i>	9	NI	Músculo	CAUNESP, Jaboticabal

3.2 Métodos

3.2.1 Obtenção da cultura primária e desenvolvimento das linhagens celulares

Para obtenção das culturas primárias e desenvolvimento das linhagens celulares foi utilizada uma técnica desenvolvida no presente estudo e implementada no Laboratório de Biologia e Genética de Peixes. Essa metodologia envolve, basicamente, a coleta do tecido e preparação, cultivo das células (monocamadas) em meio de crescimento e subcultivos.

Os peixes sofreram eutanásia por imersão em água gelada (2°C) por 5 minutos, em seguida, foram mergulhados em álcool 70% (v/v) por 1 minuto. Após esses procedimentos, fragmentos de tecidos (músculo ou nadadeira) foram retirados com o auxílio de material cirúrgico devidamente esterilizado. Esses fragmentos foram lavados em uma solução de hipoclorito 0,4% (v/v) por 30 segundos, posteriormente em álcool 70% por 30 segundos e, por fim, em uma solução salina tamponada com sais de fosfato (PBS) com antibióticos (100U/ml de penicilina e 100 µg/ml estreptomicina) e antimicóticos (2.5 µg/ml anfotericina B). Os tecidos foram fragmentados (média de 1mm³ cada pedaço) em placas de petri com auxílio de lâminas de bisturi estéril e meio essencial mínimo modificado por Dulbecco (DMEM), suplementados com antibióticos (100U/ml de penicilina e 100µg/ml estreptomicina) e antimicótico (2.5 µg/ml anfotericina). Este meio foi chamado de meio basal.

Os fragmentos dos tecidos foram colocados em tubo falcon (15 ml) estéril com 5ml de meio basal e centrifugados a 500g por 10 minutos. Após, o sobrenadante foi descartado e um novo meio basal adicionado. Os tubos com os fragmentos dos tecidos foram agitados manualmente cinco vezes e novamente centrifugados.

Após o descarte do sobrenadante, 5 a 10 ml de uma solução de collagenase (0,4 mg/ml) foi adicionada aos frascos e mantidas na incubadora com agitação orbital de 90rpm a 27,5 °C, e por um tempo de digestão de 60 a 90 minutos. Quando finalizada a digestão, o material foi centrifugado e lavado em meio basal para retirada da solução de collagenase.

Uma nova digestão foi realizada, dessa vez usando uma solução de tripsina 0,25% previamente aquecida a 37°C. Foram adicionados aos tubos 10 a 20 ml desta solução, com pipetagens sucessivas, durante 20 minutos. Após a segunda digestão, a suspensão obtida da tripsinização foi colocada em novos

tubos falcon com meio completo (meio basal suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB)).

A suspensão celular foi centrifugada e o “pellet” resultante foi re-suspendido em meio completo. As células foram semeadas uniformemente em placas de seis poços, ou placas de 12 poços ou frascos 25 cm³ dependendo do tamanho do “pellet” resultante. Tanto as placas quanto os frascos foram tratados previamente com gelatina 0,1% para favorecer a adesão celular. De 500µl a 2ml da solução de gelatina foi adicionada a superfície do frasco e, então deixadas na incubadora por um tempo de 2 horas. Após, os frascos foram retirados da incubadora e o excesso da gelatina foi removida com auxílio de uma pipeta e apenas um filme de gelatina foi formado.

As culturas obtidas foram incubadas a 27,5±2,0°C, 5%CO₂ com meio completo. O crescimento das células foi acompanhado diariamente em microscópio invertido e a troca do meio de manutenção foi realizada após adesão das células aos frascos e em intervalos de 1 a 2 dias dependendo do crescimento celular observado ou pela mudança da coloração deste meio. Quando havia um consumo maior do meio pelas células, a troca do meio foi total, já nas outras culturas essa troca foi parcial, ou seja, 50% do meio foi removido do frasco e adicionado novo meio na mesma proporção.

Quando 80% da placa ou frasco de cultura se encontrava coberto por células (confluência celular) foram realizados subcultivos (passagem), em que foram removidos os meios das placas ou frascos. Posteriormente, as placas foram lavadas com solução de PBS e adicionado 1 a 3 ml de tripsina aquecida a 37°C. Estas foram colocadas na incubadora por no máximo 10 minutos até que todas as células se desgrudassem do fundo. Então, foi adicionado meio completo na mesma proporção para a inativação da tripsina. Algumas vezes, quando as células não se desgrudavam totalmente, o mesmo procedimento era repetido com mesmo volume e tempo de tripsinização.

As células tripsinizadas foram centrifugadas e o “pellet” resultante foi re-suspendido em 1 ml de meio completo. Então, as células foram distribuídas em novos frascos e incubadas novamente em 27,5±2,0°C, 5%CO₂ e, posteriormente um dos frascos foram utilizados obtenção dos cromossomos mitóticos e outro para criopreservação das células.

3.2.2 Criopreservação e teste viabilidade celular

Para criação de um banco de células das linhagens de fibroblastos com o mínimo efeito deletério na sua estrutura e funcionalidade as células foram conservadas a temperatura criogênica.

Quando as culturas alcançaram 80% de confluência celular, as células foram tripsinizadas e, então o “pellet” resultante foi suspenso em meio crioprotetor (10% DMSO, 90% SFB, 1% antibióticos e 1% antimicóticos) em uma concentração final de 5×10^5 a $3,0 \times 10^6$ células/ml. Os criotubos foram colocados dentro de suporte de congelamento (“Mrs. Froster”, Nalgene) com isopropanol e, então foram levados ao freezer -80°C *overnight* para que acontecesse o congelamento gradual de $1^\circ\text{C}/\text{min}$. Após o período, os criotubos foram retirados deste suporte e armazenados em caixas de papel no freezer -80°C até o momento do descongelamento.

Para o descongelamento foi utilizado uma a duas amostras de cada espécie em passagens diferentes. Os criotubos contendo as células foram parcialmente mergulhados em banho-maria a 37°C com leve agitação até que uma pequena pedra de gelo se formasse. Então, o conteúdo do criotubo foi adicionado a um tubo falcon estéril contendo meio completo aquecido e, posteriormente, a suspensão celular foi centrifugada e sobrenadante descartado. O “pellet” foi re-suspenso em meio completo e a suspensão resultante foi distribuída em novos frascos e levados a incubadora sobre as mesmas condições do cultivo inicial.

Para estimar o número de células viáveis e a concentração celular antes e após o descongelamento foi realizada a contagem das células no hemocítômetro (câmara de Neubauer) com o ensaio de exclusão com o corante azul de Trypan. Este corante fornece informações sobre a integridade da membrana celular, uma vez que células viáveis tem a capacidade de excluir o corante pela membrana.

Assim, alíquotas de $10\mu\text{l}$ de cada suspensão celular foram feitas, e então foi adicionado na mesma proporção o corante azul de Trypan e as amostras foram homogeneizadas. Posteriormente, somente $10\mu\text{l}$ deste mix foram colocadas na câmara de Neubauer e observadas em microscópio invertido na objetiva de 10x para a contagem das células. Somente as células que ocupavam os quatro quadrantes externos da câmara de Neubauer foram contadas e a concentração celular foi estimada pela seguinte equação:

$\text{Número de células/ml} = \text{média de células dos quatro quadrantes} \times 10^4 \times \text{fator de diluição}$

Enquanto, a viabilidade das amostras foi estimada pela proporção entre o número de células vivas e total de células (vivas e mortas), como na equação abaixo:

$\text{Viabilidade celular} = \frac{\text{Número de células vivas}}{\text{Nº de células vivas} + \text{Nº células mortas}} \times 100$
--

3.2.3 Análise de apoptose e necrose

Um criotubo de cada amostra foi utilizado para avaliar o processo de morte programada após o processo de criopreservação. As amostras foram descongeladas em banho maria a 37°C como descrito no item anterior e o “pellet” re-suspendido em meio DMEM sem adição de antibióticos e soro fetal bovino. Então, duas amostras controle foram organizadas num tubo de citometria. No primeiro controle foram adicionados 250 µl da suspensão celular + 5 µl de anexina e no segundo controle apenas 250 µl da suspensão celular. Já as amostras teste foram colocadas 500µl da suspensão celular+ 5 µl hoestch + 5 µl anexina + 5 µl iodeto de propídeo. As amostras foram incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente, e em seguida as leituras das amostras foi realizada no Citômetro de Fluxo (LSR Fortessa, BD Biosciences, EUA) na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu, SP e as análises no *software* FACSDiva™ (BD Biosciences, EUA).

Os resultados obtidos foram interpretados como descritos por Ranera et al. (2012). Células viáveis apresentam marcações negativas para anexina (AN) e iodeto de propídeo (PI), enquanto células em apoptose inicial apresenta marcação positiva para AN e negativa para PI. Já células em necrose exibem marcação negativa para AN e positiva para PI e células em apoptose tardia mostra marcação positiva para ambos.

3.2.4 Obtenção de cromossomos mitóticos

Para obtenção dos cromossomos mitóticos foi utilizada a metodologia descrita por Foresti et al. (1993) adaptada para cultura de células de fibroblastos. A metodologia envolve basicamente, a inibição da polimerização

dos microtúbulos pela colchicina, a hipotonização das células em suspensão e a fixação celular pela mistura de metanol/ácido acético.

As culturas celulares subcultivadas foram monitoradas diariamente até que o crescimento celular atingisse 70% de confluência. Então, 100µl de solução aquosa de 0,0016% de colchicina foi adicionada aos frascos por um período de 3 a 4 horas. Após esse período, as células foram desgrudadas da superfície dos frascos pelo tratamento de tripsina e colocadas em tubos falcon. A suspensão celular foi centrifugada a 500g por 10 minutos e o sobrenadante descartado.

O “pellet” resultante foi homogeneizado em 5 ml de solução hipotônica pré (KCl 0,075M) e mantidos a 37°C por 15 minutos. Após a incubação, foram adicionadas 5 gotas de fixador (3 Metanol:1 Ácido acético) recém preparado gelado e o material foi homogeneizado com uma pipeta e deixado repousar durante 5 minutos. Então, foi adicionado mais fixador até completar o volume de 8 ml. A suspensão celular foi novamente homogeneizada e centrifugada a 500g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e um novo fixador (5ml) foi adicionado e homogeneizado. Esse passo foi repetido mais duas vezes. Após a última centrifugação, foi adicionado de 200 a 500 µl de fixador dependendo da densidade de células resultantes. Os tubos com as células foram mantidos em freezer (-20°C).

Uma gota da suspensão celular (15 µl) foi colocada sobre lâminas limpas apoiadas dentro de um banho quente a 60°C. Essas lâminas foram coradas com Giemsa 5% em tampão fosfato (pH=6.8) por 8 minutos.

3.2.5 Análise de dados citogenéticos

As preparações cromossômicas foram analisadas em fotomicroscópio (Olympus BX61) e, as melhores metáfases foram capturadas com o *software* Image Pro Plus, 6.0 (MediaCybernetics) e o número de cromossomos contados com auxílio do *software* Adobe Photoshop CS4 versão 11.0, usando a ferramenta “*count tool*” para estabelecimento do número modal.

3.3 Hibridação *in situ* fluorescente (FISH)

A aplicação da técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) foi realizada com base em procedimentos adotados por Pinkel et al. (1986), com modificações implementadas pelo Laboratório de Biologia e Genética de Peixes do Departamento de Morfologia IB/UNESP.

As sondas dos genes DNAr 5S, DNAr 18S, snRNA U2, snRNA U1 foram mapeadas nas espécies de *Colossoma macroponum* e *Piaractus mesopotamicus*. A sonda dos genes DNAr 5S e DNAr 18S foram utilizadas como controle, visto que essas vem sendo amplamente utilizadas em peixes. A escolha das espécies para testar esses marcadores se deu pelo fato de não existir dados de mapeamento cromossômicos disponíveis para esses genes nessas espécies e a possibilidade de utilizar esses marcadores futuramente em estudos voltados para aquicultura.

O procedimento da técnica é dividido em etapas. A primeira etapa consiste em tratar as lâminas com RNase, pepsina e formaldeído. No tratamento com RNase, as lâminas foram lavadas com PBS (1X) por 5 minutos e desidratadas em série alcoólica 70%, 85% e 100% a -20°C por 3 minutos cada. Posteriormente, as lâminas foram tratadas com 80 µl de solução de RNase 0,5% (em 2xSSC) por 1 hora em câmara úmida a 37°C. Após, as lâminas foram lavadas duas vezes em 2xSSC por 5 minutos cada e uma vez em PBS (1X) por 5 minutos. Para o tratamento com pepsina, as lâminas foram incubadas em uma solução de pepsina 0,005% (em 10mM HCl) por 10 minutos a 37°C e, em seguida, as lâminas foram lavadas com PBS (1X) por 5 minutos. Então, as lâminas foram fixadas pelo tratamento com formaldeído 1% (em PBS (1X) / 1X/MgCl₂ 50mM) por 10 minutos. Depois de fixadas, as lâminas foram lavadas em PBS (1X) por 5 minutos e desidratadas em série alcoólicas 70%, 85% e 100% a -20°C por 3 minutos cada.

As próximas etapas foram a pré-hibridização e hibridização. Na pré-hibridização, as lâminas foram incubadas em formamida 70% a 70°C para desnaturação do DNA cromossômico por 5 minutos. Após, as lâminas foram desidratadas em série alcoólica 70%, 85% e 100% a -20°C por 3 minutos cada. Simultaneamente a essa desnaturação, a solução de hibridização (concentração final: 10% de sulfato dextrano, 50% formamida, 2XSSC) contendo as sondas marcadas com biotina-dUTP e digoxigenina-dUTP (3 a 5µl) foram desnaturadas a 95°C por 10 minutos e imersas imediatamente no gelo. Na hibridização, a solução de hibridização foi colocada sobre as lâminas secas e essas foram cobertas com lamínulas limpas e mantidas em câmara úmida a 37°C *overnight*.

As etapas seguintes foram as lavagens de estringência e detecção dos sinais correspondentes. As lamínulas foram removidas das lâminas e lavadas

duas vezes em solução de formamida 15% (em 0,2XSSC) a 42°C por 10 minutos cada. Após, três lavagens em solução de 0,1XSSC a 60°C por 5 minutos cada, e uma lavagem em solução Tween 0,5% (em 0,4XSSC) por 5 minutos. Então, as lâminas foram incubadas em uma solução de tampão de bloqueio (5% Nonfat Dried Milk powder (NFDM) / 4xSSC) por 15 minutos e lavadas duas vezes em solução Tween por 5 minutos cada.

A detecção do sinal na sonda foi feita utilizando anticorpos (0,5 µl de antidigoxi-rodamina e 1,0 µl de avidina-FITC) com 100 µl de solução de tampão bloqueio colocados sobre a lâmina coberta com lamínula. As lâminas foram incubadas por uma hora em câmara úmida a 37°C. Após, as lâminas foram lavadas três vezes em solução do Tween e desidratadas em série alcoólica 70%, 85% e 100% a -20°C por 3 minutos cada.

Após a secagem, as lâminas foram coradas com meio de montagem Vectashield com DAPI (Vector, EUA) e analisadas em fotomicroscópio óptico de fluorescência (Olympus BX61) e as imagens capturadas usando o software Image Pro Plus 6.0 (MediaCybernetics).

4. Resultados e Discussão

Os resultados obtidos no presente estudo e sua discussão estão organizados na forma de três capítulos, os quais correspondem aos artigos científicos que serão submetidos após a defesa da tese.

Capítulo 1: Novo protocolo de cultura de células para obtenção de cromossomos mitóticos em peixes.

Capítulo 2: Banco de linhagens celulares de peixes neotropicais para estudos citogenéticos.

Capítulo 3: Mapeamento cromossômico de sequências de DNA repetitivos em linhagens celulares de espécies da família Serrasalminidae Bleeker, 1859 (Characiformes).

Capítulo 1: Novo protocolo de cultura de células para obtenção de cromossomos mitóticos em peixes

Resumo

A cultura de células é uma excelente alternativa para obter preparações cromossômicas de qualidade. No entanto, esta metodologia ainda é pouco explorada para a obtenção de preparações cromossômicas de peixes neotropicais, principalmente pela dificuldade de padronização da técnica de isolamento e manutenção das culturas celulares. Aqui, descrevermos um protocolo para obtenção de cromossomos mitóticos para realização de estudos citogenéticos a partir de cultura de células provenientes de tecido muscular de *Astyanax altiparanae*. Nossa técnica está baseada no uso de um filme, à base de gelatina, que proporciona melhor aderência de um grande número de células e condições para sua adequada multiplicação. As células, com morfologia de fibroblastos, isoladas do músculo de *A. altiparanae* apresentaram rápida proliferação celular, resultando em culturas celulares bastante volumosas. A coleta das células em divisão para realização de preparações cromossômicas e as figuras metafásicas obtidas a partir dessas culturas apresentaram o número diplóide da espécie, $2n=50$ cromossomos em 80% das células estudadas, com cromossomos íntegros e distendidos. Algumas populações celulares foram criopreservadas e depois de restabelecidas essas células mantiveram a sua capacidade proliferativa. O desenvolvimento desse protocolo representa uma inovação para área da citogenética de peixes Neotropicais e deverá trazer expressiva contribuição para o estudo de grupos ainda poucos explorados devido à dificuldade de obtenção de preparações cromossômicas de boa qualidade.

