

Viviani França de Sene

**Mapa cromossômico e análise citogenética molecular de espécies e populações de peixes
da família Heptapteridae (Siluriformes) nas bacias hidrográficas dos rios Grande, Tietê
e Paranapanema**

Doutorado

Botucatu

2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Mapa cromossômico e análise citogenética molecular de espécies e populações de peixes da família Heptapteridae (Siluriformes) nas bacias hidrográficas dos rios Grande, Tietê e Paranapanema

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

Viviani França de Sene

Orientador: Prof. Dr. Fausto Foresti

Co-orientador: Dr. José Carlos Pansonato-Alves

Botucatu

2016

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

Sene, Viviani França de

Mapa cromossômico e análise citogenética molecular das espécies e populações de peixes da família Heptapteridae (Siluriformes) nas bacias hidrográficas dos rios Grande, Tietê e Paranapanema / Viviani França de Sene. - Botucatu, 2016

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Fausto Foresti
Coorientador: José Carlos Pansonato-Alves
Capes: 20204000

1. Peixe - Genética. 2. Ácido ribonucleico. 3. Marcadores genéticos. 4. Genômica. 5. Transcriptoma.

Palavras-chave: Estruturação genômica ; Heptapteridae; Marcadores cromossômicos ; RNA; Transcriptoma .

Eu não estou longe,
apenas estou
do outro lado do Caminho...

Dedico ao meu especial e imortal avô

Mayael (in memoriam)

AGRADECIMENTOS

Com carinho e gratidão quero expressar os meus mais sinceros agradecimentos, a todos que passaram pelo meu caminho para chegar até aqui e realizar mais um grande sonho. Nunca estamos sós, é verdade, me sinto privilegiada em saber que tenho amigos a quem posso confiar, pessoas que me apoiam e me acolhem sempre com tanto carinho. Ao longo dessa caminhada sou grata a Deus por ter convivido e conhecido tantas pessoas boas, de coração aberto e firme.

Quero agradecer a todos pelo aprendizado, em especial ao meu orientador **Dr. Fausto Foresti**, que além de transmitir seus conhecimentos e suas experiências, sempre esteve ao meu lado, pessoa venerada por sua sabedoria, amigo, sempre abrindo portas e apontando os caminhos.

À minha linda e especial família sempre presente, unida, pessoas as quais eu admiro muito, realmente especiais, trocando gestos de amizade e consideração, me ensinando a cada dia o que é amor.

Aos amigos do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes que tanto me auxiliaram durante o trabalho e por todos os momentos compartilhados, pelos gestos de carinho, atenção, pessoas especiais em sua forma de ser e como são sempre bem vindas as suas ações.

Um agradecimento especial à **Priscilla Cardim Scacchetti**, pelo auxílio e apoio que foram de extrema importância para a finalização desta tese. Amizade e carinho!

Aos amigos que ao longo dessa caminhada tive a oportunidade de conhecer em Botucatu, SP e guardar para sempre dentro do meu coração; são inúmeras, pessoas com as quais dividi casa, dores e muitas alegrias que não passaram por acaso e deixaram muito aprendizado em minha vida, iluminaram de diversas formas o meu caminho. Amigos aos quais levarei para

sempre, como grãos de areia que compõe imensas dunas, gestos de compreensão, ternura e respeito, partes de um amor maior.

Em especial ao **Adauto Cardoso**, tenho sempre um lugar especial guardado para ti, em minha vida sua presença me ilumina com tanta luz e energia que quase não posso acreditar no fato de que tenho um amigo tão especial. Gratidão!

Aos amigos de longa jornada “A gente não faz amigos, reconhece-os” (Vinícius de Moraes).

À Universidade Estadual Paulista (UNESP) por toda estrutura que tive ao longo desses anos de Pós-graduação; às agências de fomentos FAPESP, CAPES e CNPQ.

E ainda, mesmo que a palavra “obrigada” signifique tanto, não expressará por inteiro o quanto tantas pessoas são importantes para mim e passaram pela minha vida fazendo grande diferença, tornando-a ainda mais especial.

Obrigada!

Resumo

Os estudos em citogenética de peixes Neotropicais têm se expandido de modo considerável nos últimos anos, principalmente devido à incorporação de novas técnicas de obtenção e interpretação de dados cariomórficos. O presente estudo se inseriu no programa geral de estudos de Citogenética e Genética Molecular de Peixes Neotropicais que vem sendo desenvolvido no Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (IBB/UNESP/Botucatu). Foram analisadas citogeneticamente, com relação aos aspectos estrutural e molecular cinco espécies de peixes da ordem dos Siluriformes, tendo como foco especial as espécies mais representativas da família Heptapteridae, sendo *Rhamdia quelen*, *Pimelodella avanhadavae*, *Cetopsorhamida iheringi*, *Heptapterus mustelinus* e *Imparfinis mirin* encontrados nos componentes das bacias hidrográficas dos rios Grande, Tietê e Paranapanema, no Estado de São Paulo, além de espécimes de *Pimelodella elongata*, provenientes do Rio Dos Bocas (03°16'07.6"S 079°44'14.8"W) Province El Oro, Equador. As análises de citogenética clássica envolveram a aplicação das técnicas de coloração por Giemsa para a caracterização do número diploide das espécies, que mostrou variação entre $2n=46$ a $2n=58$ cromossomos e o bandamento C para a localização de regiões heterocromáticas, além de técnicas de citogenética molecular com produção de sondas e mapeamento dos genes de DNAr 5S e 18S e mapeamento físico de 4 sequências de microsatélites ((CA)₁₅, (GA)₁₅, (CG)₁₅ e (TTA)₁₀). Além disso, foi realizado a extração de RNA de pele em espécies de *Rhamdia* e *Pimelodella* para análise de seu transcriptoma. A integralização de abordagens em nível estrutural e molecular no estudo dos cromossomos permitiu a compreensão de questões relacionadas à biologia evolutiva dos componentes da família Heptapteridae e, por conseguinte, dos mecanismos envolvidos nos processos de diferenciação e de especiação dos peixes Neotropicais.

Abstract

Studies on cytogenetics of the Neotropical fishes have expanded considerably in recent years, mainly due to the incorporation of new techniques for collecting and interpreting karyomorphic data. This study forms part of the general program of Cytogenetics and Genetics studies Neotropical Fish Molecular being developed in the Laboratory of Biology and Genetics Fish (IBB / UNESP / Botucatu). Species and fish populations of the order of Siluriformes were cytogenetically analyzed with respect to structural and molecular aspects, with the special focus on the most representative species of Heptapteridae family, *Rhamdia quelen*, *Pimelodella avanhadavae*, *Cetopsorhamida iheringi*, *Heptapterus mustelinus* and *Imparfinis mirini* found in components of river basins of the Grande, Tiete and Paranapanema rivers, in the State of São Paulo, as well as specimens of *Pimelodella elongata*, were collected at Dos Bocas (03°16'07.6"S 079°44'14.8"W) in the Province El Oro, Ecuador. The karyomorph analyzes involved the results obtained by using Giemsa staining techniques for the characterization of the diploid number of the species, which showed variation between $2n=46$ to $2n=58$ chromosomes, C-banding and chromosome location for the heterochromatic regions, as well as techniques of molecular cytogenetics in the production of probes and mapping of 5S rDNA and 18S genes and physical mapping of microsatellite sequences 4 ((CA)₁₅, (GA)₁₅, (CG)₁₅ e (TTA)₁₀). and extraction of RNA of the species *Rhamdia* and *Pimelodella* for analysis of their transcriptome. The approach involving structural and molecular levels in the study of chromosomes allowed the understanding of questions related to evolutionary biology of the Heptapteridae family components and therefore the mechanisms involved in the processes of differentiation and speciation of Neotropical fish.

Sumário

1	Introdução	1
1.1	Considerações sobre a citogenética: Avanços técnicos em peixes	1
1.2	Citogenética Molecular: construção de mapas genéticos	2
1.3	DNAs repetitivos: seu papel na organização do genoma.....	5
1.4	Considerações sobre a ordem Siluriformes e a família Heptapteridae	8
1.5	Análise dos padrões de coloração em Peixe: Transcriptoma como ferramenta..	11
2	Objetivos.....	14
3	Materiais e Métodos	15
3.1	Materiais	15
3.1.1	Espécies estudadas e locais de coleta	15
3.2	Métodos.....	18
3.2.1	Obtenção de células mitóticas.....	18
3.2.2	Obtenção dos cromossomos metafásicos mitóticos.....	19
3.2.3	Coloração convencional com Giemsa.....	20
3.2.4	Caracterização das regiões organizadoras de nucléolo (Ag-NOR).....	21
3.2.5	Deteção da heterocromatina constitutiva (banda C)	21
3.3	Métodos Moleculares	22
3.3.1	Extração de DNA genômico	22
3.3.2	Preparação das sondas de DNA para hibridação fluorescente in situ (FISH)....	22

3.3.2.1 Preparação das sondas de DNA 5S e 18S	22
3.3.2.2 Preparação das sondas de microssatélites (GA) ₁₅ , (GC) ₁₅ , (TTA) ₁₀ e (CA) ₁₅	24
3.3.2.3 Hibridação in situ fluorescente (FISH)	24
3.4 Montagem dos cariótipos	26
3.3.3 Estudos transcriptoma	27
3.3.3.1 Extração de RNA	27
3.3.3.2 Preparação da biblioteca e sequenciamento Illumina	27
3.3.3.3 Análise de sequências, montagem dos contigs e detecção de SNPs	28
4 Resultados e Discussão	29
 4.1 Capítulo 1: Mapeamento cromossômico de microssatélites e DNAr 5S e 18S em espécies de Heptapteride (Teleostei: Siluriformes): acúmulo de DNA repetitivo nos cromossomos e sua atuação na diferenciação cariotípica.	30
 4.2 Capítulo 2: Análise do transcriptoma de células de pele de <i>Pimelodella avanhandavae</i> e <i>Rhamdia quelen</i> (Teleostei: Heptapteridae): busca por genes de coloração.	50
 5 Considerações finais	76
 6 Referência Bibliográficas	78

1 Introdução

1.1 Considerações sobre a citogenética: avanços técnicos em peixes

A citogenética vem contribuindo de modo efetivo não só para estudos taxonômicos e filogenéticos, como também para uma maior compreensão da estrutura dos cromossomos dos vertebrados devido ao seu grande avanço nos últimos anos, principalmente à utilização de novas técnicas. Hoje esses avanços técnicos têm se refletido nos estudos citogenéticos em peixes, resultando numa expansão considerável do número de espécies estudadas. Na região Neotropical já foram analisadas cerca de 1040 espécies de peixes de água doce, sendo 475 da ordem Characiformes, 318 espécies de Siluriformes, 48 espécies de Gymnotiformes e 199 espécies que não pertencem à superordem Ostariophysi (revisão em Oliveira et al., 2007). Este levantamento aponta ainda que a ocorrência de cromossomos supranumerários foi descrita em 38 espécies e que a presença de cromossomos sexuais foi identificada em 62 espécies, sendo que 40 delas apresentaram heterogametia feminina e 22 mostraram heterogametia masculina. Estes resultados mostram um aumento substancial das informações cariotípicas em peixes, se comparados ao levantamento realizado por Oliveira et al. (1988a). Contudo os dados são ainda incipientes, se considerarmos que podem existir cerca de 6.000 espécies de peixes distribuídas nessa região biogeográfica (Reis et al., 2003).

A crescente aplicação de técnicas de bandamento cromossômico a partir de 1970, notadamente as de bandas C, as bandas obtidas por tratamentos com endonucleases de restrição e o emprego de fluorocromos base específicos como a Cromomicina A3 e o DAPI, permitiram não só uma melhor caracterização da diversidade cariotípica, como também uma melhor compreensão da estrutura dos cromossomos dos peixes e o entendimento das relações evolutivas existentes entre diferentes táxons (revisão em Almeida-Toledo et al., 2000b). Mais recentemente, o desenvolvimento de sondas específicas como aquelas para genes ribossomais

e de histonas, constituídas por sequências de DNA de moderada repetitividade, as de DNA altamente repetitivo (DNA satélite) como aquelas para os sítios de retrotransposons Rex 1 e Rex 3 e o advento da utilização da técnica de microdissecção cromossômica, método que possibilita o isolamento direto de DNA de qualquer região citogeneticamente reconhecida do genoma, tem possibilitado a identificação e hibridização de segmentos específicos de DNA em cromossomos metafásicos, através da técnica denominada FISH (Fluorescent in situ hybridization). Esse tipo de abordagem citogenética em nível molecular permite, ao se estudar porções diferenciais da cromatina nos cromossomos, obter informações mais precisas acerca da presença de determinadas sequências de DNA, detectar rearranjos cromossômicos, determinar a origem de cromossomos, construir mapas gênicos e até mesmo estabelecer relações filogenéticas entre as espécies, além das técnicas revelarem características mais detalhadas sobre o genoma pela presença de bandas longitudinais nos cromossomos, composição de heterocromatina, particularidades estruturais e funcionais das regiões organizadoras de nucléolos, entre outras (revisão em Sumner 1972, 1990; Phillips e Reed, 1996; Henning, 2007, Sene et al., 2015).

O estudo citogenético contínuo e sistemático de determinados grupos de peixes tem levado ao esclarecimento de questões taxonômicas, à identificação de espécies crípticas, assim como a um melhor entendimento tanto da estrutura e variabilidade cromossômica quanto dos processos evolutivos que envolvem o cariótipo dos peixes, que ocorrem em grande diversidade na região Neotropical.

1.2 Citogenética Molecular: construção de mapas genéticos

Marcadores citogenéticos e genéticos de DNA têm sido desenvolvidos para o mapeamento de segmentos cromossômicos e revelação da sua estrutura e atividade gênica, mas também têm sido empregados com grande sucesso na aquicultura, com o objetivo de

identificar espécies e populações, bem como de melhorar traços importantes nos estoques de peixes, como o aumento do crescimento e a resistência a doenças. Diversos marcadores moleculares vêm sendo utilizados para a construção de mapas genéticos, que podem oferecer benefícios particulares para a aquicultura, especialmente para a identificação de estoques, análises de características quantitativas, cruzamentos seletivos e acesso à variabilidade genética das populações (Hashimoto et al., 2010). A construção dos mapas genéticos é de grande importância também para estudos comportamentais, morfológicos, fitogeográficos e evolutivos, entre outros.