Palavras-chave: Cultivo de células, criopreservação, citogenética de peixes, cromossomos, mitose.

Introdução

Nos últimos anos, o desenvolvimento de novas metodologias para culturas de células de peixes tem crescido e boa parte delas foram adaptadas a partir das metodologias desenvolvidas para culturas de células de mamíferos. Em geral, essas metodologias utilizam de um pequeno de fragmento de tecido dissociado para isolar as células e posteriormente cultivar as células em substrato aderente (Amemiya et al. 1984; Bejar et al. 1997; Sobhana et al. 2009; Wang et al. 2012), enquanto outras metodologias utilizam de enzimas proteolíticas para isolar as células do tecido (Zheng et al. 2012; Bain et al. 2013; Graf et al. 2013; Kim et al. 2014; Fu et al. 2015). Além disso, algumas dessas metodologias tem utilizado de substrato artificial para otimizar e estabelecer culturas de difícil adesão (Graf et al. 2013; Kim et al. 2014).

De fato o grande número de metodologias publicadas para essa técnica se deve ao um enorme potencial de aplicação em diversas áreas, como biotecnologia e aquicultura (Bols e Lee 1991; Zhang et al. 1998; Villena 2003), toxicologia (Babich e Borenfreund 1991; Fent 2001), imunologia (Nicholson et al. 1987; Chi et al. 1999), proteção de espécies (Sobhana et al. 2009; Chen e Qin 2011; Wang et al. 2012) e citogenética (Romanenko et al. 2015). Embora a cultura de células tenha se apresentado como uma excelente alternativa para obter preparações cromossômicas de qualidade, esta tecnologia ainda é pouco explorada para a obtenção de preparações cromossômicas em peixes, principalmente pela dificuldade de padronização da técnica de isolamento e manutenção de culturas celulares.

As vantagens da sua aplicação têm se apresentado bastante amplas, tais como em estudos citogenéticos de espécimes de pequeno e grande porte, nas quais a aplicação dos protocolos comuns de preparação cromossômica não pode ser diretamente utilizada; no estudo de espécies utilizadas em aquicultura ou ameaçadas de extinção, quando não há possibilidade de sacrifício dos animais; ou ainda pode ser aplicada também na realização de testes com agentes mutagênicos ou cancerígenos, sem a necessidade de sacrifício desnecessário de um grande número de animais (Amemiya et al. 1984).

Outra vantagem é que esta metodologia pode propiciar o estabelecimento de um banco de células disponível a qualquer momento e,

desta forma, em caso da repetição de metodologias citogenéticas, não é necessário voltar a campo em busca de novos espécimes. Tendo em vista as possíveis vantagens desta metodologia, o objetivo deste estudo foi desenvolver um protocolo da técnica de cultivo de células de peixe com aplicação direta na obtenção de cromossomos mitóticos para realização de estudos citogenéticos. Para isso foi utilizada a espécie *Astyanax altiparanae* (Characiformes) como modelo, uma vez que esta espécie tem sido objeto de diferentes tipos de estudos citogenéticos (Yano et al. 2014; Fernandes et al. 2014; Martinez et al. 2012; Neto et al. 2009; Domingues et al. 2007).

Material e métodos

Preparação do tecido e isolamento das células

Três espécimes de *Astyanax altiparanae* (3 a 5 cm) provenientes do córrego da Jararaca, componente da bacia do Rio Paranapanema, São Paulo, Brasil, foram utilizadas para obtenção dos cultivos primários a partir de amostras de tecido muscular. Os peixes foram eutanasiados por imersão em água gelada (Blessing et al. 2010) e desinfetados em etanol 70% (v/v) por 1 minuto, e após esses procedimentos, o tecido muscular foi removido assepticamente utilizando material cirúrgico devidamente esterilizado.

Os fragmentos dos tecidos foram lavados em solução de hipoclorito de sódio 0,4% (v/v) e etanol 70% por 30 segundos cada e por fim em uma solução salina tamponada com sais de fosfato (PBS) com antibióticos (100U/ml de penicilina e 100 µg/ml estreptomicina) e antimicóticos (2.5 µg/ml anfotericina B). Posteriormente, os fragmentos de tecido foram dissociados em placas de petri com auxílio de lâminas de bisturi estéril (média de 1mm³ cada pedaço) em meio essencial mínimo modificado por Dulbecco (DMEM), suplementados com antibióticos (100U/ml de penicilina e 100µg/ml estreptomicina) e antimicótico (2.5 µg/ml anfotericina). Este meio foi chamado de meio basal.

Os fragmentos dos tecidos foram centrifugados a 500g por 10 minutos e após, o sobrenadante foi descartado. Esse procedimento foi repetido mais uma vez. Então, 5 a 10 ml de uma solução de collagenase (0,4mg/ml) foi adicionada aos frascos e mantidos na incubadora com agitação orbital a 27,5°C e 90rpm por um tempo de 30 a 90 minutos. Quando finalizada a digestão, o material foi centrifugado e lavado em meio basal para retirada da solução de collagenase.

Posteriormente, 10 a 20 ml de solução de tripsina 0,25% aquecida a 37°C foram adicionados ao “pellet” resultante e foi mantido por 20 minutos à temperatura ambiente com pipetagens sucessivas. O sobrenadante resultante desta segunda digestão foi recolhido e ressuspendido em meio completo (meio basal suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB)) e centrifugado a 500g por 10 minutos.

Tratamento das placas e cultivos das células

As células isoladas foram cultivadas em placa de 12-well (Sarstedt, Alemanha) previamente tratadas com 500µl da solução de gelatina 0,1% (Thermofisher scientific, EUA). De 500µl a 2ml da solução de gelatina foi adicionada a superfície do frasco e, então deixadas na incubadora por um tempo aproximadamente de até 2 horas. Após, os frascos foram retirados da incubadora e o excesso da gelatina foi removida com auxílio de uma pipeta e apenas um filme de gelatina foi formado.

As culturas obtidas foram incubadas a 27,5°C em 5% de CO₂ e o meio de cultura foi trocado diariamente após a adesão. Quando as células cobriram quase 80% da placa (confluência celular), elas foram removidas das placas com tripsina, e então centrifugadas e distribuídas em dois novos frascos. Um frasco foi utilizado para obtenção das preparações cromossômicas e outro frasco para criopreservação das células.

Congelamento e descongelamento das células

Células da quarta até a sexta passagem foram utilizadas para criopreservação. As células foram cultivadas em frascos de T-75 cm³ (Sarstedt, Alemanha) e quando alcançaram aproximadamente 80% confluência foram desgrudadas da superfície do frasco usando o protocolo de subcultivos descrito acima. O “pellet.” resultante foi ressuspendido em meio de congelamento (10% Dimetilsulfóxido–DMSO, 90% de SFB, 1% antibióticos, 1% de antimicóticos) numa densidade celular de 10⁵ células/ml e transferido para criotubo estéril (Sarstedt, Alemanha). Os criotubos foram colocados em suporte de congelamento (“Mrs. Froster”, Nalgene) e depois no freezer -80°C *overnight* para o congelamento gradual de 1°C/minuto. Após o período, os criotubos

foram retirados deste suporte e, então estocados em caixas de papel no freezer -80°C até o momento do descongelamento.

Para o descongelamento, os criotubos contendo as células foram parcialmente mergulhados em banho-maria a 37°C. Então, o conteúdo do criotubo foi adicionado a um tubo falcon estéril contendo meio completo aquecido e centrifugado. O “pellet” foi suspenso em meio completo e distribuídos em novos frascos e levados a incubadora sobre as mesmas condições do cultivo inicial. Para estimar o número de células viáveis e a concentração celular antes e após o descongelamento foi realizada a contagem das células no hemocitômetro (câmara de Neubauer) com o corante azul de Trypan.

Cromossomos mitóticos

Um frasco (T-25 cm³ Sarstedt, Alemanha) foi utilizado para análise citogenética, às células musculares da terceira até a sexta passagem foram tratados com 100µl de solução de colchicina 0,0016% que foi adicionado ao frasco por um período de até 4 h. Posteriormente, as células da cultura foram tripsinizadas e centrifugadas à 500g por 10 minutos. Em seguida, as células foram tratadas com solução de cloreto de potássio (KCL) 0,075M durante 15 minutos a 37° C e fixadas com solução de Carnoy (metanol:ácido acético na proporção de 3:1). Após duas lavagens com Carnoy, as células em suspensão foram depositadas sobre lâminas e coradas com Giemsa 5% por 8 minutos para observação dos cromossomos.

Resultados e Discussão

As células isoladas do tecido muscular de *Astyanax altiparanae* apresentaram aderência à superfície de cultivo entre 24 e 48 horas e começaram a adquirir morfologia fibroblastóide com 72 horas de cultivo (Figura 1A). O protocolo de isolamento utilizado no presente estudo, baseado no uso de enzimas proteolíticas (colagenase e tripsina), demonstrou ser eficiente em estudos anteriores para isolar tecidos da pele e nadadeiras de peixes (Romanenko et al. 2015; Graf et al. 2013), coração (Wei et al. 2010; Kim et al. 2014), cérebro (Fu et al. 2015) e gônadas (Wei et al. 2014). A escolha da enzima depende do tipo de tecido alvo para isolamento das células, pois variáveis como concentração da enzima, temperatura e tempo de incubação

são fatores que precisam ser otimizados, dependendo do tecido a ser estudado. Assim, nossos resultados mostraram que o tempo de incubação do tecido varia de acordo com a quantidade de tecido retirado dos indivíduos.

As células isoladas apresentaram rápido crescimento, alcançando confluência celular em cultivo primário com 10 dias e nos subcultivos com 2 a 3 dias (Figura 1B e 1C). Este rápido crescimento foi atribuído ao uso de filme a base de gelatina, o qual possibilitou a aderência de um grande número de células e condições adequadas para a multiplicação celular. Muitas populações celulares precisam de substrato para adesão, proliferação e diferenciação, conforme apontado por Kim et al. (2014), Graf et al. (2013) e Alexander et al. (2010), entre outros. Neste sentido, o uso de filme a base de gelatina pode ser considerado um ótimo material de adesão e proliferação celular pela sua origem biológica derivada do colágeno e pela constituição de aminoácidos, principalmente prolina e hidroxiprolina (Kejing et al. 2010). De acordo com Kim et al. (2014), a ancoragem de uma grande densidade de células ao substrato irá permitir um contato célula-célula, garantindo a sobrevivência, proliferação e diferenciação celular na cultura.

Antes da aplicação deste filme de gelatina no cultivo de células, uma das dificuldades para padronização do protocolo de cultivo celular em peixes era a pobre adesão verificada de células ao substrato, o que levava a uma possível inibição da proliferação. A utilização da solução de gelatina 0,1% no tratamento das placas e frascos de cultivo permitiu melhor adesão, além de interações entre as células, proporcionando, assim, um crescimento rápido e adequado. De fato, a adesão celular é essencial para desenvolvimento e manutenção dos tecidos, com exceção das células hematopoiéticas, todas as células derivadas dos tecidos são dependentes de um substrato para sua ancoragem (Merten 2015; Khalili e Ahmad 2015).

Adicionalmente, outro aspecto importante no protocolo proposto foi a troca diária do meio de manutenção, o que possibilitou a renovação dos nutrientes necessários para o adequado crescimento celular. O meio de cultura é um dos fatores mais importantes no cultivo de células animais, sendo sua função proporcionar nutrientes, pH e osmolaridade apropriadas para sobrevivência e multiplicação das células (Freshney 2010). Aqui, o meio utilizado foi o DMEM alta glicose, suplementado com 10% de soro fetal bovino conforme proposto por Graf et al. (2013) e Wang et al. (2012). Embora alguns

cultivos de células de peixes utilizem o meio L-15 (Wei et al. 2014; Fu et al. 2015), nosso estudo mostrou que o DMEM alta glicose é muito satisfatório para o crescimento celular em peixes.

As células de *A. altiparanae* antes do congelamento apresentaram uma viabilidade de 98% e após o descongelamento essa viabilidade foi de 71%. Sabe-se que todos crioprotetores podem ter algum efeito danoso para células de peixes, sendo que a viabilidade e adesão das células após o descongelamento pode ser reduzida pela toxicidade do crioprotetor (Majeed et al. 2013; Wang et al. 2012; Yadav et al. 2012). Dimetilsulfóxido (DMSO) é a substância crioprotetora mais empregada no congelamento de células de peixes (Gignac et al. 2014; Majeed et al. 2013; Yadav et al. 2012; Wang et al. 2012), sendo a concentração de 5 a 10% mais recomendadas, essa última foi a utilizada para o congelamento das amostras em nosso estudo com sucesso.

As células cultivadas após o descongelamento adquiriram um formato fibroblástico após 72 horas e progressivamente algumas colônias puderam ser observadas após seis dias de cultivo (Figura 1D). Essas células apresentaram confluência celular após 18 dias (Figura 1E) e quando foram subcultivadas essas células ocuparam a superfície do frasco após quatro dias (Figura 1F). Células provenientes de criopreservação apresentam uma capacidade de proliferação mais lenta após o descongelamento, uma vez que essas células precisam sobreviver a estresse do congelamento e ainda se adaptar as condições de cultivos (Freshney 2010).

A análise citogenética das culturas de células obtidas de *A. altiparanae* antes e após descongelamento revelou um número modal diplóide de $2n=50$ cromossomos (Figura 2A e 2B) em 80% das células analisadas. Resultados semelhantes em nosso grupo de pesquisa (dados não publicados) foram obtidos utilizando a técnica de Foresti et al. (1993), fato que reforça novamente os nossos resultados nessas condições experimentais. Sabe-se que condições de estresse celular (e.g. congelamento e descongelamento das células) podem acarretar em aberrações cromossômicas, tais como mudanças na morfologia e número cromossômico (Rábová et al. 2015) fato que não foi observado nas células metafásicas de *A. altiparanae* e destaca as novas oportunidades que essa metodologia pode agregar para área da Citogenética.

Uma vez que os cromossomos obtidos por cultura são mais sensíveis ao tratamento hipotônico, foram testados diferentes períodos exposição à solução

hipotônica (KCL 0,075M), visando uma melhor qualidade das preparações quanto à dispersão e morfologia dos cromossomos. Neste sentido, os resultados obtidos com tratamento hipotônico de 15 minutos foram os mais adequados para o cultivo de células deste tecido nesta espécie, dentro de um intervalo de tempo testado de 10 a 30 minutos.

O sucesso da técnica de cultivo de células também depende da biologia da espécie ou grupo de organismos em estudo (Rabova et al. 2015). Neste sentido, a temperatura e condições de incubação das células são dependentes da temperatura corpórea do animal do qual as células foram isoladas. Para esse experimento verificou-se que a temperatura de 27,5°C e condições de incubação com 5% de CO₂ foram as condições mais adequadas, dentro de condições experimentais que variaram de 25 a 30°C e concentração fixa de CO₂.

Os resultados positivos da metodologia de isolamento e cultivo de células fibroblastóides de *A. altiparanae* utilizando digestão enzimática, seguindo do cultivo celular utilizando um filme a base de gelatina representam uma grande inovação para área de Citogenética de peixes neotropicais. Considera-se que a aplicação deste procedimento poderá reverter em expressiva contribuição nos estudos de grupos de peixes ainda poucos explorados citogeneticamente pela dificuldade de se obter preparações cromossômicas de boa qualidade que são cruciais para o sucesso de várias experiências.

Referências

As referências bibliográficas, citadas no presente estudo, se encontram reunidas no final desta tese.

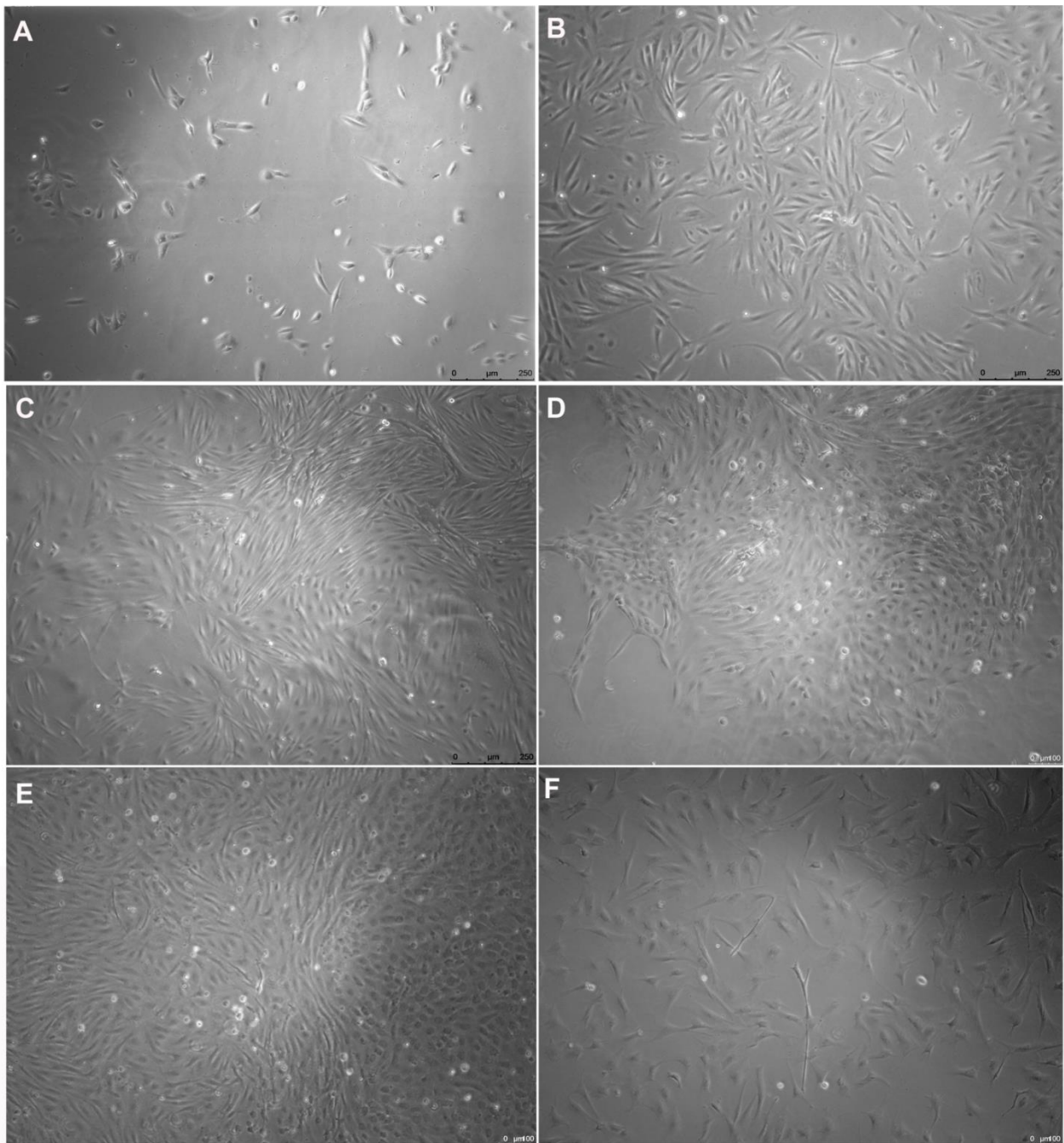


Figura 1: Morfologia fibroblastóide das células aderidas provenientes da digestão enzimática do tecido muscular de *Astyanax altiparanae* após 72 horas de cultivo (A). Essas células após 10 dias de cultivo apresentaram confluência celular superior a 80% (B) e quando subcultivadas apresentaram confluência em 48 e 72 horas de cultivo. Note as células fibroblastóides subcultivadas na terceira passagem após 72 horas (C). Em (D), colônias de células fibroblastóides na quarta passagem após seis dias pós- descongelamento. Essas células apresentaram confluência celular após 18 dias (E) e após subcultivadas essas células ocuparam a superfície do frasco em quatro dias. Note células pós-descongelamento na sexta passagem após 24 horas de subcultivadas (F). A barra em A, B e C 200µm e D, E e F 100µm em aumento de 10X.

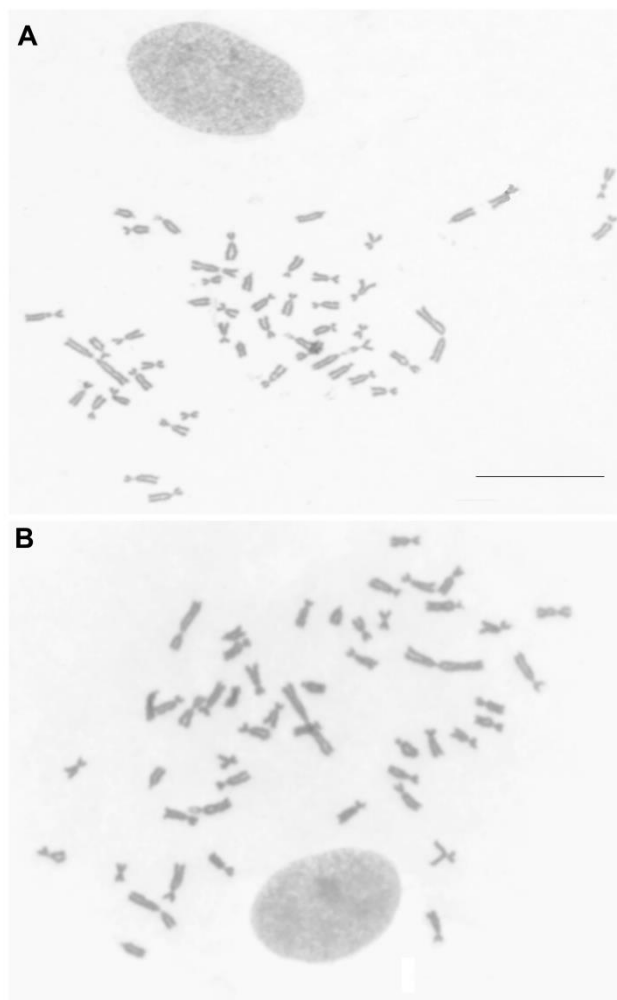


Figura 2: Cromossomos metafásicos obtidos de células fibroblastóides de *Astyanax altiparanae* na quarta passagem antes do congelamento (A) e na sexta passagem pós-descongelamento (B). A barra equivale a 20 μm .

Capítulo 2: Banco de linhagens celulares de peixes neotropicais para estudos citogenéticos

Resumo

Os peixes constituem um excelente modelo experimental para o desenvolvimento de linhagens de células e estão sendo usada em uma ampla variedade de estudos, entretanto, dentro da área da citogenética esse tipo de tecnologia ainda não é explorado. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo estabelecer linhagens celulares de seis espécies de peixes neotropicais para serem aplicadas em estudos citogenéticos. No total, foram estabelecidas 28 linhagens celulares de *Astyanax altiparanae*, *A. bockmanni*, *A. paranae*, *Megaleporinus macrocephalus*, *Colossoma macropomum* e *Piaractus mesopotamicus*. Essas linhagens tiveram viabilidade superior a 90% antes do congelamento e superior a 50% após o descongelamento. Apenas as linhagens de *C. macropomum* e *P. mesopotamicus* não recuperaram a sua capacidade proliferativa, com elevado número de células em necrose e apoptose tardia. Com a realização de técnicas para obtenção de cromossomos metafásicos, foi possível observar que os cromossomos mitóticos das linhagens das seis espécies se mantiveram íntegros e com morfologia definida. Não houve variação do número modal das espécies antes e após o processo de criopreservação. Entretanto, não foi possível obter cromossomos mitóticos após o descongelamento para as linhagens de *C. macropomum* e *P. mesopotamicus*. O desenvolvimento dessas linhagens não apenas se limita a estudos dentro da área da citogenética, mas também poderá abrir novas oportunidades para estudos em diversas áreas e podem contribuir grandemente para criação do primeiro banco de células de peixes neotropicais.

Palavras chaves: Cultura de células, criopreservação, Characiformes, mitose.

Introdução

Com a disseminada necessidade de substituição de animais pela estratégia dos 3Rs (*reduction, refinement e replacement*) (Doke e Dhawale 2015), o desenvolvimento de linhagens celulares é crescente. Esse desenvolvimento ocorreu principalmente pelo aprimoramento da técnica e pela utilização de linhagens celulares que podem ser propagadas por um maior período de tempo, tornando a tecnologia de cultura de células mais moderna e valiosa para estudar as funções e mecanismos de funcionamento de diferentes tipos de células, incluindo células de insetos, de humanos, de roedores e de outros animais (Oyeleye et al. 2016).

Atualmente, mais de 4000 linhagens celulares estão disponíveis no ATCC (American Type Culture Collection), destas, 150 linhagens são de células animais e de insetos (<https://www.atcc.org/>). Os peixes constituem um excelente modelo experimental para estudos no desenvolvimento de linhagens de células. De acordo com Wang et al. (2012) mais de 280 linhagens de células de fibroblastos de peixes estão atualmente disponíveis. A maioria foi estabelecida para espécies de peixes de água doce e peixes anádromos, sendo que muitas dessas linhagens foram desenvolvidas na Ásia (Lakra et al. 2011). Entretanto, a maior parte dessas linhagens não está disponível no catálogo da ATCC (<https://www.atcc.org/>).

Muitas linhagens de células têm sido estabelecidas e amplamente usadas em uma variedade de estudos, incluindo para detecção e isolamento de vírus (Chi et al. 1999; Fu et al. 2015), avaliar a citotoxicidade em poluentes aquáticos (Fent 2001; Taju et al. 2013; Dubey et al. 2015) (Fent 2001; Taju et al. 2013; Dubey et al. 2015), interação patógeno hospedeiro para elucidar questões relacionadas à imunidade inata (Jensen et al. 2013), mapeamento e expressão gênica (Wei et al. 2014; Mello et al. 2015; Kumar et al. 2016) e criação de bancos de germoplasma de peixes (Sobhana et al. 2009; Chen e Qin 2011; Wang et al. 2012).

A região Neotropical compreende da parte sul do México até a América do Sul e, abriga a mais rica e mais diversificada fauna de peixes do mundo. Estima-se que existam, para essa região, 5160 espécies de peixes de água doce descritas, alocadas em 739 gêneros, 69 famílias e 20 ordens, o que representa um terço de todos os peixes dulcícolas existentes no planeta (Reis et al. 2016). A maior parte dessa diversidade está agrupada dentro os

Characiformes e Siluriformes, mas há ainda lacunas de informações em muitos grupos de peixes (Albert e Reis 2011).

Toda essa diversidade tem sido objeto de estudo em diferentes áreas, entre elas, na Citogenética. Embora, o número de trabalhos citogenéticos seja crescente (Porto-Foresti et al. 2008; Hashimoto et al. 2009; Vicari et al. 2010; Tenório et al. 2013; Ramirez et al. 2017), o uso da tecnologia de linhagens celulares para estudos citogenéticos ainda é pouco explorada (Amemiya et al. 1984; Bejar et al. 1997; Zhang et al. 1998; Wang et al. 2012; Romanenko et al. 2015). Assim, o presente estudo teve como objetivo estabelecer linhagens celulares de seis espécies de peixes neotropicais para serem inicialmente aplicadas em estudos citogenéticos.

Material e Métodos

Material

Seis espécies de peixes neotropicais da ordem Characiformes foram utilizadas para estabelecimento e desenvolvimento das linhagens de células neste estudo. Três espécies pertencentes a família Characidae: *Astyanax altiparanae* (1♂;2♀) e *A. bockmanni* (1 não sexado) coletadas no Rio Jararaca, Bacia Paranapanema e a espécie *A. paranae* (3 não sexados;2♂;2♀) coletada no Rio Cascatinha, Bacia do Tietê com permissão de coleta (MMA/IBAMA/SISBIO nº 13843-1). Enquanto outras espécies foram doadas pelo Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP), Jaboticabal-SP: sendo uma espécie de Anostomidae (*Megaleporinus macrocephalus*, 7♂5♀) e duas espécies de Serrasalminidae (*Colossoma macropomum*, 9 não sexados e *Piaractus mesopotamicus*, 6 não sexados).

Estabelecimento das culturas primárias e linhagens celulares

O estabelecimento das culturas primárias e o desenvolvimento das linhagens celulares utilizou a metodologia descrita Paim et al. (em preparação – capítulo 1). Pequenos fragmentos de tecido muscular de cada indivíduo foram retirados para iniciar as culturas primárias. Esses fragmentos foram lavados, fragmentados mecanicamente em pequenos pedaços em média 1mm³

e digeridos enzimaticamente pela solução de collagenase (0,4mg/ml) de 60 a 90 minutos.

Então, uma segunda digestão foi realizada usando uma solução de tripsina 0,25% a 37°C durante 20 minutos e após esse procedimento a suspensão celular foi adicionada em meio completo e centrifugada. As células das espécies da família Characidae foram semeadas em placas de 12 ou 6 poços, enquanto as demais as células das outras espécies foram cultivadas em frascos de 25 cm³. As culturas obtidas foram incubadas a 27,5±2°C, 5%CO₂ com meio completo e a troca do meio foi realizada em intervalos de 1 a 2 dias.

Quando as células ocuparam 80% da placa ou frasco de cultura (confluência celular) foram realizados subcultivos (passagem). Após o subcultivo das culturas primárias, as linhagens celulares estabelecidas foram cultivadas em duplicatas. As culturas que estavam nas placas foram transferidas para os frascos de 25 cm³, enquanto que as culturas que estavam nos frascos de 25 cm³ foram cultivadas em frascos de 75 cm³. Posteriormente, essas linhagens foram utilizadas para obtenção dos cromossomos mitóticos e para o congelamento das células.

Criopreservação das células

Células de diferentes passagens foram utilizadas para criopreservação seguindo a metodologia descrita Paim et al. (em preparação – capítulo 1). Para o congelamento, dois frascos de 25 cm³ ou um frasco de 75 cm³ com 80% de confluência celular foram tripsinizadas e a suspensão celular centrifugada. O “pellet” resultante foi suspenso em uma concentração final de 5 x 10⁵ a 3 x 10⁶ células/ml em meio crioprotetor (10% DMSO, 90% SFB, 1% antibióticos e 1% antimicóticos). Os criotubos foram colocados dentro de suporte de congelamento e deixados *overnight* no freezer -80°C. Após, os criotubos foram armazenados em caixas de papel no freezer -80°C até o momento do descongelamento.

Uma a duas amostras de cada espécie, de passagens diferentes, foi utilizada para o descongelamento. Os criotubos foram colocados em banho-maria a 37°C até que uma pequena pedra de gelo se formasse. Então, a suspensão celular foi transferida para um tubo de centrifuga com meio completo aquecido e centrifugados. Após, o “pellet” resultante foi suspenso

em meio completo e semeadas em novos frascos e levados a incubadora sobre as mesmas condições do cultivo inicial.

A avaliação da viabilidade celular foi realizada em um hemocítômetro com o ensaio de exclusão com o corante azul de Trypan nas amostras antes do congelamento e depois do descongelamento. Adicionalmente, as análises de apoptose e necrose foram realizadas nas amostras depois do descongelamento pela marcação de anexina V e iodeto de propídeo. As leituras das amostras foram realizadas no Citômetro de Fluxo na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu, SP.

Os resultados obtidos foram analisados como descritos por Ranera et al. (2012). Células viáveis apresentam marcações negativas para anexina (AN) e iodeto de propídeo (PI); 2) Células em apoptose inicial apresenta marcação positiva para AN e negativa para PI; 3) Células em necrose exibem marcação negativa para AN e positiva para PI e 4) Células em apoptose tardia/necrose mostra marcação positiva para ambos.

Cariotipagem das linhagens celulares

Linhagens celulares de diferentes passagens foram utilizadas para obtenção dos cromossomos mitóticos. Nas culturas subcultivadas com 70% de confluência foram adicionadas uma solução aquosa de 0,0016% de colchicina por um período de 3 a 4 horas. Após esse período, as células foram removidas da superfície dos frascos com tripsina e centrifugadas. O “pellet” resultante foi homogeneizado em uma solução hipotônica (KCl 0,075M) e incubados a 37°C por 15 minutos. Então, as células foram fixadas com 3 metanol:1 ácido acético e suspensão celular foi gotejada sobre lâminas e coradas com Giemsa 5% em tampão fosfato (pH=6.8) por 8 minutos.

Os cromossomos foram analisados em fotomicroscópio (Olympus BX61) e, as melhores metáfases foram capturadas com o *software* Image Pro Plus, 6.0 (MediaCybernetics) e o número de cromossomos contados com auxílio do *software* Adobe Photoshop CS4 versão 11.0, usando a ferramenta “*count tool*” em 50 células em metáfases.

Resultados

Estabelecimento das culturas primárias e linhagens celulares

Todas as culturas de células de tecido muscular começaram aderir à superfície do substrato entre 24 e 48 horas (Tabela 1) e apresentaram morfologia fibroblastóide.