Os mapas genéticos podem ser construídos atualmente de três maneiras: (1) pelo mapeamento físico, que localiza segmentos de DNA nos cromossomos e nos cariótipos das espécies por metodologias citogenéticas; (2) por métodos que envolvem o estabelecimento de mapas genéticos de ligação, destinados a ordenar os marcadores moleculares nos cromossomos com base na frequência de recombinação entre os locos gênicos e, (3) com base no sequenciamento completo de nucleotídeos do genoma de uma espécie (Martins et al., 2004). Em ciclídeos, que representam um grupo de peixes bastante estudado atualmente, a construção de bibliotecas genômicas para o mapeamento genético das espécies está voltada para as espécies africanas como *Oreochromis niloticus* (Katagiri et al., 2001) e *Haplochromis chilotes* (Watanabe et al., 2003). Além disto, já existe um mapa genético de ligação descrito na literatura construído a partir de sequências microssatélites e AFLPs (Anonymous Fragment Length Polymorphisms) (Kocher et al., 1998), bem como o primeiro mapa físico que reúne todos os tipos de sequências repetitivas já mapeadas nos cromossomos de *Oreochromis niloticus* (Martins et al., 2004).

A microdissecção cromossômica é um método confiável para o isolamento direto de DNA de qualquer região do genoma citogeneticamente reconhecida. O material dissecado pode ser usado para várias aplicações, incluindo a elaboração de sondas para FISH,

construção de bibliotecas cromossômicas banda-específicas e o mapeamento físico dos cromossomos para análise citogenética. A técnica de microdissecção foi introduzida inicialmente em citogenética humana (Bates et al., 1986), com a construção de uma biblioteca do cromossomo 2 usando-se fragmentos cromossômicos dissecados de metáfases não coradas ou bandeadas. Posteriormente, Ludecke et al. (1989) elaboraram um procedimento de microdissecção no qual foi utilizada a técnica de PCR (Polimerase Chain Reaction) para amplificar as pequenas quantidades de DNA dos fragmentos cromossômicos dissecados, sendo que este método foi aperfeiçoado por Senger et al. (1990) que dissecaram com sucesso bandas específicas de cromossomos bandeados com a técnica GTG. No início da década de 90, Meltzer et al. (1992) e Deng et al. (1992) desenvolveram a técnica de micro-FISH, na qual a microdissecção cromossômica é seguida pela amplificação do material dissecado via PCR, utilizando-se um primer degenerado (DOP – Degenerated Oligonucleotide Primer), sendo, então o produto desses PCR utilizado como sonda para FISH.

A técnica de micro-FISH permite a localização cromossômica de sequências específicas, a detecção de anormalidades cromossômicas e a “pintura” de cromossomos inteiros (Trask, 1991). Em humanos, quando aliada às metodologias de citogenética clássica, esta técnica tem sido uma poderosa ferramenta da genética clínica na caracterização de complexos rearranjos cromossômicos (Meltzer et al., 1997; Wiltshire et al., 2001; Nuntakarn et al., 2002; Hu et al., 2004; entre outros). No contexto da evolução cromossômica, a metodologia de micro-FISH tem sido utilizada também na identificação dos rearranjos cromossômicos envolvidos no processo evolutivo de primatas (Taguchi et al., 2003; Nieves et al., 2005; Neusser et al., 2005), cervídeos (Li et al., 2005) e roedores (Fagundes et al., 2000; Marchal et al., 2004), entre outros. Neste contexto, e levando-se em consideração que a pintura cromossômica tem sido amplamente utilizada em estudos citogenéticos e evolutivos em outros grupos, esta técnica poderia caracterizar-se como uma tecnologia muito promissora

na análise de homologias e diferenciação cromossômica em peixes. Os primeiros trabalhos relacionados à microdissecção cromossômica em citogenética de peixes Neotropicais envolveram os cromossomos sexuais de representantes do gênero *Eigenmannia* onde recentemente (Henning et al., 2007 e Sene et al., 2014) utilizaram sondas confeccionadas a partir dos cromossomos X e Y microdissectados de duas espécies do gênero *Eigenmannia* com grande sucesso, realizando inferências sobre a origem dos cromossomos sexuais nas espécies estudadas.

1.3 DNA repetitivo: seu papel na organização do genoma

As sequências de DNA repetitivo constituem a maior fração do genoma dos eucariotos se dividindo em duas classes: repetições em tandem (satélites, minissatélites e microsatélites) e elementos dispersos (transposons e retrotransposons) (Ferreira et al., 2011; Cioffi et al., 2012; Sene et al., 2015). Embora algumas sequências de DNA repetitivo possuam funções claras, como DNA ribossomal, centromérico e telomérico, outras até recentemente foram consideradas como DNA lixo (Biémont e Vieira, 2006). No entanto, estudos demonstram sua grande importância na manutenção da estrutura genômica, sendo sua formação um processo contínuo e provavelmente mais antigo que a divergência das primeiras linhagens de eucariotos (Jurka et al., 2005).

Diversos estudos demonstram sua importância no processo de expressão gênica (Liu et al., 2001), recombinação (Biet et al., 1999) e replicação no DNA (Li et al., 2002), tendo também um importante papel na organização estrutural e funcional dos cromossomos e nos processos de diferenciação sexual, como visto em estudos recentes em *Oreochromis niloticus* (Martins, 2007; Ferreira e Martins, 2008) em espécies do gênero *Triplotheus* (Yano et al., 2014) e ainda em espécies do gênero *Eigenmannia* (Sene et al., 2015). Sugere-se, ainda, que estas sequências repetitivas estejam envolvidas em rearranjos cromossômicos, como deleções,

duplicações, inversões e translocações, tendo grande influência nas variações cariotípicas observadas em muitos grupos (Kidwell, 2002). As moléculas de RNA ribossomal são codificadas por duas famílias multigênicas distintas, a primeira corresponde ao rDNA 45S que está organizado em matrizes em tandem contendo unidades de transcrição para os genes rDNA 18S, 5.8S e 28S, enquanto a segunda família ribossomal transcreve o rRNA 5S. As duas classes de rDNA 45S e 5S têm sido extensivamente mapeadas em genomas de peixes (Cioffi e Bertollo, 2012).

Na maioria das espécies, estas duas classes se apresentam em cromossomos diferentes enquanto em outras elas ocorrem em sintenia, como é o caso de todas as espécies estudadas do gênero *Prochilodus*, as quais apresentam sintenia dos genes ribossomais 45S e 5S (Jesus e Moreira-Filho, 2003; Voltolin et al., 2013). As sequências de DNA ribossomal em peixes apresentam diferentes níveis de variação entre os grupos (Vicari et al., 2010; Ugarkovic & Plohl, 2002), e seus padrões de variação têm sido informativos sobre os processos microevolutivos e filogenéticos desses grupos (Vicari et al., 2008; Molina et al., 2012). Estas sequências podem ser facilmente isoladas e encontram-se distribuídas em diversas regiões do genoma, gerando sinais de fácil visualização após hibridização nos cromossomos (Martins et al., 2006). Os primeiros trabalhos de mapeamento físico através das hibridizações *in situ* utilizando como sondas sequências de DNAs repetidos foram feitos com DNA ribossomais (rDNA) 28S, 18S, 5.8S e 5S (Martins et al., 2006).

Os microssatélites, também conhecidos como repetições de sequências simples, consistem de motifs curtos (1 a 6 nucleotídeos de comprimento) organizadas por matrizes em tandem (Cioffi e Bertollo, 2012). Esta região genômica possui a capacidade de dar origem a variantes com um número diferente de repetições, podendo ser organizados em trechos longos que consistem de centenas a milhares de unidades de sequências e geralmente associadas à heterocromatina constitutiva em diversas espécies (Martins, 2007). Os microssatélites estão

presentes nos centrômeros e telômeros dos cromossomos dos eucariotos, desempenhando funções na manutenção e propagação do material genético nuclear, já que várias proteínas se ligam por afinidade a estas sequências (Csink e Henikoff, 1998). Além disso, o estudo das sequências de DNA repetitivo é importante para o conhecimento da estrutura cromossômica, além da origem e evolução dos cromossomos B cuja composição já estudada indica ser principalmente de DNA repetitivo e sexuais, onde as regiões teloméricas dos cromossomos W e Y apresentam um grande bloco heterocromático em relação aos respectivos Z e X (Martins et al., 2004; Galetti & Martins, 2004; Parise-Maltempi et al., 2007; Schemberger et al., 2011; Pansonato-Alves et al., 2011). Estudos evidenciados no genoma de *Hoplias malabaricus*, utilizando 12 diferentes microssatélites resulta na hibridização em regiões subteloméricas e heterocromáticas de vários autossomos, com uma quantidade diferenciada de sinal entre os cromossomos sexuais (Cioffi et al., 2011).

Em estudos com peixes, os dados disponíveis com sondas de DNAr 5S demonstram o predomínio a ocorrência de apenas um par cromossômico portador deste gene ribossômico em Siluriformes (Kavalco et al., 2004) e, em alguns casos, mostraram-se eficientes para diferenciar espécies próximas (Garcia, 2005). Já a compactação do genoma dos vertebrados de sangue-frio, no entanto, distingue-se consideravelmente quando comparada à dos vertebrados de sangue-quente e essa diferença seria umas das dificuldades que impossibilitariam a obtenção de bandas longitudinais estruturais nos cromossomos dos peixes (Galetti Jr e Martins, 2004). Esta característica ocasionou um “gap” em relação à nomenclatura, pareamento e descrição de processos estruturais que envolvem determinadas regiões cromossômicas em peixes. O estudo da distribuição cromossômica do DNA repetitivo no genoma de peixes, embora relativamente recente, é uma ferramenta importante na análise da organização genômica e evolução das espécies (Cioffi e Bertollo, 2012).

1.4 Considerações sobre a ordem Siluriformes e a família Heptapteridae

Os peixes da família Heptapteridae estão amplamente distribuídos na região Neotropical, sendo uma das famílias mais representativa dentro da ordem Siluriformes; popularmente são conhecidos como “bagres”, “mandis” e “peixes-gato”. Essa família faz parte da superordem Ostariophysi, que possui 38 famílias, aproximadamente 485 gêneros e 2800 espécies (Nelson, 2006).

Os componentes desta ordem podem ser facilmente identificados morfologicamente devido à presença de um corpo nu envolto por pele espessa e que pode apresentar-se total ou parcialmente coberto por placas ósseas (Britski et al., 1988). As nadadeiras são raiadas e bem separadas, sendo que nas nadadeiras dorsais e peitorais o primeiro raio se apresenta como um acúleo forte e pungente; as nadadeiras adiposas encontram-se geralmente presentes e bem desenvolvidas, enquanto a nadadeira caudal assume formato variável. Caracterizam-se, ainda pela presença de três pares de barbilhões sensitivos (Mees, 1974).

Os exemplares nas diferentes espécies se apresentam com tamanhos característicos, desde pequeno até grande porte e hábitos sedentários, que contribuem para dificultar a superação de obstáculos como cachoeiras ou corredeiras que se interpõem às suas raras migrações. Ocupam geralmente o fundo dos rios, escondendo-se por entre as pedras e a vegetação (Britski, 1981) e são caracterizados por desenvolverem atividades predominantemente crepusculares ou noturnas, quando saem à procura de alimento constituído principalmente por vermes e insetos, utilizando-se principalmente de seus sentidos químicos (olfato e gustação) (Sterba, 1973).

Os estudos taxonômicos envolvendo os representantes deste grupo realizados por Lundberg et al., (1991a; 1991b) e de Pinna (1998) reconheceram a existência de três grupos monofiléticos dentro da família Pimelodidae, equivalentes às subfamílias Pimelodinae,

Heptapterinae (Rhamdiinae) e Pseudopimelodinae. Estudos filogenéticos e de características morfológicas elevaram estes grupos à categoria de famílias (Nelson, 2006; Ferraris, 2007). Nesse sentido, os estudos citogenéticos auxiliaram no estabelecimento das três famílias, que apresentaram números diplóides predominantes característicos de 54, 56 e 58 cromossomos em Pseudopimelodidae, Pimelodidae e Heptapteridae, respectivamente (Swarça et al., 2000; Garcia, 2005; Martinez et al., 2008 a Kante et al., 2015).

A família Heptapteridae é composta por 25 gêneros sendo eles: Acentronichthys, Brachyglanis, Brachyrhamdia, Cetopsorhamdia, Chasmocranus, Gladioglanis, Goeldiella, Heptapterus, Horiomyzon, Imperales, Imparfinis, Leptorhamdia, Mastiglanis, Medemichthys, Myoglanis, Nannoglanis, Nannorhamdia, Nemuroglanis, Pariolinus, Phenocorhamdia, Pimelodella, Rhamdella, Rhamdia, Rhamdioglanis e Rhamdiopsis. Já a família Pimelodidae é atualmente formada por 32 gêneros, enquanto a família Pseudopimelodidae é representada por quatro gêneros (Lundberg et al., 1991; Pinna, 1998).

Os representantes da ordem Characiformes, juntamente com os da ordem Siluriformes, representam os grupos que concentram o maior número de informações citogenéticas. No entanto, a maioria das publicações de estudos citogenéticos sobre este último grupo são mais recentes, restringindo-se somente a algumas espécies dos gêneros Pimelodella e Rhamdia, da família Heptapteridae, sendo os primeiros estudos documentados por Toledo e Ferrari (1976). Os resultados citogenéticos obtidos com as espécies já analisadas revelam uma macroestrutura cariotípica que pode variar de 42 a 62 cromossomos (Toledo e Ferrari, 1976; Margarido e Moreira-Filho, 2008), com predomínio das espécies apresentando número diplóide de 58 cromossomos. Deste modo o número fundamental (NF) apresenta-se relativamente alto, variando de 84, como visto em Pimelodella sp. (Toledo e Ferrari, 1976) a 116, encontrado em Rhamdia quelen (Maistro et al., 2002; Garcia et al., 2003), com predomínio de cromossomos dos tipos metacêntricos e submetacêntricos.

Neste grupo de peixes os cromossomos geralmente apresentam tamanho reduzido, o que dificulta a identificação da sua morfologia e a localização de bandas. Polimorfismos estruturais e numéricos vêm sendo frequentemente descritos entre os representantes da família Heptapteridae, na forma de triploidia natural (Garcia et al., 2003; Silva et al., 2008), ocorrência de cromossomos B ou supranumerários (Almeida-Toledo et al., 1992, Almeida-Toledo e Garcia, 2008) e de sistema de cromossomos sexuais simples do tipo XX/XY (Dias e Foresti, 1993; Almeida-Toledo e Garcia, 2008), além de variações no número e distribuição dos blocos heterocromáticos (Vasconcelos e Martins-Santos, 2000; Almeida-Toledo e Garcia, 2008).