As culturas primárias das espécies da família Characidae apresentaram características semelhantes quanto ao crescimento e morfologia celular (Figura 1, 2 e 3). Após adesão ao substrato de 24 e 48 horas, as células isoladas do tecido muscular de *Astyanax* cobriram toda a superfície dos frascos entre 10 e 12 dias. Quando as células foram subcultivadas elas apresentaram confluências entre dois e três dias. As células dessas espécies após o descongelamento mantiveram comportamentos semelhantes (Tabela 1) e ocuparam a superfície dos frascos de 12 a 18 dias e quando subcultivadas entre três e quatro dias. As culturas de células de *A. altiparanae* foram subcultivadas até a oitava passagem, enquanto as culturas de células *A. bockmanni* até a sétima passagem. Já as culturas de células de *Astyanax paranae* foram cultivadas até quinta passagem.

As culturas de células primárias de *Megaleporinus macrocephalus* (Figura 4) exibiram um crescimento celular rápido quando comparada com outras culturas. As células apresentaram adesão e começaram a adquirir morfologia fibroblastóide após 24 horas e em 72 horas de cultivos essas células já ocupavam quase toda a superfície dos frascos. Após subcultivadas, essas células atingiram 80% de confluência celular entre 24 e 48 horas. Quando essas células foram restabelecidas após a criopreservação apresentaram confluência após 10 dias e em três dias depois de subcultivadas (Figura 4).

Outros cultivos das espécies *Colossoma macropomum* e *Piaractus mesopotamicus* revelaram resultados interessantes (Figuras 5 e 6). Para *C. macropomum* as culturas primárias apresentaram confluência celular em cinco dias e entre três e quatro dias cobriram a superfície dos frascos quando foram subcultivadas. Já as células de *P. mesopotamicus* exibiram crescimento igual ao número de dias de confluência de *C. macropomum*. Entretanto, ambas as culturas de células de *C. macropomum* e *P. mesopotamicus* não se

recompuseram depois de descongeladas, indicando uma possível morte celular (Ver resultados da criopreservação).

Criopreservação das células

Ao todo 28 linhagens celulares foram estabelecidas para as espécies aqui estudadas (Tabela 2).

As linhagens celulares de *A. paranae* foram congeladas na segunda e terceira passagem com número de células congeladas variando de $8,50 \times 10^5$ a $3,37 \times 10^6$ células e com viabilidade de 94% a 99%. Depois de descongeladas, essas amostras apresentaram uma viabilidade de 68% a 70% pela técnica de exclusão do Azul de trypan. As linhagens de *A. altiparanae* foram congeladas na passagem quinta e sexta com viabilidade de 87% a 98% e número de células entre $1,01 \times 10^6$ a $2,18 \times 10^6$. Quando essas células foram restabelecidas depois de congeladas, a sua viabilidade foi de 70%. Para *A. bockmanni* as células foram congeladas na quinta passagem e o número de célula foi $1,69 \times 10^6$ células e viabilidade de 98% e depois de descongeladas apresentaram uma viabilidade de 75% (Tabela 2).

O número de células congeladas para *M. macrocephalus* variou de $5,00 \times 10^5$ a $3,02 \times 10^6$ com viabilidade de 93% a 99%. Quase todas as amostras de células de *M. macrocephalus* foram congeladas na primeira passagem, apenas uma amostra foi congelada na terceira. Essas células quando foram descongeladas tiveram uma viabilidade de 57% a 65% (Tabela 2).

Ambas as linhagens de *C. macropomum* e *P. mesopotamicus* foram congeladas na primeira passagem. O número de células congeladas para *C. macropomum* foi de $5,00 \times 10^5$ a $3,95 \times 10^6$ com viabilidade de 92% a 98%. Já as amostras de *P. mesopotamicus* tiveram uma viabilidade de 95% a 96% para $2,87 \times 10^6$ a $2,90 \times 10^6$ células congeladas (Tabela 2). Entretanto, as viabilidades das células dessas duas espécies foram inferiores a 50% (Tabela 2). As análises de viabilidades, apoptose e necrose no citômetro para todas as espécies revelaram taxas de células viáveis superiores a 50% (Tabela 3). Já as linhagens de *P. mesopotamicus* apresentaram as menores taxas de apoptose inicial 6,2%, contrapondo as linhagens de *C. macropomum* que foi de 23,7%. As taxas de necrose foram maiores nas linhagens das espécies *M. macrocephalus* com 13,1% e *P. mesopotamicus* com 15,6%. A taxa de células

em apoptose tardia teve os maiores valores nas linhagens de *A. altiparanae* (Tabela 3).

Cariotipagem das linhagens celulares

As preparações cromossômicas das linhagens celulares de *Astyanax altiparanae*, *A. bockmanni* e *A. paranae* foram obtidas de diferentes passagens e o número modal observado nas 50 células em metáfases analisadas é semelhante ao grupo de origem dessas espécies, ou seja, $2n=50$ cromossomos e sem a presença de cromossomos supranumerários (Figura 1, 2 e 3).

Para *A. bockmanni*, 82% das metáfases revelaram o número modal de $2n=50$ cromossomos, com metacêntricos, submetacêntricos, subtelocêntricos e acrocêntricos. Já em *A. paranae* 86% das metáfases das células analisadas tinham o número modal da espécie, enquanto em *A. altiparanae* 80% das metáfases das células tinham número diploide de 50 cromossomos. Os valores do número modal das espécies foram mantidos nas células metafásicas após o período de criopreservação.

A análise citogenética das linhagens celulares de *Megaleporinus macrocephalus* foi realizada na primeira e segunda passagem e revelou um número modal de $2n=54$ cromossomos em 80% das metáfases analisadas, com a presença de cromossomos sexuais ZZ/ZW (Figura 4C e 4F). As células metafásicas das linhagens celulares de *Colossoma macropomum* e *Piaractus mesopotamicus* foram analisadas na primeira passagem (Figura 5C e 5F) com número modal de $2n=54$ cromossomos para 76% das metáfases analisadas em *C. macropomum* e 70% das metáfases em *P. mesopotamicus*.

Todas as espécies aqui estudadas mantiveram o número modal após o restabelecimento das culturas depois do descongelamento e sucessivas passagens.

Discussão

Até o momento, este é primeiro estudo desenvolvido na América Latina para estabelecer linhagens celulares em peixes neotropicais para estudos citogenéticos. Dados publicados por Wang et al. (2012) relatam que, no mundo,

existem mais de 280 linhagens celulares de peixes, sendo a maioria desses estudos realizados em *Cyprinus carpio* (Lakra et al. 2010), *Catla catla* (Taju et al. 2013), *Danio rerio* (Kumar et al. 2016) e algumas para espécies de interesse comercial como *Acipenser* spp. (Kim et al. 2014) e *Salmo* spp. (Pham et al. 2016), contudo esse número deve ser maior com as recentes publicações para outras espécies como *Gadus morhua* (Jensen et al. 2013), *Nothobranchius furzeri* (Graf et al. 2013; Gignac et al. 2014), *Horabagrus brachysoma* (Swaminathan et al. 2016) e *Carassius auratus* (Jing et al. 2017).

Essas linhagens têm sido ferramentas úteis e essenciais no desenvolvimento de pesquisas com diferentes propósitos, como por exemplo, para detecção e isolamento de vírus (Chi et al. 1999; Fu et al. 2015), para avaliar a citotoxicidade de poluentes aquáticos (Fent 2001; Taju et al. 2013; Dubey et al. 2015), estudar a interação patógeno hospedeiro para elucidar questões relacionadas à imunidade inata (Jensen et al. 2013), para mapeamento e expressão gênica (Wei et al. 2014; Mello et al. 2015; Kumar et al. 2016) e para criação de bancos de germoplasma de peixes (Sobhana et al. 2009; Chen e Qin 2011; Wang et al. 2012). No entanto, ainda existe a necessidade de estabelecer novas linhagens de outras espécies, já que alguns desses estudos demonstram que cultivos de células de peixes são espécies específicas, diferente do observado em mamíferos. Além disso, o uso de linhagens possibilita a realização de experimentos mais controlados e podem reduzir significativamente do uso de animais em laboratório (Morcill et al. 2017).

As células isoladas de todas as espécies no presente estudo apresentaram adesão e morfologia semelhantes. Segundo Junqueira e Carneiro (2013) durante a diferenciação celular se observa uma sequência de modificações bioquímicas, morfológicas e funcionais que transformam uma célula indiferenciada em uma célula capaz de realizar algumas funções com grande eficiência. As células de *Astyanax altiparanae*, *A. bockmanni*, *A. paranae*, *Megaleporinus macrocephalus*, *Colossoma macropomum* e *Piaractus mesopotamicus* apresentaram crescimento bom (5 a 12 dias de confluência celular em cultivo primário), quando comparados outros cultivos outras espécie (dados não mostrados).

Algumas hipóteses para a diferença do crescimento nessas células podem ser levantadas. Uma delas seria que as células obtidas de indivíduos mais jovens ou em melhores condições fisiológicas das espécies facilitaria seu

crescimento em cultivo. Diferente das células de mamíferos, as células de peixes têm uma taxa metabólica e temperatura de incubação mais baixa, requerendo algumas ponderações durante o cultivo (Wolf e Quimby 1976). Sabe-se que existe uma redução da capacidade proliferativa das células nos tecidos adultos com aumento da idade uma vez que as células ao longo da sua vida reduzem progressivamente os telômeros e isso acaba induzindo um estresse que afeta a duplicação celular (Lorenzini e Maier 2016).

Outro fato que se observa nas culturas obtidas desse estudo é a presença marcante de células com morfologia fibroblastóide. O tecido usado para obtenção das culturas primárias (músculo) tem como característica a presença de células alongadas e com aspecto fusiforme, como os fibroblastos. Essas células se originam de células mesenquimais indiferenciadas e permanece toda sua vida no tecido (Junqueira e Carneiro 2013). Os fibroblastos são reconhecidos por apresentarem uma maior taxa de divisão celular que as células epiteliais. Durante um cultivo *in vitro*, essas células têm a capacidade de expandir numerosas vezes, mantendo seu potencial de crescimento e pluripotência (Bydlowski et al. 2009).

A criopreservação de linhagens celulares é necessária para armazenamento em longo prazo e pode contribuir na conservação da biodiversidade de importantes espécies (Yadav et al. 2012). Células das seis espécies utilizadas nesses estudos foram congeladas com o número de células viáveis superiores a 90%. Contudo, após o processo de descongelamento observa uma perda da viabilidade celular superior a 50% para todas as espécies possivelmente pelo estresse osmótico que ocorre durante processo de congelamento e descongelamento.

O grande desafio da criopreservação é superar a morte celular induzida pelo congelamento, principalmente devido à formação de gelo intracelular e estresse osmótico que pode levar a ruptura da membrana e subsequentemente necrose (Henry et al. 2013; Baust et al. 2000). O Dimetilsulfóxido (DMSO) é a substância crioprotetora utilizada para reduzir a formação de gelo e prevenir a morte celular durante o congelamento e é mais empregada no congelamento de células de peixes (Gignac et al. 2014; Majeed et al. 2013; Yadav et al. 2012; Wang et al. 2012), contudo pode ter efeito danoso para células.

A perda da viabilidade demonstrada pelos dados obtidos pela anexina V e iodeto de propídio revela que apesar das células dessas espécies tiveram

uma taxa de necrose e apoptose tardia/necrose de 25 a 35%, as células viáveis conseguem se recuperar após um período de crescimento lento, e depois de subcultivadas essas células voltam a ter uma boa taxa de proliferação, demonstrando sinais de sobrevivência mesmo após o processo de criopreservação. Contudo, nas espécies de *Colossoma macropomum* e *Piaractus mesopotamicus* essa recuperação das células após a criopreservação não foi possível observar pela pouca adesão células e sobrevivência.

De maneira geral, os estudos com linhagens de peixes utilizam apenas o ensaio de exclusão de Trypan, que estima a integridade da membrana, e esses resultados revelam uma redução de 50% até 70% nas linhagens de células de *Sparus aurata* (Bejar et al. 1997), *Tor tor* (Yadav et al. 2012), *Cyprinus carpio* (Lakra et al. 2010) e *Channa striatus* (Majeed et al. 2013) depois do processo de criopreservação. Nossos resultados para todas as linhagens desenvolvidas corroboram com os dados descritos para literatura.

Grande parte dos estudos citogenéticos de peixes utiliza as metodologias descritas por Bertollo et al. (1978), Foresti et al. (1981) e Foresti et al. (1993), contudo boa parte da biodiversidade ainda não foi acessada pela dificuldade em obter cromossomos de boa qualidade. O desenvolvimento dessa metodologia permitiu a obtenção de cromossomos de seis espécies com qualidade (morfologia definida e nítida dos cromossomos metáfasicos) e quantidade (número de metáfase por lâminas), abrindo novas oportunidades para estudos citogenéticos em outras espécies de peixes.

As análises citogenética das linhagens de celulares obtidas de *Astyanax bockmanni*, *A. altiparanae* e *A. paranae* revelaram um número modal diplóide de $2n = 50$ cromossomos, semelhantes aos resultados obtidos por Neto et al. (2009), Martinez et al. (2012), Fernandes et al. (2014), Yano et al. (2014), Silva et al. (2015) e Silva et al. (2016). Enquanto, as linhagens de *Megaleporinus macrocephalus* examinadas cariotipicamente mostram um número modal diploide de $2n = 54$ cromossomos, com presença de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW, equivalentes aos descritos por Porto-Foresti (2008), Hashimoto et al. (2009) e Parise-Maltempi et al. (2013). Para as linhagens celulares das duas espécies de Serrasalminidae essas análises evidenciaram um número modal diploide de $2n = 54$ cromossomos, corroborando os resultados já descritos por Nakayama et al. (2012) e Ribeiro et al. (2014). O número diplóide e morfologia

dos cromossomos das linhagens de *A. bockmanni*, *A. altiparanae*, *A. paranae* e *M. macrocephalus* foi mantido mesmo após o processo de congelamento e descongelamento das células.

As linhagens são importantes sistemas modelos para estudos *in vitro*. Muitas espécies utilizadas nesses estudos são utilizadas na área da aquicultura e desenvolvimento dessas linhagens não apenas se limita a estudos dentro da área da citogenética, mas também poderão abrir novas oportunidades para estudos em outras áreas, como por exemplo, nas interações entre hospedeiro patógeno. Outro aspecto importante que o estabelecimento dessas linhagens pode reduzir o número sacrifícios de indivíduos e custo com novas coletas. Assim, as linhagens celulares obtidas neste estudo mostraram que a sua capacidade proliferativa foi mantida após o período de criopreservação e contribuindo grandemente para criação do primeiro banco de células de peixes neotropicais.

Referências

As referências bibliográficas, citadas no presente estudo, se encontram reunidas no final desta tese.

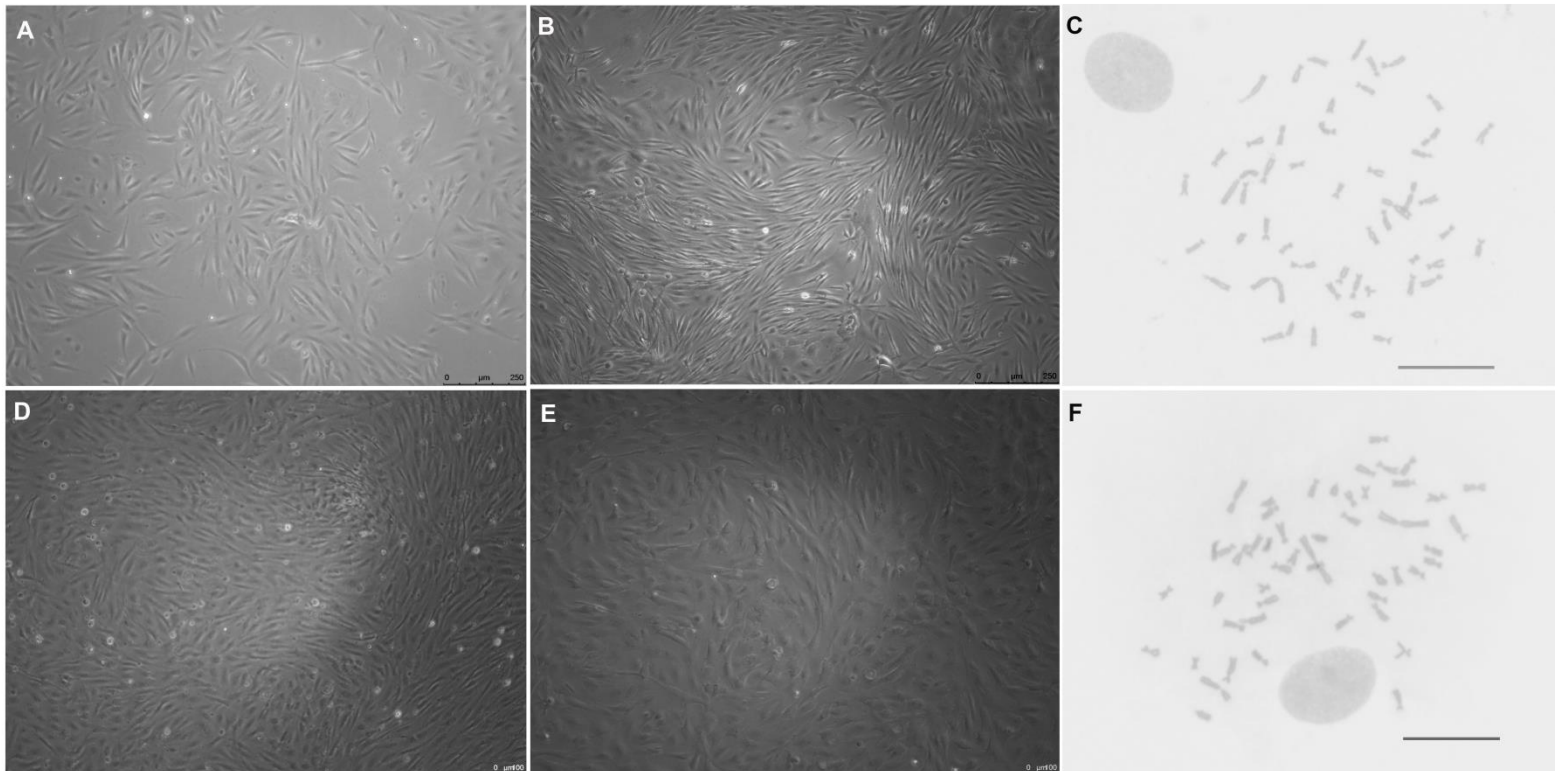


Figura 1: Cultivo primário de células fibroblastóides do tecido muscular de *Astyanax altiparanae* após 72 horas de cultivo (A). Células subcultivadas na terceira passagem com confluência celular de 80% (B). Células fibroblastóides após 18 dias pós-descongelamento (D). Células de *A. altiparanae* subcultivadas depois do processo de criopreservação na sexta passagem (E). Cromossomos metafásicos obtidos de células fibroblastóides na quarta passagem (C) e na sexta passagem depois do processo de congelamento e descongelamento. A barra em A e B 200µm, D e E 100µm em aumento de 10X e C e F 100µm em aumento de 100X.