Estudos específicos da heterocromatina constitutiva entre os representantes da família Heptapteridae foram realizados no gênero *Rhamdia*; entretanto, informações mais detalhadas sobre as características destes segmentos genômicos ainda são escassos. Fenocchio e Bertollo (1990), Fenocchio et al., (2000) e Maistro et al., (2002) encontraram apenas pequena quantidade de heterocromatina distribuída pelo genoma das espécies, com as bandas apresentando-se pálidas quando estudaram populações de *Rhamdia hilarii*, enquanto as RONS mostraram coincidência com regiões heterocromáticas, bem como em ambas as regiões teloméricas de alguns cromossomos metacêntricos. Contudo, relatos da ocorrência de cromossomos supranumerários em Heptapterídeos têm se mostrado pouco frequentes, sendo restritos a alguns gêneros como em *Pimelodella* (Almeida-Toledo et al., 1992; Almeida-Toledo e Garcia, 2008) e *Rhamdia*, onde apresentam marcante polimorfismo numérico, podendo variar entre um a sete cromossomos.

Espécies que mostraram uma macroestrutura cariomórfica conservada como a família Heptapteridae puderam ser diferenciadas pela aplicação de diferentes técnicas como bandeamentos cromossômicos do tipo bandamento C, para evidenciar as regiões ricas em heterocromatina, localização das regiões organizadoras de nucléolos funcionalmente ativas na

interfase anterior pela coloração com Nitrato de Prata (Ag-NOR), além da aplicação da técnica de FISH, que proporciona a localização *in situ* de sequências de DNA nos cromossomos metafásicos. A inclusão da aplicação de técnicas moleculares nos estudos cariotípicos permitiram abordagens sobre aspectos evolutivos neste grupo.

1.5 Análise dos padrões de coloração em peixes: transcriptoma como ferramenta

Estudar os padrões de coloração é fundamental para compreender o processo evolutivo, assim entender como os genes se relacionam no desenvolvimento do fenótipo destes organismos. Interações positivas, como as associações mutualistas, pode ter um papel importante na manutenção da estrutura da comunidade, e compensar os efeitos negativos da concorrência sobre nichos específicos. Um único estudo, realizado em borboletas com mimetismo Mulleriano, evidenciou de forma convincente que borboletas imitadoras convergem espacialmente, considerando a utilização do habitat, ao passo que o consumo de recursos e nicho trófico foram indiretamente inferidos como correlacionados a outras variáveis (como a estrutura da floresta, topografia e altura de vôo) (revisão em Alexandrou et al., 2011). Como ferramenta para os estudos foram primeiras tentativas foram propostas para o sequenciamento do genoma humano constituíram apenas o começo de um grande avanço da era moderna de sequenciamento de DNA, que resultaram no desenvolvimento de novas estratégias e sequenciamento de milhares de genes de uma só vez através da quantificação dos níveis de mRNA, para criar uma imagem da função celular. Esses avanços recentes nas tecnologias de sequenciamento permitiram gerar transcriptomas em quase todas as espécies de interesse (revisão em Yang et al, 2014).

Quando sequencias do genoma não estão disponíveis, o sequenciamento do transcriptoma se apresenta como uma abordagem rápida e eficaz para a obtenção de genes

codificadores de proteínas. Estudos recentes realizados por Yang et al (2014) geraram o primeiro transcriptoma do peixe *Gymnodictyus pachycheilus* utilizando tecnologia de sequenciamento de alto rendimento. A caracterização do transcriptoma de forma abrangente e evolutiva foi posteriormente utilizada em análises conjuntas com outros genomas de peixes disponíveis para investigar e elucidar possíveis mecanismos de adaptação. Outro estudo realizado mostrou as vantagens no sequenciamento do transcriptoma de *Tripterygion delaisi* realizado a partir de análises do cérebro no período reprodutivo e evidenciou a plasticidade fenotípica como um fator importante na expressão diferencial de genes relacionados ao dimorfismo sexual nessa espécie (revisão em Schunter et al. 2014).

No que se refere à anotação e análise genômica, a utilização de transcriptomas mostrou-se uma solução promissora na resolução de questões particulares, como no caso da espécie de ave *Parus major*, em que foram utilizadas as sequências transcritas de RNA a fim de construir um primeiro transcriptoma de referência para esse grupo de organismos (Santure et al. 2011) e permitiu também a investigação de genes parálogos, splice variantes e a distribuição de microssatélites de músculo esquelético em dourada (*Spaurus aurata*) (Serrana et al. 2012). Outro estudo interessante realizado em peixes da família *Corydoradinae* Alexandrou et al. (2011) evidenciaram características que os tornam uma espécie fascinante para estudar a evolução dos padrões de pigmentação dos vertebrados. A investigação da base genética do mimetismo e da evolução convergente do padrão de coloração foram importantes para entender os processos de adaptação e a coevolução conduzidas pela predação, além de evidenciar que o grupo passou por uma série de duplicação do genoma inteiro.

Inúmeros trabalhos relatam estudos sobre a análise do perfil transcricional em respostas a diferentes variações ambientais e condições biológicas. Contudo, até o presente momento, pouco se sabe em relação a análise de transcriptomas de espécies da família *Heptapteridae*. Considera-se, pois, que a comparação desses dados com os de outras espécies

da mesma família e de famílias relacionadas permitirá compreender a importância e o papel dos genes envolvidos na determinação do padrão de coloração em peixes.

2 Objetivos

Tendo em vista a eficiência da aplicação de técnicas citogenéticas somada à utilização de novos marcadores citogenéticos moleculares, os objetivos do presente trabalho consistiram em mapear e comparar a localização de sequências específicas de DNA em espécies da família Heptapteridae que ocorrem em diferentes bacias hidrográficas brasileiras, com a finalidade de:

1 - ampliar o conhecimento sobre a estrutura cromossômica dos Heptapteridae, estabelecendo e comparando a constituição cariotípica de espécies que ocorrem principalmente nos componentes das bacias hidrográficas dos rios Grande, Tietê e Paranapanema, no Estado de São Paulo;

2 - mapear os genes de média repetitividade, representados pelas sequências de DNAr 5S e 18S, identificando sua posição cromossômica nas diferentes espécies com a utilização da técnica de hibridação in situ fluorescente (FISH);

3 - caracterizar a localização cromossômica de quatro tipos de microssatélites nos genomas das diferentes espécies analisadas afim de verificar o acúmulo de DNA repetitivo nos cromossomos e sua atuação na diferenciação cariotípica;

4 - contribuir com informações que auxiliem na compreensão dos mecanismos envolvidos no processo de diversificação da família Heptapteridae e dos peixes, em geral.

3 Materiais e Métodos

3.1 Materiais

3.1.1 Espécies estudadas e locais de coleta

No presente trabalho foram analisados exemplares das espécies mais representativas da família Heptapteridae nos componentes das bacias hidrográficas dos rios Grande, Tietê e Paranapanema, no Estado de São Paulo, sendo elas: *Rhamdia quelen*, *Pimelodella avanhadavae*, *Cetopsorhamdia iheringi*, *Heptapterus mustelinus* e *Imparfinis mirini*, coletados em diferentes locais indicados na Tabela 1.

De cada indivíduo, foram retirados fragmentos de tecido renal para estudos citogenéticos e também fragmentos de tecido do fígado e músculos, que foram fixados em etanol 95% para estudos moleculares. Também foram obtidas amostras de uma camada da derme para extração de RNA, que foram preservada em RNALater. Os exemplares utilizados na amostragem foram fixados e conservados em álcool 70% e depositados na coleção de Peixes do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes do Departamento de Morfologia, UNESP de Botucatu-SP.

Tabela 1. Exemplos de peixes da família Heptapteridae analisados, locais de coleta e indicações de identificação dos exemplares analisados. LBP: Coleção de Peixes Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP.

Espécies	Localidade	Município	LBP	Coordenadas
<i>R. quelen</i>	Ribeirão	São Carlos-SP	20096	S 21°46'26.6'' W 47°46'53.2''
<i>R. quelen</i>	Mogi-Guaçu	Araras-SP	20098	S 21°56'35'' W 47°23'04''
<i>R. quelen</i>	Ribeirão Claro	Rio Claro-SP	20100	S 22°21'28.3'' W 47°30'51.4''
<i>R. quelen</i>	Tributário do Rio Turvo	Jardinópolis-SP	20104	S 21°00'32.4'' W 47°45'09.5''
<i>R. quelen</i>	Rio Pardinho Véu de Noiva	Botucatu-SP	20105	S 22°29'27.11'' W 48°25'39.13''
<i>R. quelen</i>	Araquá	Botucatu-SP	20106	S 22°44'50.29'' W 48°28'31.18''
<i>R. quelen</i>	Alambari	Botucatu-SP	20107	S 22°44'56.08'' W 48°19'16.90''
<i>R. quelen</i>	Capivara	Botucatu-SP	20109	S 22°45'24.6'' W 48°21'56.74''
<i>P. avanhadavae</i>	Araquá	Botucatu-SP	20094	S 22°44'50.29'' W 48°28'31.18''
<i>P. avanhadavae</i>	Mogi-Guaçu	Araras-SP	20097	S 21°56'35'' W 47°23'04''
<i>P. elongata</i>	Dos Bocas	El Oro Ecuado	Universidad Machala	S 03°16' 07. 6'' W 79°44'14. 8''
<i>C. iheringi</i>	Ribeirão Claro	Rio Claro-SP	20099	S 22°21'28.3'' W 47°30'51.4''
<i>C. iheringi</i>	Córrego da Quinta	Itatinga-SP	20102	S 23°06'30.7'' W 48°30'18.1''

<i>H. mustelinus</i>	Córrego da Quinta	Itatinga-SP	20101	S 23°06'30.7'' W 48°30'18.1''
<i>I. mirini</i>	Araquá	Botucatu-SP	20103	S22°44'50.29'' W48°28'31.18''

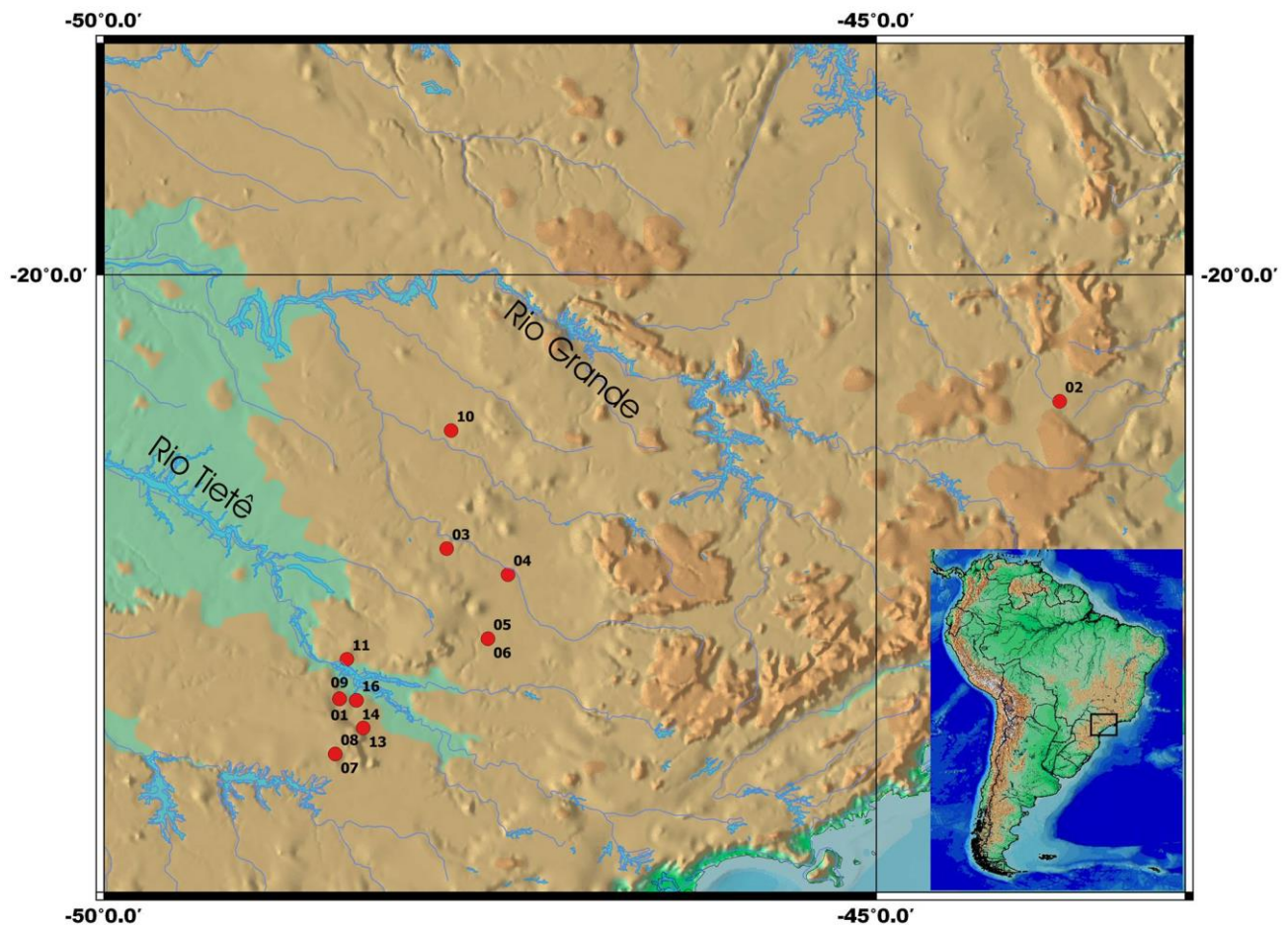


Figura 1. Mapa com indicação dos locais de coleta dos exemplares estudados no presente trabalho em componentes de diferentes bacias hidrográficas. Em 1 *Pimelodella avanhadavae*, 2 *Rhamdia quelen*, 3 *R. quelen*, 4 *P. avanhadavae*, 5 *R. quelen*, 6 *Cetoporsorhamida iheringi*, 7 *R. quelen*, 8 *Heptapterus mustelinus*, 9 *C. Iheringi*, 10 *Imparfinis mirini*, 11 *R. quelen* 12 *R. quelen*, 13 *R. quelen*, 14 *R. quelen*, 15 *Imparfinis mirini*, 16 *R. quelen*.