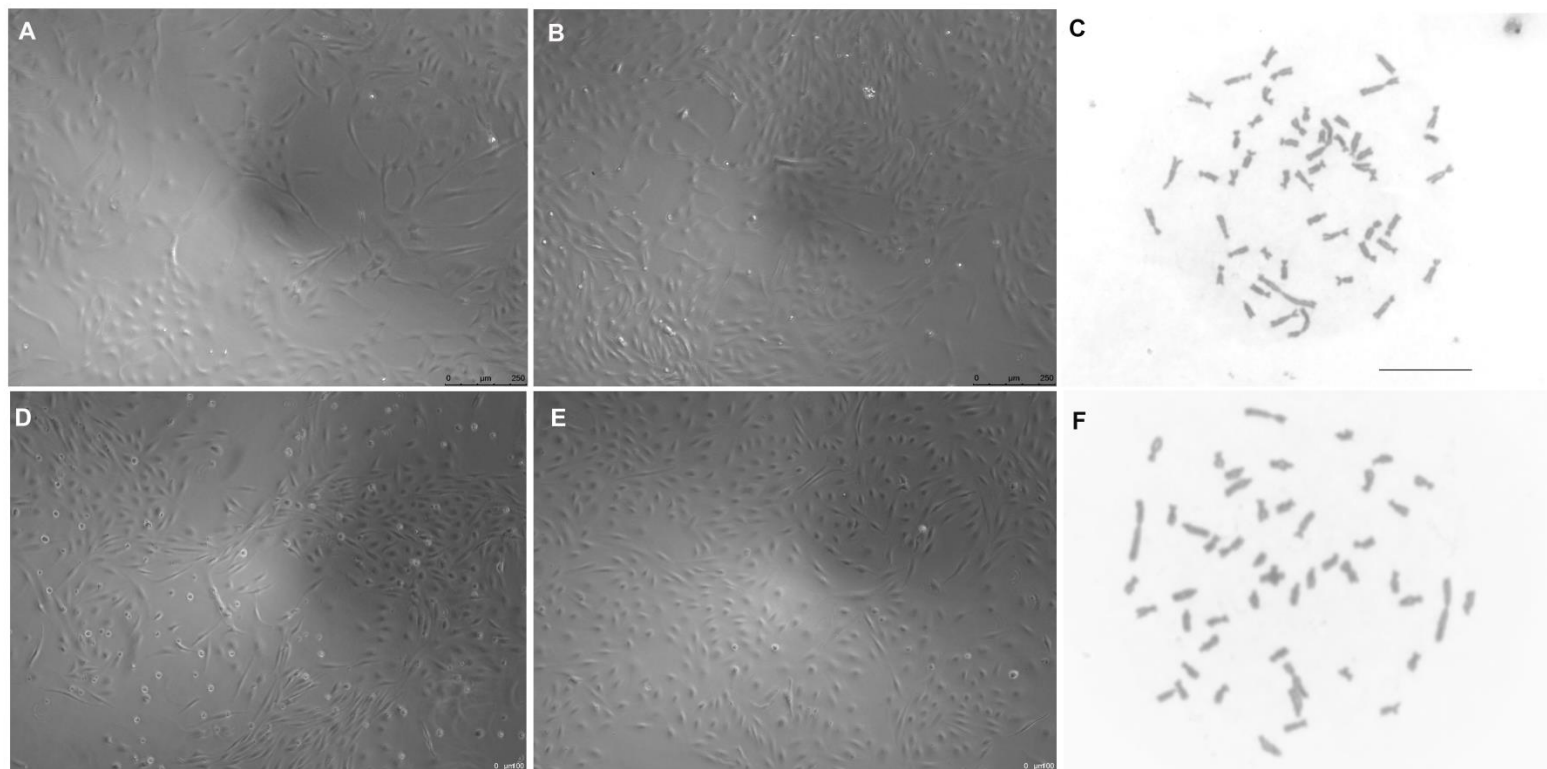


Figura 2: Cultivo primário de células fibroblastóides do tecido muscular de *Astyanax bockmanni* após 72 horas de cultivo (A). Células subcultivadas na quarta passagem com confluência celular de 80% (B). Células fibroblastóides após 15 dias pós-descongelamento (D). Células de *A. altiparanae* subcultivadas depois do processo de criopreservação na sexta passagem (E). Cromossomos metafásicos obtidos de células fibroblastóides na quinta passagem (C) e na sexta passagem depois do processo de congelamento e descongelamento. A barra em A e B 200μm, D e E 100μm em aumento de 10X e C e F 100μm em aumento de 100X.

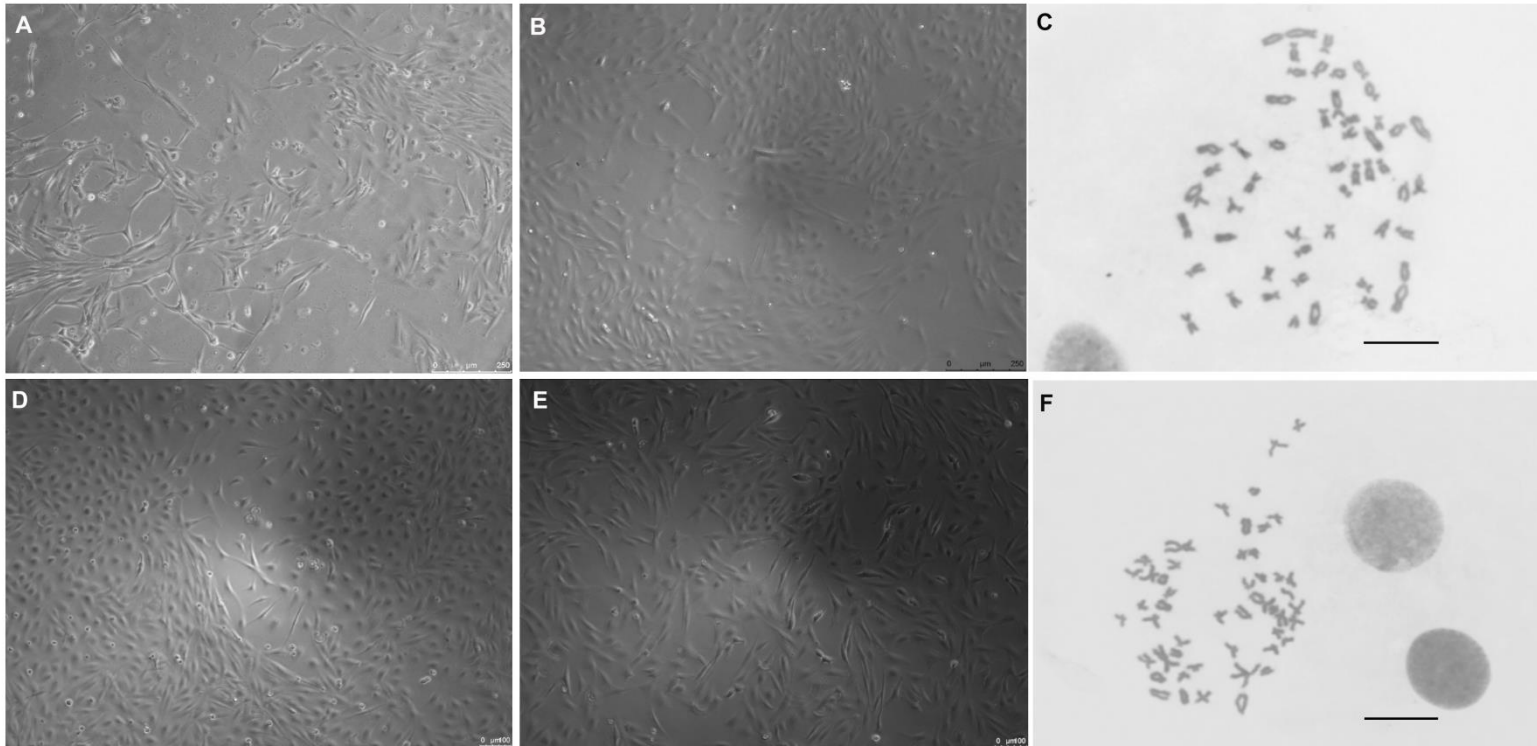


Figura 3: Cultivo primário de células fibroblastóides do tecido muscular de *Astyanax paranae* após 48 horas de cultivo (A). Células subcultivadas na segunda passagem com confluência celular de 80% (B). Células fibroblastóides após 12 dias pós-descongelamento (D). Células de *A. paranae* subcultivadas depois do processo de criopreservação na quarta passagem (E). Cromossomos metafásicos obtidos de células fibroblastóides na terceira passagem (C) e na quarta passagem depois do processo de congelamento e descongelamento. A barra em A e B 200µm, D e E 100µm em aumento de 10X e C e F 100µm em aumento de 100X.

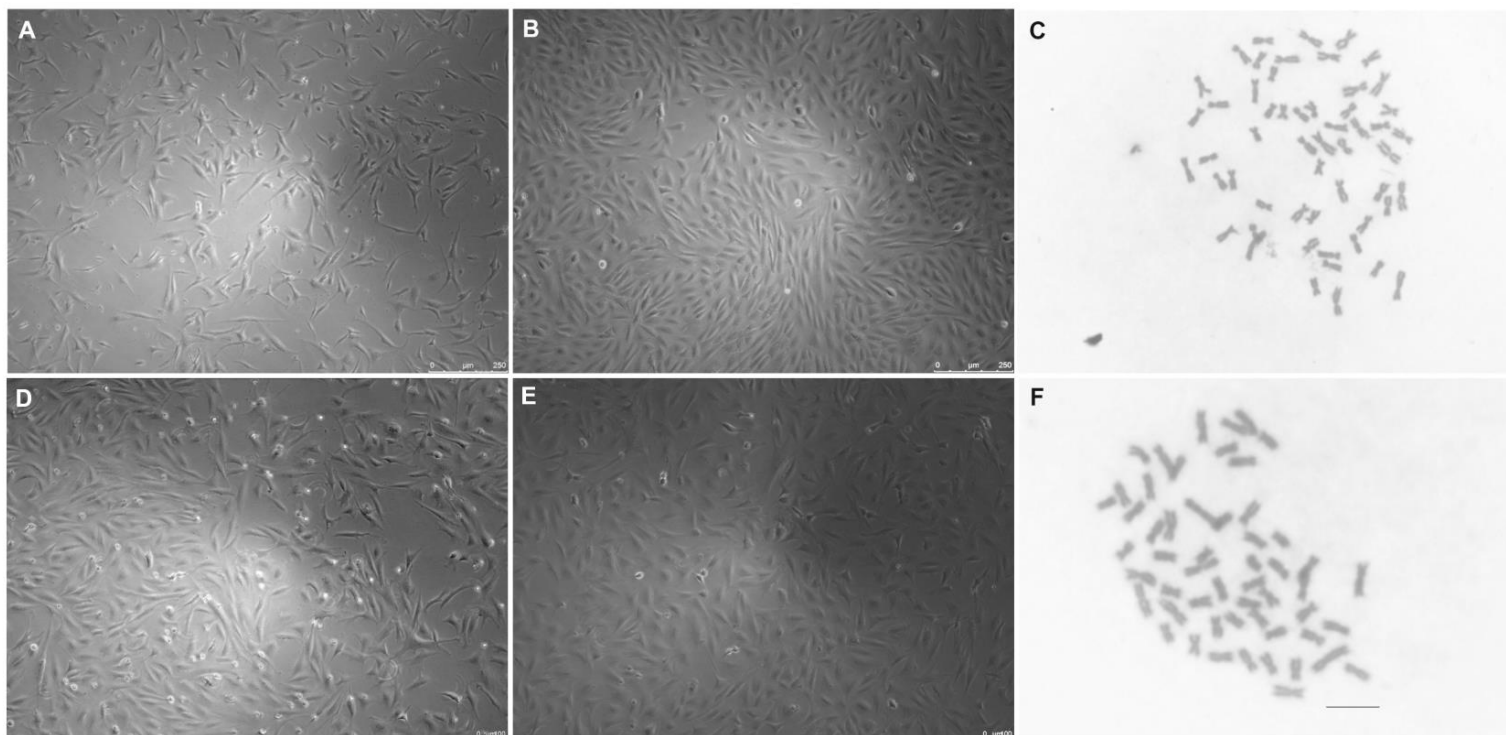


Figura 4: Cultivo primário de células fibroblastóides do tecido muscular de *Megaleporinus macrocephalus* após 72 horas de cultivo (A). Células subcultivadas na primeira passagem com confluência celular superior a 80% (B). Células fibroblastóides após cinco dias pós-descongelamento (D). Células de *M. macrocephalus* subcultivadas depois do processo de criopreservação na terceira passagem (E). Cromossomos metafásicos obtidos de células fibroblastóides na primeira passagem (C) e na terceira passagem depois do processo de congelamento e descongelamento. A barra em A e B 200µm, D e E 100µm em aumento de 10X e E e F 100µm em aumento de 100X.