3.2 Métodos

Para a análise citogenética convencional foram utilizados os métodos de estimulação de mitoses (Cole & Leavens 1971), preparação direta de células renais (Foresti et al. 1981) e identificação da heterocromatina constitutiva (Sumner 1972).

Para a análise citogenética molecular foi utilizada a técnica de FISH para a localização cromossômica das sequências de DNAr 5S e 18S, sequências de detecção dos microssatélites (GA)₁₅, (GC)₁₅, (TTA)₁₀ e (CA)₁₅ e extração de RNA.

3.2.1 Obtenção de células mitóticas

Com o objetivo de se obter maior índice mitótico nas preparações foi utilizada a técnica de injeção prévia nos animais de uma solução de fermento biológico, conforme descrito por Cole and Levans (1971) para anfíbios e répteis e adaptada por Oliveira et al. (1988a) para peixes. O procedimento utilizado consiste em:

1. preparar solução de fermento biológico (Fleischman) na seguinte proporção: 0,5g de fermento, 0,5g de açúcar e 7ml de água destilada. A solução é incubada em uma estufa à 37 °C por cerca de 20 minutos;
2. injetar a solução na região dorso-lateralmente do peixe na proporção de 1 ml/100 g de peso do animal, que será deixado em aquário bem aerado por um período de 48 horas, aproximadamente;
3. proceder à técnica para a obtenção de cromossomos mitóticos.

Antes de cada procedimento com os animais, estes foram submetidos à anestesia com solução aquosa de Benzocaína. Fragmentos de tecidos de rim foram utilizados para a obtenção de preparações cromossômicas visando o estudo cariotípico das espécies.

3.2.2 Obtenção dos cromossomos metafásicos mitóticos

Para obtenção dos cromossomos metafásicos foi utilizada a técnica proposta por Foresti et al. (1981), com algumas adaptações. Essa metodologia envolve, basicamente, a inibição da polimerização dos microtúbulos pela colchicina, a hipotonização das células em suspensão e sua fixação pela mistura de metanol/ácido acético. O procedimento consiste em:

1. anestesiando o animal em solução de benzocaína a 0,01%
2. injetar intraperitonealmente nos indivíduos solução colchicina (0,01%) na proporção de 0,5 ml para cada 100g de peso do animal e deixá-lo em aquário por cerca de 50 minutos;
3. sacrificar o animal retirando a porção anterior do rim;
4. colocar os fragmentos de tecido retirados em uma placa de Petri contendo de 4 a 6 ml de solução hipotônica (KCl 0,075 M), dependendo da quantidade de tecido que possa ser retirado;
5. dissociar o material, procurando-se obter uma suspensão de células. Para isso, deve-se dissociar o material com pinças de pontas finas e então homogeneizar com auxílio de uma pipeta Pasteur;
6. retirar esta suspensão da placa de Petri e colocá-la em um tubo de centrífuga; deixar o tubo com a suspensão no interior de uma estufa a 37°C por 21 minutos;

7. retirar o tubo da estufa, adicionar 5 gotas de fixador gelado e previamente preparado (metanol + ácido acético na proporção de 3:1, respectivamente). Agitar levemente com uma pipeta Pasteur (por volta de 100 vezes) e deixar repousar por 5 minutos em temperatura ambiente;
8. adicionar cerca de 6 ml de fixador, agitar novamente com pipeta Pasteur e levar à centrífuga (900 ± 100 rpm) por 10 minutos;
9. retirar o sobrenadante e ressuspender o precipitado com pipeta Pasteur em 6 ml de fixador; centrifugar por 7 minutos a 900 ± 100 rpm;
10. repetir o item 8 por mais duas vezes e pingar de 1 a 2 gotas do material em lâminas limpas colocadas sobre a bancada do laboratório e deixar secar ao ar.

As lâminas podem ser posteriormente guardadas no congelador durante muito tempo, servindo, assim, para aplicação de várias técnicas de bandamento cromossômico e aplicação da técnica de FISH.

3.2.3 Coloração convencional com Giemsa

As preparações cromossômicas depositadas nas lâminas passarão pelo seguinte processo de coloração:

1. hidrolisar o material contido na lâmina em HCl 1 N a 60°C por cerca de 3 minutos;
2. corar com solução de Giemsa a 5 % em tampão fosfato (pH=6,7) por 10 minutos.

3.2.4 Caracterização das regiões organizadoras de nucléolo (Ag-NOR)

Para identificar as regiões organizadoras de nucléolo nos cromossomos mitóticos, foi utilizada a técnica de impregnação pela Prata, descrita por Howell e Black (1980), com algumas adaptações. Foram utilizadas duas soluções:

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

Solução B: solução de nitrato de Prata: 1g de AgNO_3 dissolvida em 2 ml de água destilada. Essas soluções, uma vez preparadas, deverão ser mantidas em frascos escuros, a 4° C. O procedimento para coloração das NORs é o seguinte:

1. hidrolisar o material por 3 minutos em HCl 1N a 60°C;
2. secar as lâminas, pingar sobre o material uma gota da solução A, duas gotas da solução B e cobrir com lamínula;
3. deixar as lâminas sobre um suporte no interior de um banho-maria a 60°C por alguns minutos até que a mistura das soluções se torne marrom dourada.
4. lavar a lâmina em água destilada, deixar secar e corar com Giemsa 5% em tampão fosfato (pH = 6,7) por 30 segundos.

3.2.5 Detecção da heterocromatina constitutiva (banda C)

Para obtenção de bandas C foi usada a técnica descrita originalmente por Sumner (1972), que consiste em:

1. hidrolisar as lâminas por 30 minutos em HCl 0,2N à temperatura ambiente e lavar em água destilada;
2. passar por uma solução de Ba(OH)₂ por cerca de 15 segundos e lavar em água destilada;
3. lavar em HCl 1N a 60°C, lavando, em seguida, em água destilada;
4. incubar por 20 minutos em 2xSSC (pH = 6,8), a 60°C; e 5- corar por aproximadamente 30 minutos com Giemsa a 5% em tampão fosfato (pH = 6,7).

3.3 Métodos Moleculares

3.3.1 Extração de DNA genômico

As amostras de DNA foram extraídas de fígado ou de músculos dos exemplares de peixe com a utilização do Kit NucleoSpin® Tissue Columns, Collection Tubes (2mL), Proteinase K (PRODIMOL) e tratadas com RNase A (20mg/ml – Invitrogen) para remoção do RNA residual da suspensão. Cada amostra foi quantificada por espectrofotometria (Nanodrop) e a quantidade avaliada por eletroforese em gel de agarose 1%. Após estes procedimentos, as amostras de DNA foram diluídas a uma concentração de 50ng/mL em 5mmol/L Tris, pH 8.5.

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

3.3.2.1 Preparação das sondas de DNA 5S e 18S

A sonda de DNAr 18S foi obtida por PCR (Polymerase Chain Reaction) a partir do DNA total de *Astianax paranae*, usando os primers 18S F (5'CCG CTT TGG TGA CTC TTG

AT 3') e 18S R (5'CCG AGG ACC TCA CTA AAC CA 3'). Esta sonda foi marcada com Digoxigenina-11-dUTP (Roche Applied Science) por PCR e a detecção do sinal de hibridação foi realizada usando anti-digoxigenina-rodamina (Roche Applied Science). Os parâmetros para marcação foram: 31 µl de água Mili-Q, 5 µl de tampão da enzima Taq polimerase (10X), 5 µl de MgCl₂ (25mM), 1 µl de dATP, dCTP e dGTP e 0,7 µl de dTTP (2mM cada), 0,8 µl de Digoxigenina-11-dUTP, 1µl de cada primer (10mM), 0,5 µl de Taq polimerase (5U/µL) e 2 µl de DNA molde. Total da reação: 50 µl.

O programa de PCR utilizado apresentou as seguintes condições:

	94°C ---- 2 min
35 ciclos	{ 95°C ---- 45 seg 52,1°C ---- 45 seg 72°C ---- 1 min e 30 seg
	72°C ---- 5 min
	12°C ---- manutenção

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

O programa de PCR utilizado apresentou as seguintes condições:

	95°C ---- 5 min
35 ciclos	{ 95°C ---- 1 min
	{ 55°C ---- 45 seg
	{ 72°C ---- 1 min
	{ 72 °C ---- 7 min
	12 °C ---- manutenção

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

3.3.2.2 Preparação das sondas de microssatélites (GA)₁₅, (GC)₁₅, (TTA)₁₀ e (CA)₁₅

As sondas de oligonucleotídeos que contêm as sequências dos microssatélites (GA)₁₅, (GC)₁₅, (TTA)₁₀ e (CA)₁₅ foram marcadas diretamente com TAMRA na posição 5`durante sua síntese pela empresa Sigma-Aldrich, como descrito posteriormente em Kubat et al. (2008).

3.3.2.3 Hibridação in situ fluorescente (FISH)

A aplicação da técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) para o mapeamento das sondas composta por DNA repetitivo foi realizada com base em procedimentos adotados por Pinkel et al. (1986), com adaptações implementadas no Laboratório de Biologia e Genética de Peixes do Departamento de Morfologia IB/UNESP descritas abaixo:

Etapa 1: Preparação das lâminas

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

Etapa 2: Detecção dos sinais correspondentes

Após a hibridação as lâminas foram lavadas 2 vezes em solução de formamida 15%/0,2xSSC a 42°C por 10 minutos cada. Em seguida, foram lavadas 3 vezes em solução de 0,1xSSC a 60°C por 5 minutos cada e uma vez em solução Tween 0,5%/4xSSC à temperatura ambiente por 5 minutos. Após as lavagens, as lâminas foram cobertas com 50 µL de solução de bloqueio (leite em pó, 20xSSC, e água) por 15 minutos e lavadas 2 vezes em Tween 0,5%/4xSSC a temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram incubadas com 30 µL de

solução de bloqueio com anticorpo (24 µL de solução de bloqueio e 6 µL de antidigoxi-rodamina) por 1 hora em câmara úmida e escura a 37°C. Posteriormente, foram lavadas 3 vezes em Tween 0,5%/4xSSC por 5 minutos, desidratadas em série de etanol 70%, 85% e 100% a -20°C por 5 minutos em cada banho, secas e cobertas com 22 µL de Vectashield® Mounting Medium com DAPI (Vector).

Para os microsatélites as lâminas foram lavadas 2 vezes em 2X SSC por 5 minutos e 1 vez em 1X PBS por 1 minuto em temperatura ambiente. Depois as lâminas foram secas e cobertas com 22 µL de Vectashield® Mounting Medium com DAPI (Vector). Todas as lâminas foram analisadas em um fotomicroscópio óptico de fluorescência (Olympus BX61) e as imagens metafásicas foram capturadas usando o programa Image Pro Plus, 6.0 software (MediaCybernetics).

3.4 Montagem dos cariótipos

As preparações cromossômicas convencionais, com fluorocromos e com hibridação *in situ* foram analisadas em fotomicroscópio óptico (Olympus BX61), estabelecendo-se o número diplóide modal (contagem mínima de 30 metáfases cromossômicas por espécime) presente em cada espécie/população amostrada no presente trabalho. As melhores metáfases foram capturadas com software Image Pro Plus, 6.0 (MediaCybernetics). As imagens com fluorocromos foram capturadas separadamente (utilizando filtros UV específicos) e sobrepostas no mesmo software Image Pro Plus, 6.0 (MediaCybernetics).

Os cromossomos foram recortados usando o software Adobe Photoshop versão 11.0 - Adobe System e organizados em pares de homólogos em classes e ordem decrescente de tamanho para a montagem dos cariótipos, sendo classificados em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a), com base no trabalho de Levan et al. (1964). Considerando a similaridade morfológica e uma melhor distribuição no

cariótipo, os cromossomos metacêntricos e submetacêntricos constituíram um único grupo cromossômico e os elementos classificados como subtelocêntricos e acrocêntricos formaram um segundo grupo de cromossomos.

3.3.3 Estudos transcriptoma

3.3.3.1 Extração de RNA

O tecido dermico de duas espécies da família Heptapteridae (*Pimelodella avanhadavae* e *Rhamdia quelen*) provenientes do Rio Araquá, Botucatu, São Paulo, foi retirado e preservadas em RNALater. Após isso foi realizada a extração de RNA com o reagente Trizol (Invitrogen). As extrações seguiram as especificações do fabricante e a quantidade e a qualidade do RNA foram mensuradas por eletroforese em gel de agarose 1% e pelo equipamento NanoVue, e a integridade do RNA foi confirmada utilizando o equipamento Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). O RNA obtido foi diluído em água RNase free e estocado num freezer -80° C até a realização das etapas subsequentes.

3.3.3.2 Preparação da biblioteca e sequenciamento Illumina

A preparação das bibliotecas e o sequenciamento Illumina foram realizados pelo Laboratório de Biotecnologia Animal da Esalq/Piracicaba. As bibliotecas de cDNA foram construídas segundo as especificações do “TruSeq RNA-seq Sample Prep kit” (Illumina, Inc., CA, USA). As amostras foram inseridas em duas flow cells (11 amostras por lane) e sequenciadas na Illumina HiSeq2000 (Illumina Inc.). Os resultados no formato de sequencias (.fastq) foram utilizadas para preparação da biblioteca. Os reads de cada amostra foram

concatenados em dois arquivos (reads 1 e reads 2) que foram submetidos a uma análise de qualidade das sequências geradas através do programa FastQC.

3.3.3.3 Análise de sequências, montagem dos contigs e detecção de SNPs

As análises bioinformáticas foram realizadas de forma concomitante e complementares no Laboratório Environment Centre Wales, Molecular Ecology and Fisheries Genetics Laboratory, School of Biological Sciences, College of Natural Sciences, Bangor University, Bangor, sob supervisão do Dr. Martin Ian Taylor e no Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista UNESP, Botucatu-SP, sob supervisão do Dr. Claudio Oliveira. Os resultados no formato de sequências (fastq) foram inseridos na etapa de preparação das bibliotecas. Os reads de cada amostra foram concatenados em dois arquivos (reads 1 e reads 2), que foram submetidos a uma análise de qualidade das sequências geradas através do programa FastQC. O programa Geneious v. R8 foi utilizado para a realização das análises iniciais de montagem dos transcriptomas, utilizando o transcriptoma do zebrafish (*Danio rerio*) como referência.

4 Resultados e Discussão

As informações obtidas dos estudos realizados nesse trabalho foram organizadas em capítulos para melhor apresentar os resultados:

4.1 Capítulo 1:

Mapeamento cromossômico de microsstélites e DNAr 5S e 18S em espécies de Heptapteride (Teleostei: Siluriformes): acúmulo de DNA repetitivo nos cromossomos e sua atuação na diferenciação cariotípica.

4.2 Capítulo 2:

Análise do transcriptoma de células de pele de *Pimelodella avanhandavae* e *Rhamdia quelen* (Teleostei: Heptapteridae): busca por genes de coloração.

4.1 Capítulo 1

Mapeamento cromossômico de microsatélites e DNAr 5S e 18S em espécies de Heptapteride (Teleostei: Siluriformes): acúmulo de DNA repetitivo nos cromossomos e sua atuação na diferenciação cariotípica.

Resumo

O genoma dos organismos eucariotos são densamente povoados por microsatélites, (SSR - Simple Sequence Repeats), sendo que alguns destes segmentos genômicos podem atuar na organização da cromatina, tornando-se importantes em estudos do genoma. Neste contexto, o mapeamento cromossômico de microsatélites pode trazer informações sobre a importância evolutiva e funcional do acúmulo de DNA repetitivo nos cromossomos, bem como sobre sua atuação na diferenciação cariotípica. No presente estudo foi realizado um mapeamento comparativo de sítios ribossômicos de DNAr 18S e 5S e de 4 sequências de microsatélites, (CA)₁₅, (GA)₁₅, (CG)₁₅ e (TTA)₁₀ em cinco espécies de peixes da família Heptapteridae, *Pimelodella avanhadavae*, *Cetopsorhamida iheringi*, *Heptapterus mustelinus*, *Imparfinis mirini* e *Rhamdia quelen*. O mapeamento cromossômico do DNAr 18S mostrou um único par portador das RONS para a maioria das espécies, exceto para *I. mirini* que apresentou dois pares com marcação. Já o DNAr 5S apresentou pouca variação quanto à sua localização e distribuição entre as espécies, sendo identificados dois *clusters* nos cromossomos de todas as espécies analisadas, exceto para *Rhamdia quelen* que evidenciou apenas um par de cromossomos marcados. As sequências de microsatélites foram encontradas amplamente distribuídas por todos os cromossomos do cariótipo das espécies analisadas, com um acúmulo preferencial nas regiões teloméricas, embora

diferenças nítidas tenham sido identificadas em relação à abundância de cada motif em cada espécie. Contudo, o acúmulo destas sequências não aparenta estar relacionado com o processo de heterocromatinização, uma vez que parecem estar associadas indistintamente tanto a regiões eucromáticas quanto heterocromáticas. Considera-se que as informações obtidas nas análises realizadas nos peixes da família Heptapteridae certamente constituem avanços significativos e deverão contribuir para a compreensão da dinâmica evolutiva das sequências repetitivas no genoma dos peixes em geral.

Introdução

O genoma dos eucariotos é composto por sequências de DNA repetitivo que podem ser caracterizados como componentes de duas classes, formando por repetições em tandem e identificados como satélites, minissatélites e microssatélites, bem como por elementos dispersos identificados como transposons e retrotransposons (Ferreira et al., 2011; Cioffi et al., 2012; Sene et al., 2015). Embora algumas sequências de DNA repetitivo possuam funções em definidas no genoma como DNA ribossomal, centromérico e telomérico, outras foram consideradas até recentemente como DNA lixo (Biémont & Vieira, 2006). No entanto, estudos recentes têm demonstrado sua grande importância na manutenção da estrutura genômica, sendo sua formação um processo contínuo e provavelmente mais antigo que a divergência das primeiras linhagens de eucariotos (Jurka et al., 2005).

Diversos estudos têm demonstrado a importância destas sequências genômicas no processo de expressão gênica (Liu et al., 2001), recombinação (Biet et al., 1999) e replicação no DNA (Li et al., 2002), tendo também um importante papel na organização estrutural e funcional dos cromossomos e nos processos de diferenciação sexual em peixes, como visto em estudos recentes em *Oreochromis niloticus* (Martins, 2007; Ferreira &

Martins, 2008) e em espécies do gênero *Triportheus* (Yano et al., 2014), do gênero *Characidium* (Scacchetti et al., 2015) e ainda em espécies do gênero *Eigenmannia* (Sene et al., 2015). Neste sentido, pode ser considerado que sequências repetitivas poderiam estar envolvidas na formação de rearranjos cromossômicos, como deleções, duplicações, inversões e translocações, tendo grande influência nas variações cariotípicas observadas em muitos grupos (Kidwell, 2002).

Os peixes da ordem Siluriformes se caracterizam como um grupo extremamente diverso e amplamente distribuído pela região Neotropical, sendo popularmente conhecidos como bagres, cascudos, mandis e peixes gato. Esta ordem é representada por 38 famílias, sendo composta por aproximadamente 485 gêneros e cerca de 2800 espécies. Embora exista extenso número de publicações acerca da taxonomia e sistemática dos Siluriformes Neotropicais, por constituírem um grupo amplo e diversificado, as relações entre as espécies ainda se apresenta bastante confusa principalmente devido a dificuldades na identificação das espécies, por conflito taxonômico ou ainda pela falta de caracteres diagnósticos para espécies morfologicamente semelhantes.

As ordens Siluriformes e Characiformes representam os grupos de peixes que concentram números significativos de informações citogenéticas sobre seus representantes. Neste sentido e considerando que as sequências repetitivas desempenham papel relevante e fundamental na estruturação do genoma dos representantes destes grupos, o presente trabalho teve como objetivo avaliar e mapear citogeneticamente genes ribossômicos (DNAr 5S e 18S) e sequências de microssatélites nos cromossomos dos principais representantes da família Heptapteridae, visando compreender sua organização cromossômica e os processos envolvidos na diversificação cariotípica desse grupo, além de contribuir com informações sobre a distribuição de sequências de DNA ribossomal e a distribuição de microssatélites nos cromossomos destas espécies. Considera-se que os dados obtidos sobre

a distribuição do material genético presente nos cromossomos das amostras analisadas poderão resultar em informações para o entendimento do processo de diferenciação cromossômica neste complexo grupo de peixes Neotropicals.

Materiais e Métodos

Material experimental

No presente estudo foram analisadas cinco espécies de peixes da família Heptapteridae sendo representadas por *Pimelodella vanhadavae*, *Cetopsorhamida iheringi*, *Heptapterus mustelinus*, *Imparfinis mirin* e *Rhamdia quelen* (Tabela 1). Os animais foram sacrificados após anestesia com solução de benzocaína e foram preparadas suspensões celulares de cada exemplar para obtenção e análise dos cromossomos mitóticos. Fragmentos de fígado ou músculos foram retirados e fixados em etanol 95%), para estudos moleculares posteriores. Todos os exemplares coletados foram fixados em formol 10%, conservados em álcool 70%, identificados e depositados na coleção de peixes do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes do Departamento de Morfologia, UNESP de Botucatu-SP.

Análises citogenéticas convencionais

As análises citogenéticas convencionais envolveram os métodos de estimulação de mitose (Cole e Levans, 1971), preparações cromossômicas diretas a partir de células renais (Foresti et al., 1981), marcação das Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONs) com nitrato de Prata (Howell e Black, 1980) e identificação dos padrões de distribuição da heterocromatina constitutiva (Sumner, 1972). O DNA genômico foi obtido a partir de

amostras de fígado ou músculo preservadas em etanol, utilizando-se o Kit Wizard Genomic DNA Purification (PROMEGA), conforme instruções do fabricante.

Sondas repetitivas e hibridação in situ fluorescente (FISH)

Sondas de oligonucleotídeos contendo sequências de microssatélites (CA)₁₅, (GA)₁₅, (CG)₁₅ e (TTA)₁₀ foram marcadas com TAMRA durante a sua síntese (Sigma), como descrito em Kubat et al. (2008). Sondas ribossômicas foram obtidas por PCR (*polymerase chain reaction*) utilizando *primers* descritos anteriormente (White et al. 1990; Pendás et al. 1994). O DNAr 5S foi marcado com biotina-16-dUTP, enquanto o DNAr 18S foi marcado com digoxigenina-11-dUTP.

As condições de pré-hibridação foram as mesmas para todas as amostras analisadas e seguiram os procedimentos descritos em Pinkel et al. (1986). As lâminas foram incubadas em RNase (50ug/ml) por 1h a 37°C e, então, o DNA cromossômico foi denaturado em formamida 70%/2xSSC por 4min a 70°C. Para cada lâmina, 30ul de solução de hibridação contendo 200ng da sonda marcada, 50% de formamida, 2xSSC e 10% de sulfato dextrano foi desnaturada a 95°C por 10min, colocada sobre as lâminas utilizando uma lamínula e hibridada *overnight* em uma câmara úmida. Pós-hibridação, diferentes lavagens foram aplicadas, a depender da sonda utilizada: i) as lâminas com sondas de DNAr 5S e 18S foram lavadas em 0.2xSSC/15% de formamida por 20min a 42°C, seguidos por uma lavagem em 0.1xSSC por 15min a 60°C e uma lavagem final em temperatura ambiente em 4xSSC/0.5% Tween por 10min. A detecção das sondas foi realizada com anti-digoxigenina-rodamina e avidina-FITC; ii) as lâminas com as sondas de microssatélites foram lavadas em 2xSSC por 10 minutos, seguido por uma lavagem em PBS 1X por 1min. Posteriormente, os cromossomos foram contracorados com DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole).

Resultados

A análise citogenética dos representantes da família Heptapteridae revelou uma variação do número diploide de $2n=46$ a $2n=58$, sendo que o mais frequente foi de $2n=58$ cromossomos, como observado em *Cetopsorhamdia iheringi*, *Imparfinis mirini* e *Rhamdia quelen* (Figuras 1a, 2a e 3a). Já para a espécie *Heptapterus mustelinus* foi evidenciado o número diploide de $2n=52$ (Figura 4a) e para *Pimelodella avanhadavae*, de $2n=46$ cromossomos (Figura 5a).

A heterocromatina constitutiva se apresentou em pequena quantidade em todas as espécies analisadas, apresentando-se de forma pouco evidente e dificultando uma detecção precisa destes segmentos. Bandas C-positivas mais conspícuas foram observadas na região centromérica e pericentromérica de vários cromossomos, bem como na região terminal de alguns pares de cromossomos (Figura 6).

O mapeamento das regiões organizadoras de nucléolo (RONs) pela aplicação da técnica de FISH utilizando sonda de DNAr 18S revelou marcações fluorescentes em um único par cromossômico para as espécies *C. iheringi*, *R. quelen*, *H. mustelinus* e *P. avanhadavae* (Figuras 1b, 3b, 4b e 5b – em vermelho), enquanto em *I. mirini* dois pares apresentaram seus cromossomos marcados (Figura 2b – em vermelho). O DNAr 5S apresentou resultados conservados em relação ao número de *clusters*, com dois pares marcados em todas as espécies analisadas (Figuras 1b, 2b, 3b, 4b e 5b – em verde), mas com variação em relação a sua localização cromossômica. Deve ser ressaltado que nas espécies *Cetopsorhamdia iheringi* e *Imparfinis mirini* as sequências de DNAr 5S e 18S foram sintênicas, com marcações coincidentes nos mesmos cromossomos (Figuras 1b e 2b).

A localização cromossômica por hibridização fluorescente *in situ* (FISH utilizando oligonucleotídeos marcados dos microssatélites (CA)₁₅, (GA)₁₅, (CG)₁₅ e (TTA)₁₀ revelou um padrão semelhante de distribuição destas sequências nas 5 espécies da família Heptapteridae, com um acúmulo preferencial na região teloméricas (Figura 7), exceto para o *motif* (CG)₁₅ que em *P. avanhadavae* e *H. mustelinus*, além das regiões teloméricas, apresentou também acúmulo de marcação nas regiões centromérica dos cromossomos. (Figura 7).

Discussão

Os primeiros estudos citogenéticos no Brasil envolvendo representantes da família Heptapteridae foram realizados por Toledo e Ferrari em 1976, com a caracterização cromossômica de espécies pertencentes aos gêneros *Pimelodella* e *Rhamdia*. Embora os estudos das espécies de Siluriformes tenham sido ampliados de modo expressivo na última década, ainda são pouco representativos para esta família (Maistro et al., 2002; Stolf et al., 2004; Swarça et al., 2003, 2007; Garcia e Almida-Toledo, 2006, 2010; Gouveia et al., 2012; Yano et al., 2012; Kantek et al., 2009, 2015), quando comparados ao número de espécies que o compõe. Visando ampliar as informações sobre os componentes deste grupo foram realizadas análises citogenéticas em cinco diferentes espécies desta família de peixes, com ampliação de abordagens metodológicas.

Os resultados cariotípicos confirmaram o predomínio do número diploide de $2n=58$ cromossomos para a maioria das espécies analisadas (Toledo e Ferrari, 1976; Margarido e Moreira-Filho, 2008; Garcia, 2010) exceto para *Pimelodella avanhadavae* que apresentou $2n=46$ e *Heptapterus mustelinus* com $2n=52$ cromossomos. De fato, uma variação de $2n=46$ à 58 cromossomos dentro do gênero *Pimelodella*, sendo mais frequente $2n=46$

cromossomos assim como visto no presente trabalho (Toledo e Ferrari 1976; Garcia e Almeida-Toledo 2010). Para os Siluriformes, existe certa dificuldade para se compreender sua evolução cromossômica e estabelecer padrões de relacionamento entre os componentes deste grupo, dado a extensa variabilidade cariotípica predominante, tanto em nível de famílias quanto de gêneros, além de uma determinação pouco acurada de seu cariótipo primitivo. Tendo por base informações citogenéticas de Ictaluridae, Legrande (1981) propôs um cariótipo basal com número diplóide predominante de $2n=58$ cromossomos e número fundamental (NF) relativamente alto (>80). No entanto, considerando-se o número diploide conservado da família Diplomystidae e considerando-se esta como a mais primitiva dentre os Siluriformes (Fink e Fink, 1981; Arratia, 1987; de Pinna, 1998; Oliveira e Gosztonyi 2000), foi sugerido que $2n=56$ poderia ser o cariótipo ancestral e uma sinapomorfia desta ordem.