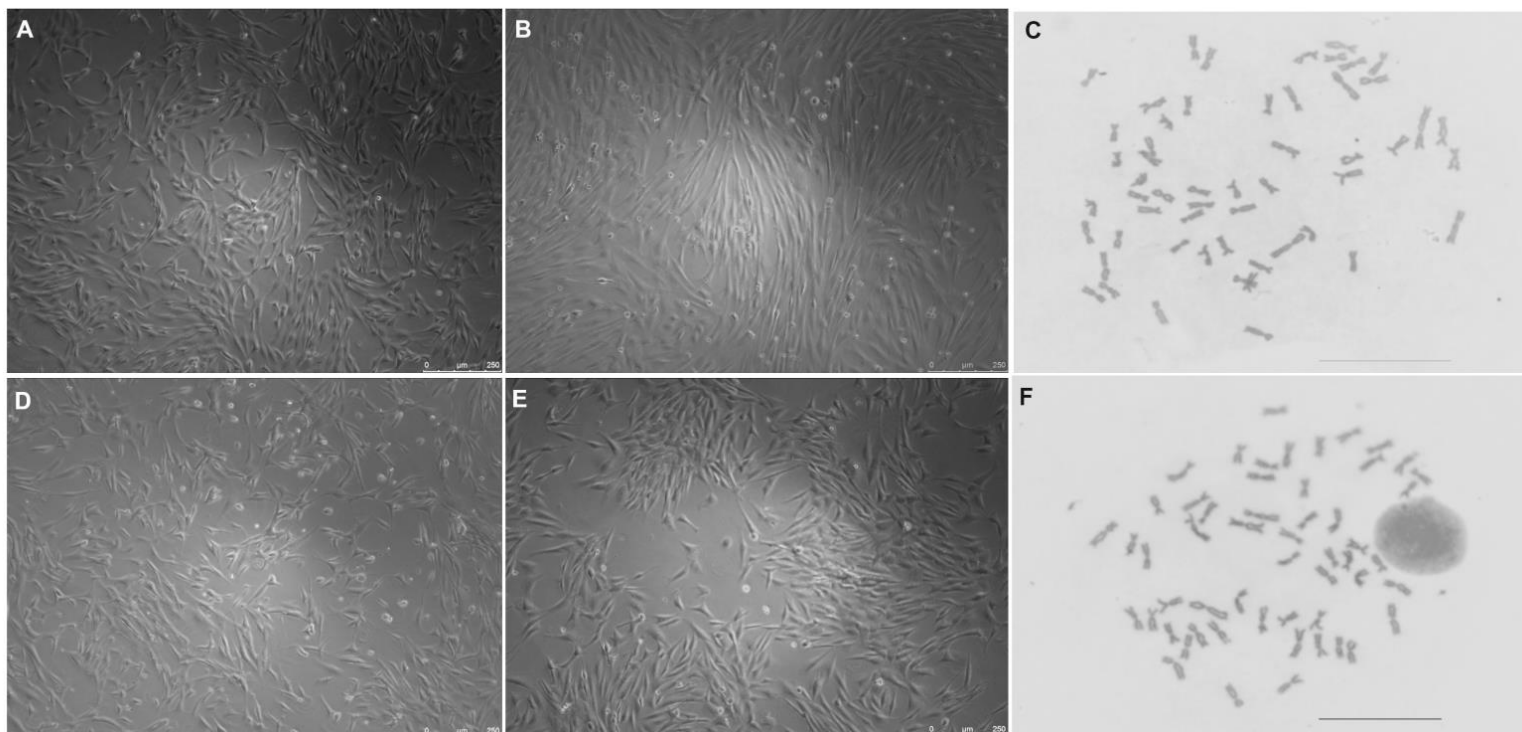


Figura 5: Cultivo primário de células fibroblastóides do tecido muscular de *Colossoma macropomum* e *Piaractus mesopotamicus* após 72 horas de cultivo (A e D). Células subcultivadas na primeira passagem com confluência celular superior a 80% (B e E). Cromossomos metafásicos obtidos de células fibroblastóides de *C. macropomum* e *P. mesopotamicus* na segunda passagem (C e F). A barra em A, B, C e D 200µm em aumento de 10X e C e F 100µm em aumento de 100X.

TABELA 12: Sumário dos experimentos de cultivo primário e subcultivos das espécies analisadas nesse estudo.

Espécie	N*	Adesão ao substrato	Caracterização cellular	Confluência em cultivo primário	Confluência após subcultivo	Confluência após descongelamento	Nº de passagens realizadas
<i>Astyanax altiparanae</i>	3	1 dia	2 e 3 dias	10 dias	2 e 3 dias	18 dias	Até a 8º passagem
<i>Astyanax paranae</i>	7	1 dia	2 dias	10 a 12 dias	2 dias	12 dias	Até a 5º passagem
<i>Astyanax bockmanni</i>	2	1 dia	2 e 3 dias	10 dias	2 e 3 dias	15 dias	Até a 7º passagem
<i>Megaleporimus macrocephalus</i>	12	1 dia	1 e 2 dias	3 dias	1 e 2 dias	10 dias	Até a 3º passagem
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	5	1 dia	2 e 3 dias	5 dias	4 dias	-	Até a 1º passagem
<i>Colossoma macroponum</i>	8	1 dia	2 e 3 dias	5 dias	4 dias	-	Até a 1º passagem

***Número de cultura estabelecida após o processo de digestão.**

TABELA 2: Sumário dos experimentos de criopreservação das linhagens celulares das espécies analisadas nesse estudo utilizando o método de exclusão de Azul de trypan.

Espécie	Nº de linhagens congeladas	Nº da passagem que foi realizado o congelamento da amostra	Nº de células congeladas	Viabilidade da amostra antes do congelamento	Viabilidade da amostra depois do descongelamento
<i>Astyanax altiparanae</i>	4	5º e 6º	1,01x10 ⁶ a 2,18x10 ⁶	87% - 98%	70%
<i>Astyanax paranae</i>	5	2º e 3º	8,5x10 ⁵ a 3,37x10 ⁶	94%-99%	68%-70%
<i>Astyanax bockmanni</i>	1	5º	1,69x10 ⁶	98%	75%
<i>Megaleporimus macrocephalus</i>	12	1º e 3º	5x10 ⁵ a 3,02x10 ⁶	93%-99%	57%-65%
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	2	1º	2,87x10 ⁶ a 2,90x10 ⁶	95%-96%	25%
<i>Colossoma macropomum</i>	4	1º	5x10 ⁵ a 3,95x10 ⁶	92%-98%	40%-49%
Total de linhagens	28	-	-	-	

TABELA 3: Sumário dos resultados das análises de viabilidade, apoptose e necrose das linhagens celulares analisadas nesse estudo por citometria de fluxo utilizando Anexina V e iodeto de propídeo.

Linhagens da espécie	Células viáveis	Células apoptose inicial	Células em necrose	Células em apoptose tardia/necrose
<i>Astyanax altiparanae</i>	54,1%	13,7%	5,6%	26,6%
<i>Megaleporinus macrocephalus</i>	56,2%	12,9%	13,1%	17,8%
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	58,4%	6,2%	15,6%	19,8%
<i>Colossoma macropomum</i>	51,1%	23,7%	5,2%	19,9%

Capítulo 3: Mapeamento cromossômico de sequências de DNA repetitivos em linhagens celulares de espécies da família Serrasalminidae Bleeker, 1859 (Characiformes)

Resumo

A família Serrasalminidae compreende 97 espécies e 16 gêneros de grande importância ecológica e econômica para o Brasil. Muitas dessas espécies são utilizadas na pesca comercial e esportiva e na aquicultura. Uma das ferramentas valiosa dentro da área da aquicultura é utilização de técnicas citogenéticas para prever as chances de sucesso na produção de híbridos, não apenas com determinação de cariótipo, mas também na identificação de marcadores citogenéticos. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo mapear quatro sequências de DNA repetitivos (DNAr 18S, DNAr 5S, RNAsn U1, RNAsn U2) em linhagens celulares de *Colossoma macropomum* e *Piaractus mesopotamicus*, para melhor compreender a organização genômica desses genes nessas espécies e assim contribuir com informações significativas para a família Serrasalminidae. Todas as linhagens celulares apresentaram número diploide igual a $2n = 54$ cromossomos, corroborando resultados já descritos na literatura. O mapeamento das sequências de DNAr 18S revelou seis marcações em cromossomos distintos *P. mesopotamicus* e quatro marcações em *C. macropomum*. Os sítios de DNAr 5S foram detectados em dois pares cromossômicos em ambas as espécies. O mapeamento dos sítios RNAsn U1 e U2 foi caracterizado primeira vez para essa família e revelou dois sítios em cromossomos distintos para ambos genes. O uso de linhagens celulares e o emprego da técnica de FISH possibilitou caracterizar marcadores para essas duas espécies com a localização de sequências exclusivas em cada uma das espécies aqui estudadas, sendo portanto marcadores efetivos para serem utilizados em estudos futuros de biotecnologia aplicáveis a aquicultura.

Palavras chaves: Peixes neotropicais, famílias multigênicas, FISH, cromossomos.

Introdução

A família Serrasalminidae compreende 97 espécies e 16 gêneros de grande importância ecológica e econômica para o Brasil (Eschmeyer & Fong, 2018). Estão distribuídos exclusivamente na região Neotropical, habitando áreas de planícies de inundação, florestas alagadas periodicamente, canais e rios na região Amazônica, Paraguai e Orinoco (Jégu 2003). Muitas dessas espécies são utilizadas na pesca comercial e esportiva e na aquicultura para a produção de híbridos, entre elas, *Colossoma macropomum* “tambaqui” e *Piaractus mesopotamicus* “pacu” (Nelson, 2006).

Uma das ferramentas valiosa dentro da área da aquicultura é utilização de técnicas citogenéticas para prever as chances de sucesso na produção de híbridos não apenas com determinação de cariótipo, mas também na identificação de marcadores citogenéticos (Ribeiro et al. 2017). Com advento da técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) a compreensão da evolução e organização do genoma em peixes pode ser melhor investigada (Cioffi e Bertollo 2012).

Sabe-se que uma grande parte do genoma eucarionte é composta por sequências repetitivas não codificadoras (e.g. DNA de satélite, sequências de minissatélites e microssatélites) e sequências codificadoras que incluem as famílias multigênicas (e.g. DNA ribossômicos e pequenos ribonucleoproteínas nucleares) (Pisano e Ghigliotti 2009; Liao 1999). O conhecimento da composição e distribuição dessas sequências no genoma de espécies com interesse comercial como “tambaqui” e “pacu” podem contribuir para elucidar questões evolutivas destas espécies (Ribeiro et al. 2017), assim como podem contribuir em estudos aplicados (Maneechot et al. 2016). Assim, visando ampliar nosso conhecimento sobre a composição e distribuição de sequências de DNA repetitivos, o presente estudo tem como objetivo mapear quatro sequências de DNA repetitivos (DNAr 18S, DNAr 5S, RNAsn U1, RNAsn U2) nos cromossomos de linhagens celulares de *Colossoma macropomun* e *Piaractus mesopotamicus* para melhor compreender a organização genômica desses genes e contribuir com informações significativas para a família Serrasalminidae.

Materiais e Métodos

Foram utilizadas oito linhagens de células fibroblastóides de *Colossoma macropomum* (CM) e seis linhagens de *Piaractus mesopotamicus* (PM) para obtenção de cromossomos mitóticos e o mapeamento cromossômico de sequências de DNA repetitivo. Essas linhagens foram estabelecidas de animais doados pelo Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP), Jaboticabal-SP ao Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, UNESP, Botucatu. O desenvolvimento das linhagens e as preparações cromossômicas foram realizados conforme a metodologia descrita por Paim et al. (Capítulo 1).

As sondas dos genes DNAr 18S, DNAr 5S, RNAsn U1, RNAsn U2 foram obtidas via Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) mediante amostras de DNA genômico de *P. mesopotamicus*. Os primers usados para amplificar esses genes estão descritos na tabela 1. As sondas de DNAr 18S e 5S foram marcadas com biotin-16-dUTP, enquanto as sondas de RNAsn U1 e U2 foram marcadas com digoxigenin-11-dUTP, todas via PCR.

Os experimentos de hibridação fluorescente *in situ* (FISH) foram realizados conforme descrito por Pinkel et al. (1986) com alta estringência. As lâminas das preparações cromossômicas foram incubadas em solução de RNase (10mg/ml) por 1 hora a 37°C, após esse período as lâminas foram lavadas em 1xPBS e 2xSSC por 5 minutos e, então tratadas com pepsina 0,005% por 10 minutos. As lâminas foram novamente lavadas em 1xPBS e então foram tratadas com formaldeído 1% por 10 minutos para fixação DNA cromossômico. Depois de fixadas, as lâminas foram lavadas em 1xPBS por 5 minutos e desidratadas em série alcoólica 70%, 85% e 100% a -20°C por 3 minutos cada. Após esses procedimentos, o DNA cromossômico foi desnaturado em formamida 70% a 70°C por 5 minutos e desidratados em série alcoólicas. Simultaneamente a essa desnaturação, a solução de hibridização (concentração final: 10% de sulfato dextrano, 50% formamida, 2XSSC) contendo as sondas marcadas com biotina-dUTP e digoxigenina-dUTP (3 a 5µl) foram desnaturadas a 95°C por 10 minutos e mantidas em gelo até serem aplicadas nas lâminas secas.

A hibridação foi realizada “*overnight*” a 37°C em câmara úmida. Após a hibridação, as lâminas foram lavadas em solução de formamida 15% a 42°C por 20 minutos, solução salina 0,1XSSC a 60°C por 15 minutos e por fim em solução Tween 0,5% por 5 minutos. A detecção da sonda foi realizada utilizando anticorpos (anti-digoxigenina-rodamina e anti

avidina-FITC) e, após esses procedimentos as lâminas foram lavadas em solução de Tween por 15 minutos e desidratadas em série alcoólica. Após a secagem, os cromossomos foram coradas com meio de montagem Vectashield com DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol) (Vector, EUA) e analisadas em fotomicroscópio óptico de fluorescência (Olympus BX61) e as imagens capturadas usando o software Image Pro Plus 6.0 (MediaCybernetics).

Resultados

Todas as linhagens celulares de *Colossoma macropomum* e *Piaractus mesopotamicus* apresentaram número diploide igual a $2n=54$ cromossomos com a presença de cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e subtelocêntricos, corroborando os resultados já descritos por Nakayama et al. (2012) e Ribeiro et al. (2014).

O mapeamento cromossômico nas linhagens de *Colossoma macropomum* utilizando a sonda do gene DNAr 18S revelou quatro marcações em posição terminal no braço maior de dois pares de cromossomos metacêntricos (Figura 1a), enquanto a sonda das sequências de DNAr 5S foram mapeadas na região pericentromérica com quatro marcações, sendo duas marcações em um par de cromossomos metacêntricos e as outras em um par de cromossomos submetacêntricos (Figura 1b). Os sítios do gene snRNA U2 estão localizados na região pericentromérica de um par de cromossomo submetacêntrico, enquanto os sítios para o gene snRNA U1 revelou duas marcações na região terminal do braço maior de um par do cromossomo metacêntrico (Figuras 1a e 1b).

As sondas para o gene DNAr 18S nas linhagens de *Piaractus mesopotamicus* foram mapeadas em dois pares de cromossomos na região terminal e um par na região pericentromérica (Figura 1c). Já os genes DNAr 5S foram localizadas na região terminal de um par de cromossomos submetacêntricos e na região pericentromérica de um par de cromossomos metacêntricos (Figura 1d). Os sítios do gene snRNA U2 estão localizados na região pericentromérica de um par de cromossomo submetacêntrico, por outro lado os sítios do gene snRNA U1 estão localizados em sintonia com os genes DNAr 18S em posição terminal (Figuras 1c e 1d).

Discussão

Os principais avanços em estudos citogenéticos em peixes foram obtidos pelo mapeamento de sequências de DNA repetitivos nos cromossomos utilizando a técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) (Cioffi e Bertollo 2012). O uso destas sequências como marcadores cromossômicos têm auxiliando a entender a evolução e organização do genoma, origem e evolução de cromossomos supranumerários, diferenciação sexual, e rearranjos cromossômicos (Votolin et al. 2010). Dentre as sequências de DNA repetitivos mais estudados estão os genes das famílias multigênicas, que inclui os RNA ribossômicos (RNAr) e os pequenos RNAs nucleares (RNAsn) que são compostos por centenas a milhões de cópias no genoma (Pisano e Ghigliotti 2009).

As sequências de RNAsn desempenham um papel importante na formação do spliceossomo e são reconhecidos os genes U1, U2, U4, U5 e U6 (Reddy e Busch 1988). O mapeamento dessas sequências de RNAsn estão restritos aos genes U1 e U2 em peixes (Utsumonia et al. 2014; Silva et al. 2015) e os resultados mostram a localização em um ou mais sítios nos cromossomos. Essas sequências são conservadas em todos os eucariontes, entretanto o número e organização desses genes podem ser diferentes entre as espécies (Hernandez et al. 2001; Yu et al. 2001). Essa é primeira vez que os gene RNAsn U1 e U2 foram mapeados em *Colossoma macropomum* e *Piaractus mesopotamicus* e representa as primeiras informações sobre a localização dessas sequências para Serrasalminidae. Neste estudo, os sítios de RNAsn U1 e U2, para ambas espécies, foram localizados em um par cromossômico, porém os sítios de RNAsn U1 de *P. mesopotamicus* estão associados no mesmo cromossomos que os sítios de DNAr 18S. A ocorrência de sítios de RNAsn U1 e U2 em sintenia com outras sequencias repetitivas tem sido descritas em espécies de *Astyanax* (Silva et al. 2015) e podem responder questões importantes sobre a evolução e organização do genoma.

Os genes de DNAr 18S e 5S já foram amplamente mapeados no genoma de peixes (Oliveira et al. 2015; Ribeiro et al. 2014; Nakayama et al. 2012; 2008). O estudo desses sítios na grande maioria espécies de peixes mostra uma localização em cromossomos distintos, embora em alguns espécies esses sítios estão co-localizados (Oliveira et al. 2016). A localização desses dois sítios em distintos cromossomos sugere uma evolução independente dessas famílias multigênicas e poderia ajudar a evitar

rearranjos desvantajosos entre essas duas regiões (Cioffi e Bertollo 2010; Martins e Galetti 1999).

Em *C. macropomum* e *P. mesopotamicus*, os sítios de DNAr 18S e 5S já foram documentados em cromossomos distintos por Ribeiro et al. (2014) que relataram a presença de sítios de DNAr 18S em dois pares cromossômicos em *P. mesopotamicus* e três pares cromossômicos em *C. macropomum*, contrapondo os resultados encontrados aqui que revelam a presença de DNAr 18S em dois pares de cromossomos em *C. macropomum* e três pares em *P. mesopotamicus*. A presença de um maior número de sítios de DNAr 18S é uma característica comum para algumas espécies de peixes de água doce (Oliveira et al. 2015), inclusive para outras espécies de Serrasalminidae (Nakayama et al. 2012; 2008). Já a distribuição dos sítios de DNAr 5S encontradas no presente estudo corroboram os resultados encontrados por Ribeiro et al. (2014) com localização em dois pares cromossômicos.

O uso de linhagens celulares para estudos citogenéticos e o emprego da técnica de FISH possibilitou caracterizar marcadores para *P. mesopotamicus* e *C. macropomum* com a localização de sequências exclusivas em cada uma das espécies aqui estudadas, sendo marcadores efetivos para serem utilizados em estudos futuros de biotecnologia aplicáveis a aquicultura.

Referências

As referências bibliográficas, citadas no presente estudo, se encontram reunidas no final desta tese.

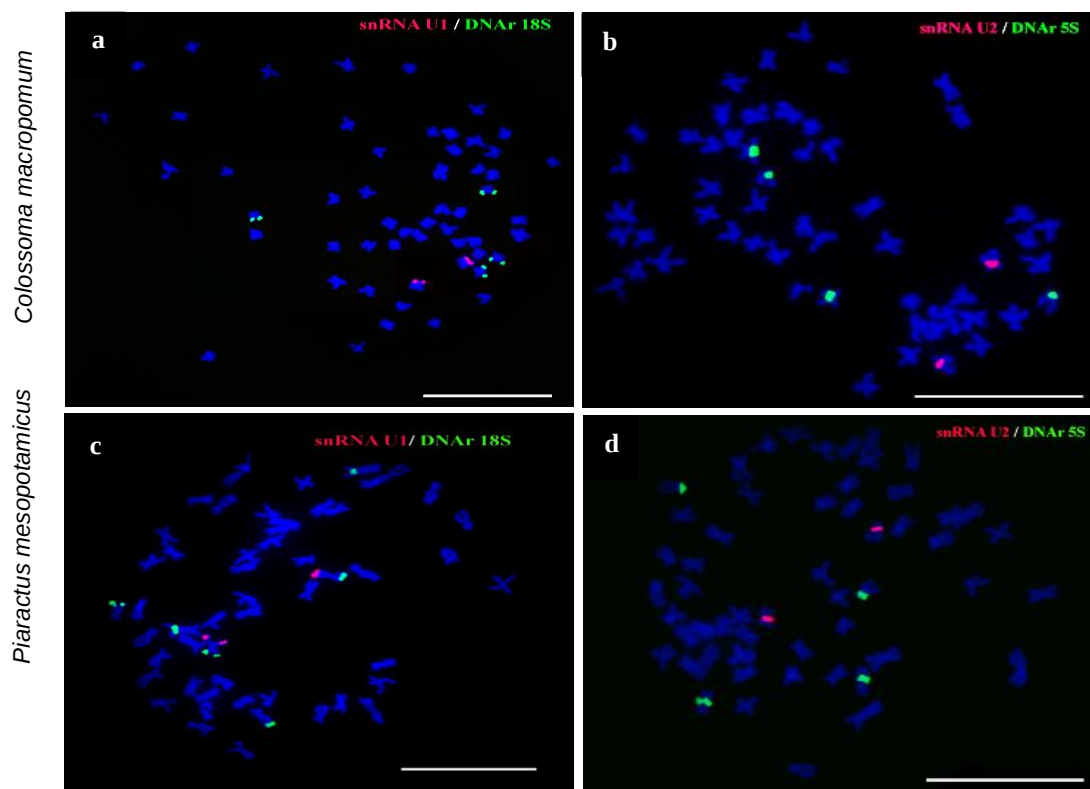


Figura 1: Metafases de *Colossoma macropomum* e *Piaractus mesopotamicus* após os experimentos de FISH com sondas de DNAr 18S, DNAr 5S, snRNA U1 e snRNA U2. A barra equivale 20 μm.

TABELA 1: Primers usados na amplificar os fragmentos dos genes analisados no presente estudo.

Gene	Sequência dos primers	Referência
DNAR 5S	5SA (5'-TCA ACC AAC CAC AAA GAC ATT GGC AC-3') 5SB (5'-TAG ACT TCT GGG TGG CCA AAG GAA TCA-3')	Pendás et al. 1995
DNAr 18S	18S6F (5'-CTC TTT CGA GGC CCT GTA AT-3') 18S6R (5'-CAG CTT TGC AAC CAT ACT CC-3')	Utsunomia et al. 2016
RNA_{sn} U1	U1F (5'-GCA GTC GAG ATT CCC ACA TT-3') U1R (5'-CTT ACC TGG CAG GGG AGA TA-3')	Silva et al. 2015
RNA_{sn} U2	U2F (5'-ATC GCT TCT CGG CCT TAT G-3') U2R (5'-TCC CGG CGG TAC TGC AAT A-3')	Bueno et al. 2013

5. Considerações finais

- A metodologia apresentada de isolamento e cultivo de células nas diferentes espécies peixes neotropicais representa uma grande inovação para área de citogenética de peixes neotropicais;
- A aplicação desta metodologia poderá sanar algumas lacunas existentes de grupos de peixes ainda poucos explorados citogeneticamente pela dificuldade de obter preparações cromossômicas de boa qualidade que são cruciais para o sucesso de várias experiências;
- É primeira vez que é proposta o estabelecimento de linhagens celulares para peixes neotropicais com o intuito da criação do primeiro banco de células de peixes neotropicais para pesquisas na área da citogenética;
- O desenvolvimento das linhagens poderá abrir novas oportunidades para estudos em outras áreas, como por exemplo, nas interações entre hospedeiro patógeno;
- As linhagens celulares obtidas neste estudo mantiveram os números diplóides das espécies, mesmo após o processo de criopreservação e sucessivas passagens;
- O uso de tecnologia de culturas possibilitou a localização de sequências de DNA repetitivos exclusivo em *P. mesopotamicus* e *C. macropomum* que poderão ser utilizadas em estudos futuros de biotecnologia aplicáveis a aquicultura.

6. Referências bibliográficas

- Albert JS, Reis RE. 2011. Historical biogeography of neotropical freshwater fishes. Berkeley, University of California Press.
- Alexander MS, Kawahara G, KHO AT, Howell MH, et al. 2010. Isolation and transcriptome analysis of adult zebrafish cells enriched for skeletal muscle progenitors. Muscle & Nerve. DOI 10.1002/mus.21972.
- Almeida JS, Migués VH, Diniz D, Affonso PRAM. 2015. A unique sex chromosome system in the knifefish *Gymnotus bahianus* with inferences about chromosomal evolution of Gymnotidae. Journal of Heredity, 106, 2, 177–183. DOI:10.1093/jhered/esu087.
- Amemiya CT, John WB, John R G. 1984. A Cell Culture Technique for Chromosome Preparation in Cyprinid Fishes. Copeia, 1984(1): 232–235.
- Arai R. 2011. Fish Karyotypes: A Check List. Springer, Japan.
- Araya-Jaime C, Mateussi NTB, Utsunomia R, Costa-Silva GJ, Oliveira C, Foresti F. 2017. ZZ/Z0: The new system of sex chromosomes in *Eigenmannia aff. trilineata* (Teleostei: Gymnotiformes: Sternopygidae) characterized by molecular cytogenetics and DNA Barcoding. Zebrafish. DOI: 10.1089/zeb.2017.1422
- Baust JM, Buskirk RV, Baust JG. 2000. Cell viability improves following inhibition of cryopreservation-induced apoptosis. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal, 36(4):262-270. [https://doi.org/10.1290/1071-2690\(2000\)036<0262:CVIFIO>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1290/1071-2690(2000)036<0262:CVIFIO>2.0.CO;2).
- Bertollo LAC, Takahashi CS, Moreira-Filho O. 1978. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). Brazilian Journal of Genetics, 2, 103–120.
- Bejar J, Borrego JJ, Alvarez MC. 1997. A continuous cell line from the cultured marine fish fillet-head seabream (*Sparus aurata* L.). Aquaculture, 150, 143–153.
- Blanco DR, Vicari MR, Lui RL, Artoni RF, Almeida MC, Traldi JB, Margarido VP, Moreira-Filho O. 2014. Origin of the X1X1X2X2/X1X2Y sex chromosome system of *Harttia punctata* (Siluriformes, Loricariidae) inferred from chromosome painting and FISH with ribosomal DNA markers. Genetica, 142, 119–126. DOI 10.1007/s10709-014-9759-4.
- Born GG, Bertollo LAC. 2006. A new sympatric region for distinct karyotypic forms of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae). Braz. J. Biol., 66, 1B, 205-210.

- Bueno D, Palacios-Gimenez OM, Cabral-de-Mello DC (2013) Chromosomal Mapping of Repetitive DNAs in the Grasshopper *Abracris flavolineata* Reveal Possible Ancestry of the B Chromosome and H3 Histone Spreading. In: Wutz A (Ed.) PLoS ONE 8: e66532. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066532>.
- Bydlowski SP, Debes AA, Maselli LMF, Janz FL. 2009. Biological characteristics of mesenchymal stem cells. Rev. Bras. Hematol. Hemoter., 31, (Supl. 1), 25-35.
- Camacho JPM. 2005. B chromosomes. In: Gregory TR editor. The Evolution of the Genome. Elsevier, San Diego. p 223-286.
- Carvalho RA, Martins-Santos IC, Dias AL. 2008. B chromosomes: an update about their occurrence in freshwater Neotropical fishes (Teleostei). Journal of Fish Biology, 72, 1907–1932.
- Chen SL, Qin QW. 2011. Theory and Technology of Fishes Cell Culture. Beijing: Science Press.
- Chi SC, Hu WW, Lo BJ. 1999. Establishment and characterization of a continuous cell line (GF-1) derived from grouper, *Epinephelus coioides* (Hamilton): a cell line susceptible to grouper nervous necrosis virus (GNNV). Journal of Fish Diseases, 22, 173–182.
- Cioffi MB, Bertollo LAC. 2012. Chromosomal Distribution and Evolution of Repetitive DNAs in Fish. Garrido- Ramos MA (ed): Repetitive DNA. Genome Dyn. Basel, Karger, vol 7, pp 197–221.
- Doke SK, Dhawale SC. 2015. Alternatives to animal testing: A review. Saudi Pharmaceutical Journal, 23, 223–229.
- Domingues MS, Vicari MR, Abilhoa V, Wamser JP, Cestari MM, Bertollo LAC, Almeida MC, Arton RF. 2007. Cytogenetic and comparative morphology of two allopatric populations of *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Teleostei: Characidae) from upper rio Paraná basin. Neotropical Ichthyology, 5(1):37-44.
- Dubey A, Goswami M, Yadav K, Mishra A, Kumar A. 2015. Establishment of a Novel Muscle Cell Line From *Wallago attu* for In Vitro Study of Pesticide Toxicity. Gene Cell Tissue, 2, 1, e25568.
- Eschmeyer WN, Fong, JD. 2018. Catalog of fishes. Disponível em <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>. Acessado em 20 de fevereiro de 2018.

- Fent K. 2001. Fish cell lines as versatile tools in ecotoxicology: assessment of cytotoxicity, cytochrome P4501A induction potential and estrogenic activity of chemicals and environmental samples. *Toxicology in vitro*, 15, (4-5), 477–488.
- Fernandes CA, Martins-Santos IC. 2004. Cytogenetic studies in two populations of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes). *Hereditas*, 141, 328-332.
- Ferreira M, Garcia C, Matoso DA, Jesus IS, Feldberg E. 2016. A new multiple sex chromosome system X1X1X2X2/X1Y1X2Y2 in Siluriformes: cytogenetic characterization of *Bunocephalus coracoideus* (Aspredinidae). *Genetica*, 144, 591–599. DOI 10.1007/s10709-016-9927-9.
- Foresti F, Toledo-Filho AS, Almeida-Toledo, LF. 1981. Polymorphic nature of the nucleolus organizer regions in fishes. *Cytogenet Cell Genet*, 31: 134–141.
- Foresti F, Oliveira C, Almeida-Toledo LF. 1993. A method for chromosome preparations from large fish specimens using in vitro short-term treatment with colchicine. *Experientia*, 49, 810-813.
- Freshney RI. 2005. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, 5rd ed. New York: John Wiley and Son.
- Freshney RI. 2010. *Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications*. 6th ed. New Jersey: John Wiley and Sons.
- Fryer JL, Lannan CN. 1994. Three decades of fish cell culture: A current listing of cell lines derived from fishes. *Journal of Tissue Culture Methods*, 16, 87-94.
- Fu X, Li N, Lai Y, Luo X, Wang Y, et al. 2015. A novel fish cell line derived from the brain of Chinese perch *Siniperca chuatsi*: development and characterization. *Journal of Fish Biology*, 86, 32–45. doi:10.1111/jfb.12540.
- Graf M, Hartmann N, Reichwald K, Englert C. 2013. Absence of replicative senescence in cultured cells from the short-lived killifish *Nothobranchius furzeri*. *Experimental Gerontology*, 48: 17–28.
- Gignac SJ, Vo NTK, Mikhaeil MS, Alexander AN et al. 2014. Derivation of a continuous myogenic cell culture from an embryo of common killifish, *Fundulus heteroclitus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 175, 15–27.
- Hashimoto DT, Laudicina A, Bortolozzi J, Foresti F, Porto-Foresti F. 2009. Chromosomal features of nucleolar dominance in hybrids between the Neotropical fish *Leporinus*

- macrocephalus* and *Leporinus elongatus* (Characiformes, Anostomidae). *Genetica*, 137: 135–140. DOI: 10.1007/s10709-009-9366-y.
- Hashimoto DT, Parise-Maltempi PP, Laudicina A, Bortolozzi J, Senhorini JA, Foresti F, Porto-Foresti F. 2009. Repetitive DNA probe linked to sex chromosomes in hybrids between Neotropical fish *Leporinus macrocephalus* and *Leporinus elongatus* (Characiformes, Anostomidae). *Cytogenet Genome Res*, 124:151–157. DOI:10.1159/000207523.
- Helgason CD e Miller CL. 2013. Basic Cell Culture Protocols. 4^o ed. Humana Press. doi: 10.1007/978-1-62703-128-8.
- Henry CM, Hollville E, Martin SJ. 2013. Measuring apoptosis by microscopy and flow cytometry. *Methods*, 61, 90–97.
- Hernandez N. 2001. Small nuclear RNA genes: a model system to study fundamental mechanisms of transcription. *J Biol Chem* 276:26733–26736.
- Kamei MCSL, Baumgärtner L, Paiva S, Zawadzki CH, Martins-Santos IC, Portela-Castro ALB. 2017. Chromosomal Diversity of Three Species of *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes, Loricariidae), from the Paraná River Basin, Brazil: A Species Complex in *Hypostomus ancistroides* Reinforced by a ZZ/ZW Sex Chromosome System. *Zebrafish*, Volume 14, Number 4. DOI: 10.1089/zeb.2017.1429.
- Khalili AA, Ahmad MR. 2015. A Review of Cell Adhesion Studies for Biomedical and Biological Applications. *Int. J. Mol. Sci.*, 16, 18149-18184; doi:10.3390/ijms160818149.
- Keijing A, Haiying L, Shidong G, Kumar DNT, Qingqing W. 2010. Preparation of fish gelatin and fish gelatin/poly(l-lactide) nanofibers by Electrospinning. *International Journal of Biological Macromolecules*, 47, 380–388. doi:10.1016/j.ijbiomac.2010.06.002.
- Kim MS, Nam YK, Park C et al. 2014. Establishment condition and characterization of heart-derived cell culture in Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). *In Vitro Cell.Dev.Biol. - Animal* 50: 909–917. DOI 10.1007/s11626-014-9793-7.
- Kumar A, Singh N, Goswami M, Srivastava JK, Mishra AK, & Lakra WS. 2016. Establishment and Characterization of a New Muscle Cell Line of Zebrafish (*Danio rerio*) as an *In Vitro* Model for Gene Expression Studies. *Animal Biotechnology*, 27:3, 166-173, DOI: 10.1080/10495398.2016.1147455.