Outra característica observada para os cromossomos das espécies analisadas da família Heptapteridae foi o alto valor do número de braços (NF), devido a riqueza de cromossomos dos tipos metacêntrico e submetacêntrico, uma característica já descrita anteriormente para algumas espécies (Visotto et al., 1997, 1999 e 2004; Maistro et al., 2002; Stolf et al., 2004; Garcia e Almeida-Toledo, 2010), que pode ser considerada como uma condição plesiomórfica amplamente distribuída no grupo dos Siluriformes (Oliveira e Gosztonyi 2000). Os estudos evidenciam que cerca de 50% dos representantes Siluriformes já cariotipados dessa ordem apresentaram número diploide relativamente conservado, com $2n=56\pm 2$ cromossomos. Oliveira e Gosztonyi (2000) propõem ainda que esta característica conservadora, mesmo em um grupo com grande número de espécies e com ampla variedade de tamanho e estrutura populacional, se deve à associação com melhores condições para a manutenção celular nestes organismos.

Apesar da manutenção do número cromossômico nas espécies analisadas no presente estudo, existem relatos da ocorrência de cromossomos supranumerários em representantes de mais de um gênero da família Heptapteridae (Hochberg e Erdtmann, 1988; Fenocchio et al, 2000; Fenocchio et al, 2002; Stivari et al 2002), bem como de sistemas de cromossomos sexuais simples do tipo XX-XY no gênero *Pimelodella* e de um possível sistema de cromossomos sexuais do tipo ZZ-ZW para o gênero *Imparfinis* (Toledo e Ferrari 1976), demonstrando certa variabilidade da macroestrutura cromossômica entre seus representantes.

O bandamento C confirmou a ausência de blocos consistentes de heterocromatina nos cromossomos para os representantes deste grupo, uma vez que estes se apresentaram pálidos e de difícil visualização. Os representantes da família Heptapteridae analisados possuem poucas regiões heterocromáticas basicamente localizadas em regiões terminais de quase todos os cromossomos e com algumas marcações presentes nas regiões centroméricas e pericentroméricas (Vasconcelos e Martins e Santos, 2000; Margarido e Moreira-Filho, 2008; Swarça et al., 2003; Novaes et al., 2007).

No presente trabalho, a identificação das regiões organizadoras de nucléolo nas cinco espécies analisadas pela sonda de DNAr 18S revelou de 2 a 4 *loci* por genoma, corroborando dados obtidos anteriormente (Garcia et al., 2010; Kanterk et al., 2015). Em contrapartida o DNAr 5S apresentou-se conservado, com dois pares cromossômicos marcados para quase todas as espécies. A presença e manutenção de apenas dois pares de cromossomos com DNAr 5S entre os representantes da família Heptapteridae poderia estar associada à ausência de grandes blocos heterocromáticos, já que regiões heterocromáticas são mais propícias a quebras, facilitando assim, a dispersão dessa sequência gênica. Martins e Galetti Jr. (2001) sugerem que estes genes requerem *loci* distantes, pois apresentam uma dinâmica funcional e mecanismos evolutivos distintos. Por fim, deve ser destacada a

ocorrência de *clusters* de DNAr 5S e 18S no mesmo par cromossômico para as espécies *Cetopsorhamdia iheringi* e *Imparfinis mirini*, considerando-se que esta co-localização não seja uma característica comum dos eucariontes, uma vez que no genomas da maioria dos organismos os sítios de DNAr 5S geralmente se apresentam em cromossomos distintos daqueles de DNAr 18S (Madrioli et al. 2000; Sola et al. 2000; Martins e Galetti Jr. 2001).

Além do mapeamento de DNA ribossômico, a hibridização *in situ* fluorescente (FISH) foi utilizada para caracterizar a distribuição de 4 diferentes sequências de microssatélites, (CA)₁₅, (GA)₁₅, (CG)₁₅ e (TTA)₁₀, mapeadas pela primeira vez no genoma de peixes da família Heptapteridae. A análise das figuras de hibridação visando caracterizar a distribuição destes elementos revela um acúmulo preferencial nas regiões teloméricas dos cromossomos nas espécies analisadas. Tendo em vista que a região telomérica dos cromossomos possui uma alta taxa de modificações (Jain et al., 2010) e também que esta região é tipicamente composta por diferentes classes de DNA repetitivo que podem atuar na estabilidade da parte terminal dos cromossomos, além do fato de que se caracterizam pela ampla capacidade de amplificação, mesmo na ausência da atividade telomerase (Jain et al., 2010; Torres et al., 2011), poderia ser inferido que o acúmulo destas sequências nestas regiões e em associação com outras sequências heterocromáticas, estaria relacionado principalmente à manutenção das terminações cromossômicas.

Alguns estudos relatam que o acúmulo de microssatélites no genoma dos organismos eucarióticos não é randômico, sendo que cada grupo de organismos evidencia acúmulo preferencial de *motifs* específicos, apresentando uma distribuição cromossômica particular, como foi observado ocorrer em *Imparfinis schubarti*, *Steindachneridion scripta*, *Rineloricaria latirostris*. Nestas espécies é notável a localização preferencial de ambos os microssatélites (GA)₁₅ e (A)₃₀ nas regiões teloméricas dos cromossomos (Vanzela et al. 2002; Tóth et al., 2002; Ruiz-Ruano et al., 2014). Além disso, em espécies distintas de

gafanhotos foi observada a distribuição de vários microsstélites por quase todo o genoma das espécies analisadas (Milani & Cabral-de-Mello 2014). Nesse sentido, o acúmulo preferencial em locais específicos pode indicar regiões cromossômicas onde os microssatélites estão presentes como arranjos bastante perfeitos ou degenerados. Assim, pode ser considerado que a comparação da distribuição e evolução dos microssatélites em vários grupos taxonômicos poderia fornecer informações de interesse para a compreensão dos processos relacionados à dinâmica de seus genomas (Kejnovsky et al., 2009).

Embora exista uma clara tendência de acúmulo de microssatélites em áreas teloméricas, os minissatélites e microssatélites são muitas vezes localizados em regiões eucromáticas dos cromossomos (Kubat et al., 2008), como visto pelo mapeamento cromossômico que revela marcações correlacionadas às regiões centroméricas e eucromáticas nos genomas das espécies analisadas. De modo particular e concordando com Terencio et al. (2013), tal padrão de distribuição sugere que uma porção destas sequências poderia estar desempenhando um papel funcional no genoma dos componentes da família Heptapteridae.

A utilização de técnicas citogenéticas diversificadas permitiu a descrição do cariótipo de cinco espécies da família Heptapteridae, confirmando resultados anteriormente obtidos e contribuindo para o melhor conhecimento da sua organização cromossômica e dos processos envolvidos na diversificação cariotípica deste grupo de peixes.

Referências

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

Tabela 1. Exemplares da família Heptapteridae analisados citogeneticamente no presente estudo.

Espécie	2n	Fórmula cariotípica	Rio	Bacia Hidrográfica	Município
<i>Pimelodella avanhandavae</i>	46	(40m sm+6st a)	Araquá	Tietê	Botucatu-SP
<i>Heptapterus mustelinus</i>	52	(40m sm+12st a)	Corrego da Quinta	Paranapanema	Itatinga-SP
<i>Cetopsorhamdia iheringi</i>	58	(40m sm+18st a)	Ribeirão Claro	Tietê	Rio Claro-SP
<i>Imparfinis mirini</i>	58	(40m sm+18st a)	Capivara	Paranapanema	Botucatu-SP
<i>Rhamdia quelen</i>	58	(40m sm+18st a)	Mogi-Guaçu	Mogi-Guaçu	Araras-SP

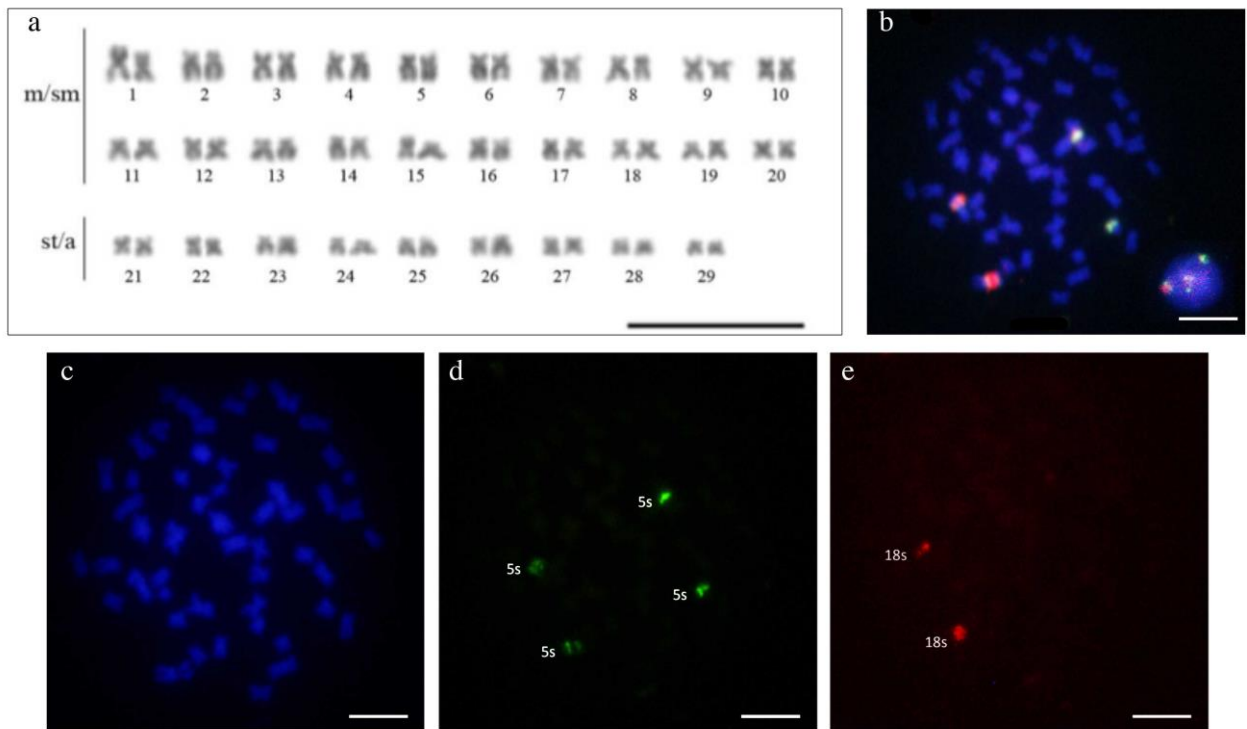


Figura 1: Cariótipo de *Cetopsorhamdia iheringi* com $2n=58$ cromossomos (a); em (b) metáfase somática sobreposta após hibridação com sondas de DNAr 18S (vermelho) e 5S (verde), evidenciando marcações sintênicas em um par de cromossomos; em (c) metáfase coradas com DAPI; (d) metáfase após hibridação com sonda para os sítios de DNAr 5S e (e) para os sítios DNAr 18S. A barra equivale a $10\mu\text{m}$.

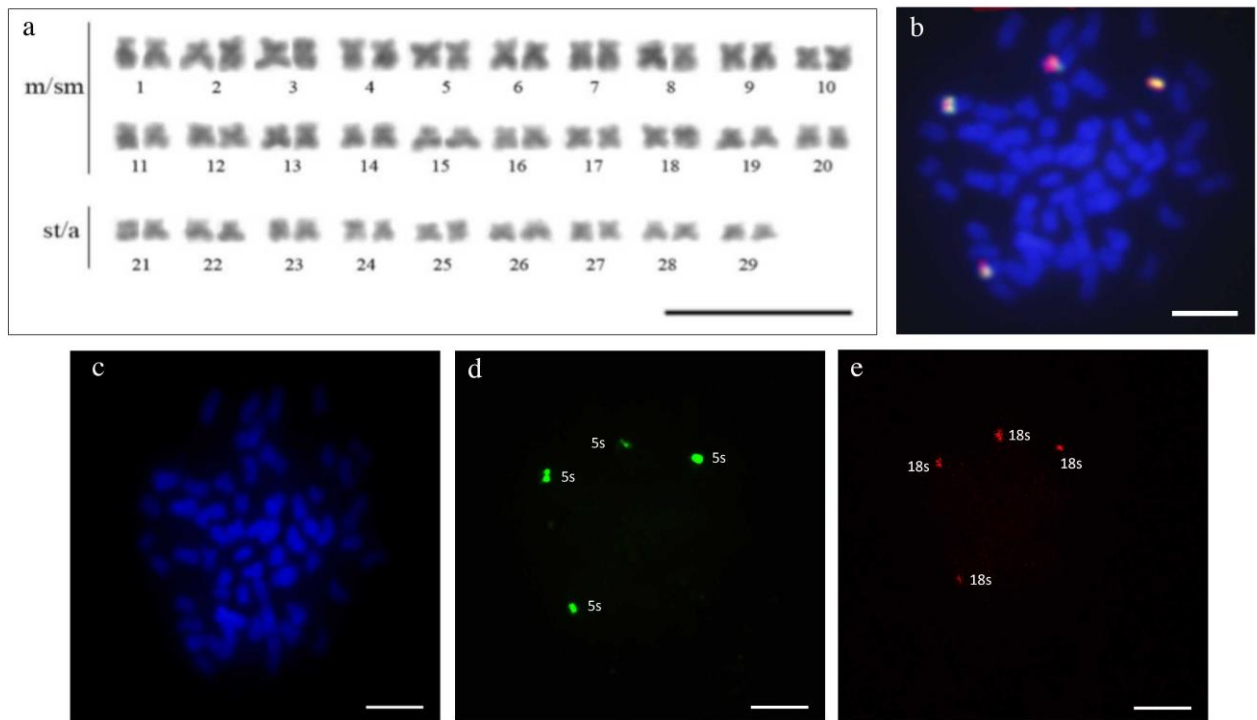


Figura 2: Cariótipo de *Imparfinis mirini* com $2n=58$ cromossomos (a); em (b) metáfase somática sobreposta após hibridação com sondas de DNAr 18S (vermelho) e 5S (verde), evidenciando marcações sintênicas em dois pares de cromossomos; em (c) metáfase coradas com DAPI; (d) metáfase após hibridação com sonda para os sítios de DNAr 5S e (e) para os sítios DNAr 18S. A barra equivale a $10\mu\text{m}$.

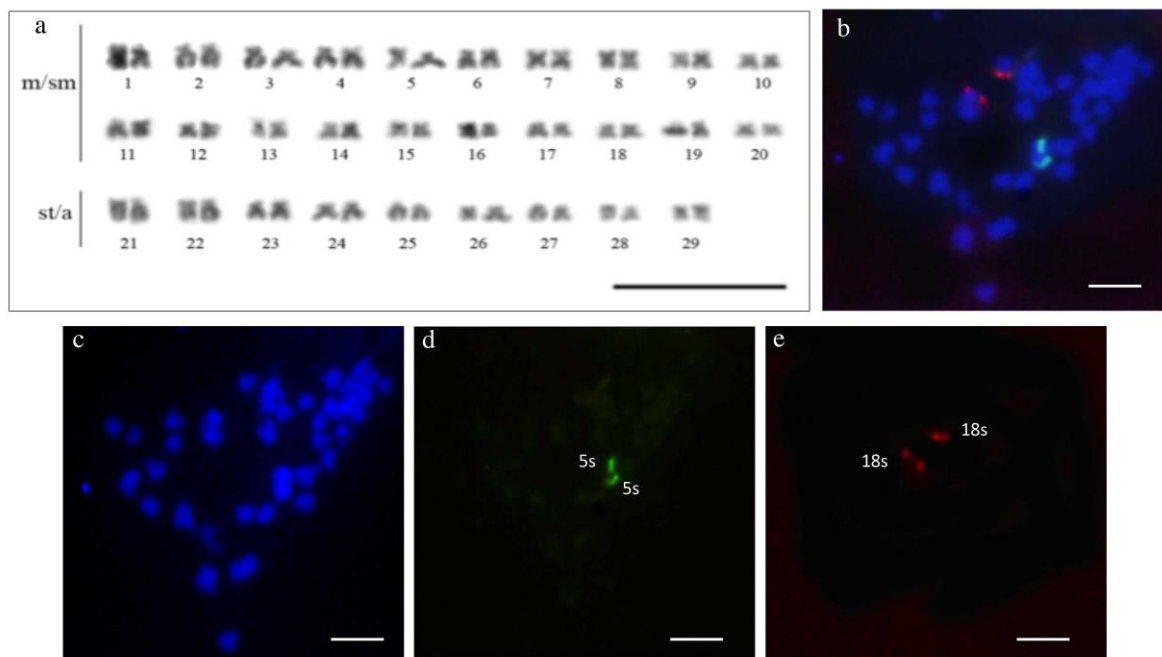


Figura 3: Cariótipo de *Rhamdia quelen* com $2n=58$ cromossomos (a); em (b) metáfase somática sobreposta após hibridação com sondas de DNAr 18S (vermelho) e 5S (verde), com marcação em pares cromossômicos diferentes; em (c) metáfase coradas com DAPI; (d) metáfase após hibridação com sonda para os sítios de DNAr 5S e (e) para os sítios DNAr 18S. A barra equivale a $10\mu\text{m}$. A barra equivale a $10\mu\text{m}$.

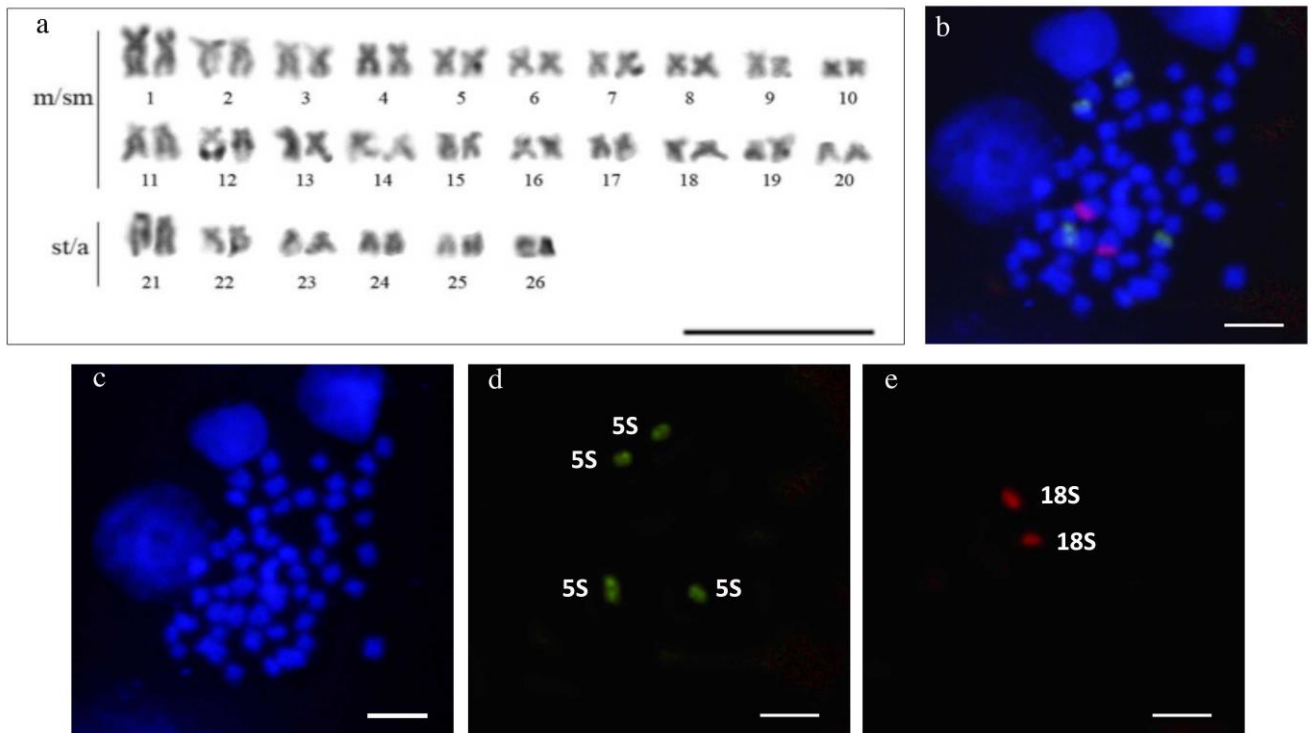


Figura 4: Cariótipo de *Heptapterus mustelinus* com $2n=52$ cromossomos (a); em (b) metáfase somática sobreposta após hibridação com sondas de DNAr 18S (vermelho) e 5S (verde), com marcação em pares cromossômicos diferentes; em (c) metáfase coradas com DAPI; (d) metáfase após hibridação com sonda para os sítios de DNAr 5S e (e) para os sítios DNAr 18S. A barra equivale a $10\mu\text{m}$.

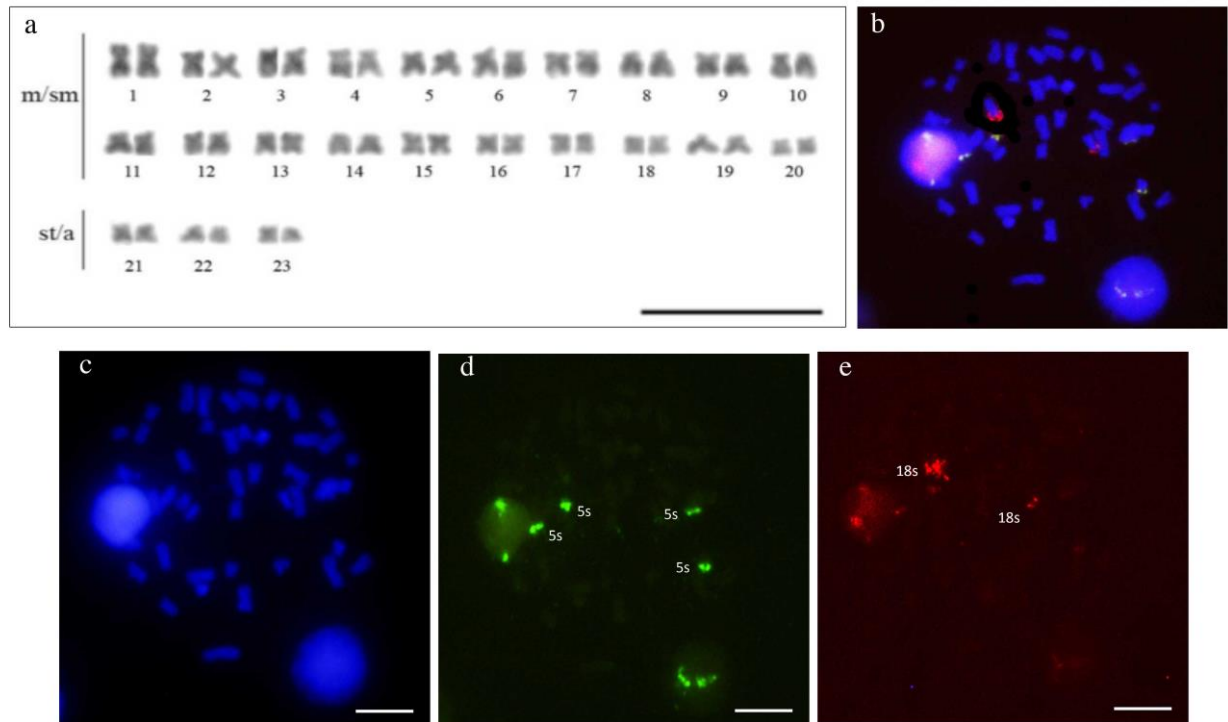


Figura 5: Cariótipo de *Pimelodella avanhadavae* com $2n=46$ cromossomos (a); em (b) metáfase somática sobreposta após hibridação com sondas de DNAr 18S (vermelho) e 5S (verde), com marcação em pares cromossômicos diferentes; em (c) metáfase coradas com DAPI; (d) metáfase após hibridação com sonda para os sítios de DNAr 5S e (e) para os sítios DNAr 18S. A barra equivale a 10μm.

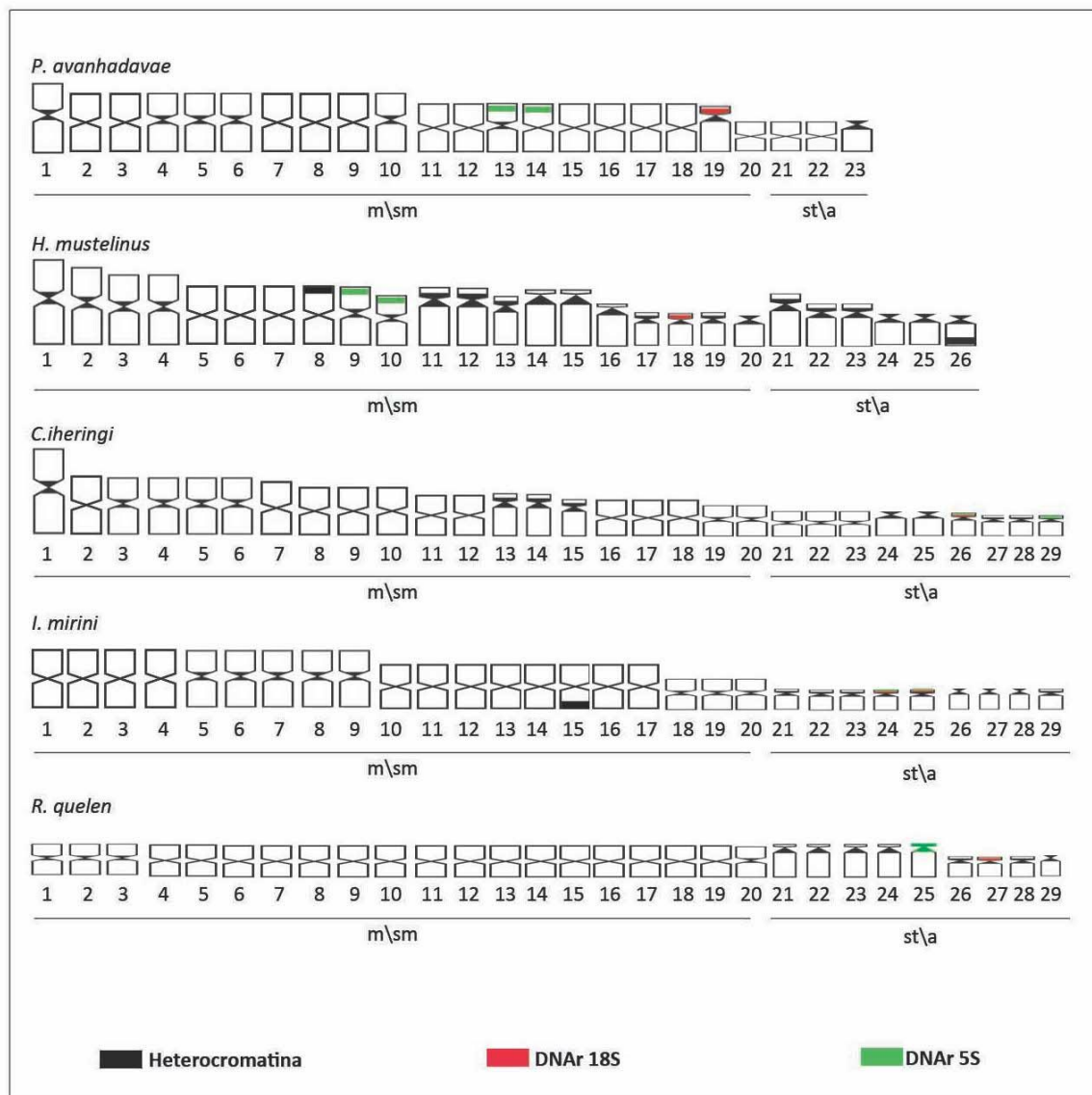


Figura 6: Idiograma representando os cariótipos das espécies da família Heptapteridae mostrando os padrões de distribuição da heterocromatina constitutiva e a localização da sequências dos DNA repetitivos.