- Lakra WS, Goswami M, Rajaswaminathan T, Rathore G. 2010. Development and characterization of two new cell lines from common carp, *Cyprinus carpio* (Linn). Biol Res, 43: 385-392.
- Lakra WS, Swaminathan TR, Joy KP. 2011. Development, characterization, conservation and storage of fish cell lines: a review. Fish Physiol Biochem, 37:1–20. DOI 10.1007/s10695-010-9411-x.
- Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, Thompsons EW. 2006. The epithelial–mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. The Journal of Cell Biology, Vol. 172, No. 7, 2006 973–981. <http://www.jcb.org/cgi/doi/10.1083/jcb.200601018>.
- Liao D.1999. Concerted Evolution: Molecular Mechanism and Biological Implications. Am. J. Hum. Genet. 64:24–30.
- Lorenzini A, Maier AB. 2016. Influence of Donor Age and Species Longevity on Replicative Cellular Senescence. In: S.I.S. Rattan, L. Hayflick (eds.), *Cellular Ageing and Replicative Senescence*, Healthy Ageing and Longevity 4, DOI 10.1007/978-3-319-26239-0_4. p. 49-70.
- Jégu M. 2003. Subfamily Serrasalminae (pacus and piranhas). In: Reis RE, Kullander SO and Ferraris Jr CJ (eds) Check list of Freshwater Fishes of South and Central America. Edipucrs, Porto Alegre, pp 182-196.
- Jensen I, Steiro K, Sommer AI, Mennen S, Johansen A, Sandaker EK, Seppola. 2013. Establishing a cell line from Atlantic cod as a novel tool for in vitro studies. Fish & Shellfish Immunology, 34, 199-208. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2012.10.022>.
- Jing H, Lin X, Xu L, Gao L, Zhang M, Wang N, Wu S. 2017. Establishment and characterization of a heart-derived cell line from goldfish (*Carassius auratus*). Fish Physiol Biochem. DOI 10.1007/s10695-017-0345-4.
- Junqueira LC, Carneiro J. 2013. Histologia básica. 12º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Majeed AS, Nambi KSN, Taj G, Hameed S. 2013. Development, characterization and application of a new fibroblast-like cell line from kidney of a freshwater air breathing fish *Channa striatus* (Bloch, 1793). Acta Tropica, 127, 25-32.
- Maneechot N, Yano CF, Bertollo LAC, Getlekha N, Molina WF, Ditcharoen S, Tengjaroenkul B, Supiwong W, Alongklod T, Cioffi MB. 2016. Genomic organization of

- repetitive DNAs highlights chromosomal evolution in the genus *Clarias* (Clariidae, Siluriformes). *Molecular Cytogenetics*, 9, 4. DOI 10.1186/s13039-016-0215-2.
- Martinez ERM, Alves AL, Silveira SM, Foresti F, Oliveira C. 2012. Cytogenetic analysis in the *incertae sedis* species *Astyanax altiparanae* Garutti and Britzki, 2000 and *Hyphessobrycon eques* Steindachner, 1882 (Characiformes, Characidae) from the upper Paraná river basin. *Comparative Cytogenetics* 6 (1): 41–51. DOI: 10.3897/CompCytogen.v6i1.1873.
- Masters JR. 2002. HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly. *Nature Reviews – Cancer*, v.2, 315-319.
- Melo S, Utsunomia R, Penitente M, Sobrinho-Scudeler PE, Porto-Foresti F, Oliveira C, Foresti F, Dergam JA. 2017. B chromosome dynamics in *Prochilodus costatus* (Teleostei, Characiformes) and comparisons with supernumerary chromosome system in other *Prochilodus* species. *Comparative Cytogenetics* 11(2): 393–403. DOI: <https://doi.org/10.3897/CompCytogen.v11i2.12784>.
- Mello F, Streit Jr DP, Sabin N, Gabillard JC. 2015. Dynamic expression of *tgf-β2*, *tgf-β3* and inhibin *βA* during muscle growth resumption and satellite cell differentiation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *General and Comparative Endocrinology*, 210, 23–29. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.10.011>.
- Merten O-W. 2015 Advances in cell culture: anchorage dependence. *Phil. Trans. R. Soc. B* 370: 20140040. DOI: <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2014.0040>.
- Moraes AM, Augusto EFP, Castilho LR. 2014. Tecnologia do cultivo de células animais: do biofármacos a terapia gênica. Roca, São Paulo.
- Morcillo P, Chaves-Pozo E, Meseguer J, Esteban MA, Cuesta A. 2017. Establishment of a new teleost brain cell line (DLB-1) from the European sea bass and its use to study metal toxicology. *Toxicology in Vitro*, 38, 91–100.
- Nakayama CM, Feldberg E, Bertollo LAC. 2012. Karyotype differentiation and cytotaxonomic considerations in species of Serrasalminidae (Characiformes) from the Amazon basin. *Neotropical Ichthyology*, 10, 1, 53-58.
- Nakayama CM, Feldberg E, Bertollo Lac. 2008. Mapping of ribosomal genes and chromosomal markers in three species of the genus *Serrasalmus* (Characidae, Serrasalminae) from the Amazon basin. *Genetics and Molecular Biology*, 31, 4, 868-873.

- Nelson JS. 2006. Fishes of the World. 4th ed. John Wiley and Sons, New York, 601 pp.
- Neto MF, Vicari MR, Camargo EF, Artoni RF, Moreira-Filho O. 2009. Comparative cytogenetics among populations of *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae, *Incertae sedis*). Genetics and Molecular Biology, 32, 4, 792-796.
- Oliveira MLM, Utsunomia R, Pansonato-Alves JC, Scacchetti PC, Primo CC, Vicari MR, Artoni RF, Centofante L, Moreira-Filho O, Oliveira O, Foresti F. 2016. Microstructural chromosome reorganization in the genus *Trichomycterus* (Siluriformes: Trichomycteridae). Neotropical Ichthyology, 14(2): e150084, 2016 DOI: 10.1590/1982-0224-20150084.
- Oliveira IA, Argolo LA, Bitencourt JA, Diniz D, Vicari MR, Affonso PRAM. 2015. Cryptic Chromosomal Diversity in the Complex “*Geophagus*” *brasiliensis* (Perciformes, Cichlidae). ZEBRAFISH, Volume 00, Number 00, 1-12.
- Oyeleye OO, Ogundejì ST, Ola SI, Omitogun OG. 2016. Basics of animal cell culture: Foundation for modern science. Biotechnology and molecular biology reviews, 11, 2, 6-16. DOI: 10.5897/BMBR2016.0261.
- Parise-Maltempi PP, Silva EL, Rens W, Dearden F, Brien PCMO, Trifonov V, Ferguson-Smith MA. 2013. Comparative analysis of sex chromosomes in *Leporinus* species (Teleostei, Characiformes) using chromosome painting. BMC Genetics, 14, 60. <http://www.biomedcentral.com/1471-2156/14/60>.
- Pendas A, Moran P, Freije J, Garcia-Vazquez E (1994) Chromosomal mapping and nucleotide sequence of two tandem repeats of Atlantic salmon 5S rDNA. Cytogenetic and Genome Research 67, 31–36. <https://doi.org/10.1159/000133792>
- Peres CM, Curi R. 2005. Como cultivar células. 1ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 283p.
- Pham PH, Vo NTK, Tan EJH, Russell S, Jones G, Lumsden JS, Bols NC. 2016. Development of an Atlantic salmon heart endothelial cell line (ASHe) that responds to lysophosphatidic acid (LPA). In Vitro Cell.Dev.Biol. — Animal. DOI 10.1007/s11626-016-0077-2.
- Pinkel D, Straume T, Gray JW. 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 83, 2934–2938.
- Pisano E, Ghigliotti L. 2009. Ribosomal genes in notothenioid fishes: Focus on the chromosomal organization. Marine Genomics, 2, 75–80.

- Porto-Foresti F, Hashimoto DT, Alves AL, Almeida RBC, Senhorini JA, Bortolozzi J, Foresti F. 2008. Cytogenetic markers as diagnoses in the identification of the hybrid between piauçu (*Leporinus macrocephalus*) and piapara (*Leporinus elongatus*). *Genetics and Molecular Biology*: 31, 1, 195-202.
- Rabova M, Monteiro R, Collares-Pereira MJ, Ráb P. Rapid Fibroblast Culture for Teleost Fish Karyotyping. In: Ozouf-Costaz C, Pisano E, Foresti F, Toledo L FA, editors. *Fish Cytogenetic Techniques: Ray-Fin Fishes and Chondrichthyans*. CRC press: 2015, p. 66-73.
- Ramirez JL, Birindelli JLO, Galetti, PM. 2017. A new genus of Anostomidae (Ostariophysi: Characiformes): diversity, phylogeny and biogeography based on cytogenetic, molecular and morphological data. *Mol. Phylogenet. Evol.* 107, 308–323. DOI: 10.1016/j.ympev.2016.11.012.
- Ranera B, Ordovás L, Lyahyai J, Bernal ML, Fernandes F, Remacha AR, Romero A, Vázquez FJ, Osta R, Cons C, Varona L, Zaragoza P, Martín-Burriel I, Rodellar C. 2012. Comparative study of equine bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells. *Equine Vet J*;44:33–42.
- Reddy R, Busch H. 1988. Small Nuclear RNAs: RNA Sequences, Structure, and Modifications. In: Max L. Birnstiel (Ed.) *Structure and Function of Major and Minor Small Nuclear Ribonucleoprotein Particles*. DOI: 10.1007/978-3-642-73020-7, p. 1-37.
- Reis RE, Albert JS, Dario FD, Mincarone MM, Petry P, Rocha LA. 2016. Fish biodiversity and conservation in South America. *Journal of Fish Biology*. DOI:10.1111/jfb.13016.
- Ribeiro LB, Neto AM, Artoni RF, Matoso DA, Feldberg E. 2017. Chromosomal mapping of repetitive sequences (Rex3, Rex6, and rDNA Genes) in hybrids between *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) and *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). *ZEBRAFISH*: 00, 00, 1-6.
- Ribeiro LB, Matoso DA, Feldberg E. 2014. Chromosome mapping of repetitive sequences in four Serrasalminae species (Characiformes). *Genetics and Molecular Biology*, 37, 1, 46-53.
- Romanenko SA, Biltueva LS, Serdyukova NA, Kulemzina AI et al. 2015. Segmental paleotetraploidy revealed in starlet (*Acipenser ruthenus*) genome by chromosome painting. *Molecular Cytogenetics*, 8, 90. DOI 10.1186/s13039-015-0194-8.

- Scacchetti PC, Utsunomia R, Pansonato- Alves JC, da Costa Silva GJ, Vicari MR, Artioni RF. 2015. Repetitive DNA sequences and evolution of ZZ/ZW sex chromosomes in *Characidium* (Teleostei: Characiformes). PLoS ONE, 10, 9, e0137231. DOI:10.1371/journal.pone.0137231.
- Sene VF, Pansonato-Alves JC, Utsunomia R, Oliveira C, Foresti F. 2014. Karyotype diversity and patterns of chromosomal evolution in *Eigenmannia* (Teleostei, Gymnotiformes, Sternopygidae). Comparative Cytogenetics, 8, 4, 301–311. DOI: 10.3897/CompCytogen.v8i4.8396.
- Serrano EA, Utsunomia R, Scudeller PS, Oliveira C, Foresti F. 2017. Origin of B chromosomes in *Characidium alipioi* (Characiformes, Crenuchidae) and its relationship with supernumerary chromosomes in other *Characidium* species. Comparative Cytogenetics, 11, 1, 81–95. DOI: <https://doi.org/10.3897/CompCytogen.v11i1.10886>.
- Silva DMZ, Daniel SN, Camacho JPM et al. 2016. Origin of B chromosomes in the genus *Astyanax* (Characiformes, Characidae) and the limits of chromosome painting. Mol Genet Genomics, 291, 1407. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00438-016-1195-y>.
- Silva DMZ, Utsunomia R, Pansonato-Alves JC, Oliveira C, Foresti F. 2015. Chromosomal Mapping of repetitive DNA sequences in five species of *Astyanax* (Characiformes, Characidae) reveals independent location of U1 and U2 snRNA sites and association of U1 snRNA and 5S rDNA. Cytogenet Genome Res. DOI: 10.1159/000438813.
- Silva DMZ, Pansonato-Alves JC, Utsunomia R, Araya-Jaime C, Ruiz-Ruano FJ, et al. 2014. Delimiting the origin of a B chromosome by FISH mapping, chromosome painting and DNA sequence analysis in *Astyanax paranae* (Teleostei, Characiformes). PLoS ONE, 9, 4, e94896. DOI:10.1371/journal.pone.0094896.
- Silva DS, Peixoto LAW, Pieczarka JC, Wosiacki WB, Ready JS, Nagamachi CY. 2015. Karyotypic and morphological divergence between two cryptic species of *Eigenmannia* in the Amazon basin with a new occurrence of XX/XY sex chromosomes (Gymnotiformes: Sternopygidae). Neotropical Ichthyology, 13, 2, 297-308. DOI: 10.1590/1982-0224-20140160.
- Sobhana KS, George KC, Venkat Ravi G, Ittoop G, Paulraj R. 2009. Development of a cell culture system from gill explants of the grouper , *Epinephelus malabaricus* (Bloch and Shneider). Asian Fisheries Science, 22, 1–6.

- Swaminathan TR, Basheer VS, Gopalakrishnan A, Sood N, Pradhan PK. 2016. A new epithelial cell line, HBF from caudal fin of endangered yellow catfish, *Horabagrus brachysoma* (Gunther, 1864). Cytotechnology, 68, 515–523. DOI 10.1007/s10616-014-9804-2.
- Taju G, Majeed A, Nambi KSN, Hameed S. 2013. Development and characterization of cell line from the gill tissue of *Catla catla* (Hamilton, 1822) for toxicological studies. Chemosphere, 90, 2172–2180.
- Tenório RCCO, Vitorino CA, Souza IL, Oliveira C, Venere PC. 2013. Comparative cytogenetics in *Astyanax* (Characiformes: Characidae) with focus on the cytotaxonomy of the group. Neotropical Ichthyology, 11, 3, 553-564.
- Utsunomia R, Silva DMZ, Ruiz-Ruano FJ, Araya-Jaime C, Pansonato-Alves JC, Scacchetti PC, et al. 2016. Uncovering the ancestry of B Chromosomes in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Teleostei, Characidae). PLoS ONE, 11, 3, e0150573. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150573>.
- 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*. Cytogenet Genome Res, 142, 286–292.
- Vicari MR, Nogaroto V, Noleto RB, Cestari MM, Cioffi MB, Almeida MC, Moreira-Filho O, Bertollo LAC, Artoni RF. 2010. Satellite DNA and chromosomes in Neotropical fishes: methods, applications and perspectives. Journal of Fish Biology, 76, 1094–1116. DOI: 10.1111/j.1095-8649.2010.02564.x.
- Voltolin TA, Laudicina A, Senhorini JA, Bortolozzi J, Oliveira C, Foresti F, Porto-Foresti F. 2010. Origin and molecular organization of supernumerary chromosomes of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae) obtained by DNA probes. Genetica 138:1133-1139.
- Wang X, Yang J, Chen X, Pan X. 2012. Establishment and characterization of a fibroblast-like cell line from *Anabarilius grahami* (Cypriniformes: Cyprinidae). Zoological Research, 33, (E5-6), E89–97.
- Wei YB, Fan TJ, Jiang GJ, Xu XH, Sun A. 2010. A novel heart-cell line from brown-marbled grouper *Epinephelus fuscoguttatus* and its susceptibility to iridovirus. Journal of Fish Biology, 76, 1149 –1158. doi:10.1111/j.1095-8649.2010.02562.x.

- Wei J, Qi WC, Zhou Y et al. 2014. Establishment and characterization of an ovarian cell line from Southern catfish (*Silurus meridionalis*). *Fish Physiol Biochem*, 40, 1383–1391. DOI 10.1007/s10695-014-99329.
- Wolf K, Quimby C, 1976. Primary Monolayer Culture of Fish Cells Initiated from Trypsinized Tissues. *TCA Manual*, 2, 453–456.
- Yano CF, Bertollo LAC, Liehr T, Troy WP, Coiffi MB. 2016. W chromosome dynamics in *Triportheus* species (Characiformes, Triportheidae) - an ongoing process narrated by repetitive sequences. *Journal of Heredity*, 107, 342-348.
- Yano CF, Poltronieri J, Bertollo LAC, Artoni RF, Liehr T, Cioffi MB. 2014. Chromosomal mapping of repetitive DNAs in *Triportheus trifurcatus* (Characidae, Characiformes): insights into the differentiation of the Z and W chromosomes. *Plos One*, 9, 3, e90946.
- Yano CF, Moreira Filho O, Margarido VP. 2014. Interpopulational comparative cytogenetics analysis among three *Astyanax* (Characiformes: *Incertae Sedis*) species of two streams of upper Paraná River basin, Brazil. *Biologia*, 69, 6, 790—798. DOI: 10.2478/s11756-014-0366-8.
- Yadav K, Lakra WS, Sharma J, Goswami M, Singh A. 2012. Development and characterization of a cell line TTCF from endangered mahseer *Tor tor* (Ham.). *Fish physiol. Biochem.*, 38, 1035 – 1045.
- Yu YT, Shu MD, Narayanan A, Terns RM, Terns MP, Steitz JA. 2001. Internal modification of U2 small nuclear (sn)RNA occurs in nucleoli of *Xenopus* oocytes. *J Cell Biol* 152(6):1279–1288.
- Zhang Q, Cooper RK, Wolters WR, Tiersch TR. 1998. Isolation, culture and characterization of a primary fibroblast cell line from channel catfish. *Cytotechnology*, 26(2): 83–90.