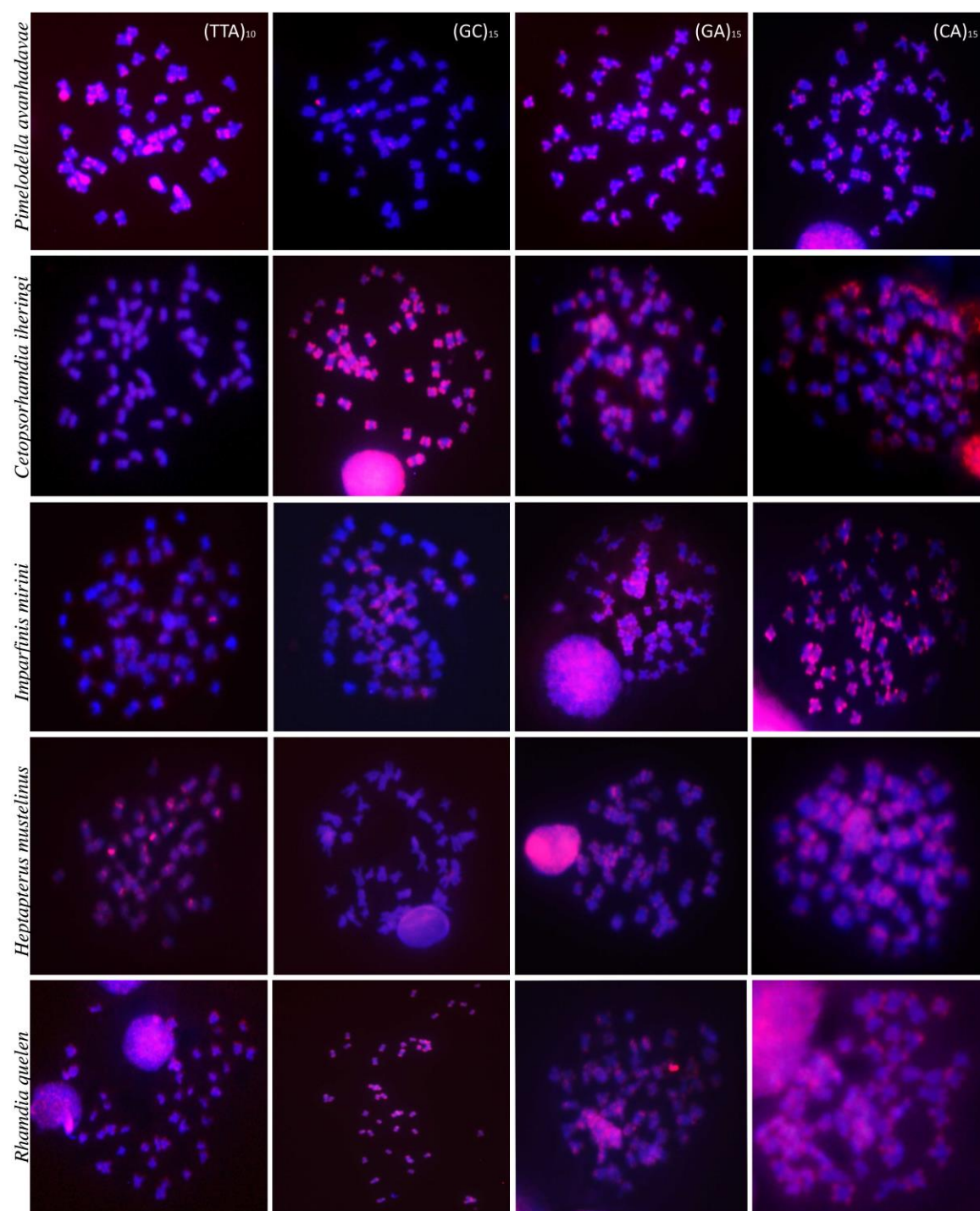


Figura 7: Metáfases somáticas das cinco espécies da família Heptapteridae após hibridação com sondas de oligonucleotídeos, contendo sequências de microssatélites (CA)₁₅, (GA)₁₅, (CG)₁₅ e (TTA)₁₀ marcados com TAMRA (Sigma).

4.2 Capítulo 2

Análise do transcriptoma de células de pele de *Pimelodella avanhandavae* e *Rhamdia quelen* (Teleostei: Heptapteridae): busca por genes de coloração

Resumo

Os padrões de coloração têm sido interpretados como resultado de um processo evolutivo, sendo papel central da Biologia Evolutiva entender como os genes se relacionam no desenvolvimento do fenótipo desses organismos. O objetivo do presente estudo foi analisar o transcriptoma de células epiteliais de *Pimelodella avanhandavae* e de *Rhamdia quelen*, buscando identificar os genes relacionados à coloração. O RNA total de tecido epitelial foi utilizado para a construção de bibliotecas de cDNA que foram sequenciadas no sequenciador Illumina Hiseq, sendo obtidos cerca de 34 milhões de leituras que foram comparadas a 89 sequências de genes relacionados com pigmentação em *Danio rerio* (zebrafish). Os resultados permitiram identificar 58 genes relacionados com pigmentação e similaridade entre 44.7% a 94.3% com os genes de zebrafish. Entre esses 58, foram encontradas altas similaridades com os genes *myelin expression*, *premelanosome protein* e *dystrobrevin binding protein*, todos eles diretamente relacionados à formação de pigmentação. A comparação desses dados com os de outros peixes permitirá entender o papel desempenhado e a importância destes genes na determinação do padrão de colorido nessas espécies.

Introdução

Interações positivas como as associações mutualistas podem ter um papel importante na manutenção da estrutura da comunidade, bem como compensar os efeitos negativos da concorrência sobre nichos específicos. Um estudo realizado em borboletas que apresentavam mimetismo Mulleriano evidenciou de forma convincente que borboletas imitadoras convergem espacialmente, considerando a utilização do habitat, ao passo que o consumo de recursos e o nicho trófico foram indiretamente inferidos como sendo correlacionados a outras variáveis, como a estrutura da floresta, topografia e altura de vôo (revisão em Alexandrou et al., 2011).

Contudo, a extensão da sobreposição trófica ou a evolução de características morfológicas associadas com a aquisição de recursos não foi diretamente quantificada até o presente, o que limita a possibilidade de inferir a importância do processo de mimetismo e determinar a estrutura da comunidade combinando informações ecológicas, filogenéticas e morfológicas. Neste contexto, os peixes de água doce da região tropical oferecem uma oportunidade excelente para o estudo da evolução da estrutura de comunidades miméticas, pois seus habitats descontínuos os tornam expostos a muitos predadores (revisão em Kelsh et al., 1996).

Os peixes da família Heptapteridae, um dos grupos mais representativos dentro da ordem dos Siluriformes, encontram-se amplamente distribuídos na região Neotropical, sendo conhecidos popularmente como “bagres”, “mandis” e “peixes-gato”. Essa família faz parte da superordem Ostariophysi, que inclui a ordem Siluriformes com cerca de 38 famílias, aproximadamente 485 gêneros e 2800 espécies (Nelson, 2006). Os componentes desta ordem podem ser facilmente identificados morfolologicamente devido à presença de

um corpo nu envolto por pele espessa e que pode apresentar-se total ou parcialmente coberto por placas ósseas (Britski et al., 1988). Ocupam geralmente o ambiente de fundo de rios, escondendo-se por entre as pedras e a vegetação (Britski, 1981), sendo caracterizados por atividades predominantemente crepusculares ou noturnas, quando saem à procura de alimento, constituído principalmente por vermes e insetos, utilizando-se de seus sentidos químicos olfato e gustação para realizar a captura das presas (Sterba, 1973).

Os padrões de cores das espécies de Heptapteridae incluem ambos os elementos enigmáticos e desafiadores de visualização, contrastando fortemente listras pretas com um fundo alaranjado ou acinzentado do corpo. Curiosamente, alguns padrões de cores também aparecem em diferentes famílias e ordens, como em *Otocinclus*, *Serrapinnus* e entre os Corydoradinae. Por exibirem uma ampla variabilidade no padrão de colorido, os peixes da região Neotropical se apresentam como excelente material para o entendimento dos processos pelos quais os genes relacionados à determinação do padrão de colorido nessas espécies atuam e são selecionados.

Materiais e Métodos

Material experimental

No presente estudo, foram analisadas as espécies *Rhamdia quelen* e *Pimelodella vanhadavae* que apresentam padrão de coloração similar. Os exemplares foram coletados no Rio Araquá, bacia do Rio Tietê, Botucatu-SP. Foram retirados fragmentos da epiderme para extração de RNA que foram conservados em RNALater. Os exemplares analisados foram fixados em formol 5%, conservados em álcool 70% e depositados na coleção de

Peixes do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes do Departamento de Morfologia, UNESP, Botucatu-SP.

Preparação das bibliotecas e sequenciamento

O RNA total foi extraído de tecido dérmico que foi submetido a uma fragmentação mecânica através de um homogeneizador na presença do reagente Trizol (Invitrogen). Os procedimentos de extração seguiram as especificações do fabricante, sendo a quantidade e a qualidade do RNA mensuradas por eletroforese em gel de agarose 1% e por espectrofotômetro (NanoVue). A integridade do RNA foi confirmada utilizando o equipamento Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) e os segmentos de RNA obtidos foram diluídos em água livre de RNase e estocados num freezer a -80° C até a realização das etapas subsequentes.

A preparação das bibliotecas e o sequenciamento Illumina paired-end foram realizados pelo Laboratório de Biotecnologia Animal da Esalq/Piracicaba. As bibliotecas de cDNA foram construídas segundo as especificações do (TruSeq RNA-seq Sample Prep kit - Illumina, Inc., CA, USA), sendo que as amostras foram inseridas em duas flow cells com 11 amostras por lane e sequenciadas num equipamento Illumina HiSeq2000 (Illumina Inc.).

Análises bioinformáticas

As análises bioinformáticas foram realizadas de forma concomitante e complementares no Laboratório Environment Centre Wales, Molecular Ecology and Fisheries Genetics Laboratory, School of Biological Sciences, College of Natural Sciences, Bangor University, Bangor, sob supervisão do Dr. Martin Ian Taylor e no Laboratório de

Biologia e Genética de Peixes, Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista UNESP, Botucatu-SP, sob supervisão do Dr. Claudio Oliveira. Os resultados no formato de sequências (FastQ) foram separados por amostra pela identificação do barcode inserido na etapa de preparação das bibliotecas. Os reads de cada amostra foram concatenados em dois arquivos (reads 1 e reads 2), que foram submetidos a uma análise de qualidade das sequências geradas através do programa FastQC. O programa Geneious v. R8 foi utilizado para a realização das análises iniciais de montagem dos transcriptomas, utilizando o transcriptoma do zebrafish (*Danio rerio*) como referência.

Resultados e Discussão

No presente trabalho foram sequenciados transcriptomas das espécies *Pimelodella vanhadavae* e *Rhamdia quelen* da família Heptapteridae (Figura 1). Na Tabela 1 são apresentados dados da quantidade, qualidade e integridade dos fragmentos de RNA extraídos das amostras e o total de sequências obtidas para cada um dos espécimes analisados. As quantidades obtidas de RNA extraído apresentaram-se dentro da variação aceitável para a construção de bibliotecas enriquecidas para o sequenciamento NGS, sendo constatado que os valores de integridade obtidos estão de acordo com aqueles recomendados pela empresa Illumina e considerados suficientes para prosseguir com o sequenciamento, tendo sido obtido um número adequado de sequências de qualidade para cada amostra. Os gráficos de qualidade das sequências geradas (reads 1 e 2 concatenados) são apresentados na Figura 2.

Os padrões de coloração têm sido interpretados como resultado de um processo evolutivo, sendo papel central da Biologia Evolutiva entender como os genes se relacionam no desenvolvimento dos fenótipos dos organismos (Alexandrou et al., 2011). A busca de

similaridade, utilizando a ferramenta BLAST, permitiu a montagem do transcriptoma a partir de um transcriptoma de referência, no caso o de zebrafish (*Danio rerio*). Foram obtidos 34.015.268 sequências para *P. avanhadavae* e 49.575.056 para *R. quelen* correspondências com o transcriptoma de zebrafish, com a utilização de 29.398.330 reads. Foram feitas buscas por genes relacionados à pigmentação já identificados para o zebrafish (Kesh et al., 1996), tendo sido encontrados 58 genes compatíveis, que serão conferidos antes da sua validação. Entre esses foram identificados genes relacionados com pigmentação, que apresentaram valores de similaridade entre 44.7 a 94.3% com os genes de zebrafish. Para alguns desses, os valores de similaridade foram bastante altos, sendo evidenciados os genes myelin expression, premelanosome protein, dystrobrevin binding protein, todos eles diretamente relacionados à formação de pigmentação. A comparação desses dados com os de outros peixes certamente será de importância no entendimento desses genes na determinação do padrão de coloração apresentado por essas espécies (Figura 2).

De modo mais geral, os dados obtidos neste estudo revelam a ocorrência de genes similares para o desenvolvimento de padrões de coloração e parecem demonstrar que a competição por recursos é susceptível de ter um papel dominante na estruturação das comunidades, sendo simultaneamente sensível aos efeitos de interações positivas e negativas. E os genes relacionados aos padrões de coloração parecem representar fatores determinantes nas relações entre indivíduos e comunidades que ocupam o ambiente aquático. Considera-se que a comparação desses dados com os de outras espécies da mesma família e de famílias relacionadas poderão possibilitar uma melhor compreensão da importância e do papel desses genes na determinação do padrão de coloração em peixes.

Referências

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

Tabela 1. Quantidade, qualidade, integridade e total de sequencias de RNA obtidas nas análises genômicas de representantes da família Heptapteridae.

Espécies	Nano Vue			BioAnalyser	Total de
	ng/ul	280/260	280/230	RIN	Sequências
<i>P. avanhandavae</i>	909,2	1,94	2,14	7,0	34.015.268
<i>R. quelen</i>	942,0	1,92	1,95	8,5	49.575.056

Tabela 2. Contigs gerados na montagem do transcriptoma de *Pimelodella avanhadavae* evidenciando similaridade com genes relacionados à pigmentação em *Danio rerio*.
Nº Nucl: Nucleotides Number; **Nº Sequ:** Sequences Number; **I.Sit.:** Identical sites.

Ref Seq Name	Description	Nº Nucl	Seq	% Identical Sites	%Pairwise Identity
NM_200309	3,123 reads assembled to NM_200309	316944	3124	6.4%	43.9%
NM_201134	604 reads assembled to NM_201134	62798	605	38.5%	44.7%
NM_001017770	630 reads assembled to NM_001017770	65808	631	45.7%	46.6%
NM_001110469	2,068 reads assembled to NM_001110469	210396	2069	14.1%	46.7%
NM_199673	2,627 reads assembled to NM_199673	270758	2628	51.6%	47.0%
NM_001089471	487 reads assembled to NM_001089471	52915	488	35.7%	49.7%
NM_001080678	441 reads assembled to NM_001080678	45909	442	32.5%	49.8%
NM_001033918	220 reads	24439	221	9.4%	50.3%

	assembled to NM_0010339 18				
AY538713	3 reads assembled to AY538713	2306	4	26.9%	51.4%
NM_001082848	11 reads assembled to NM_0010828 48	2378	12	22.5%	52.1%
NM_001008626	1,613 reads assembled to NM_0010086 26	166624	1614	23.0%	52.6%
NM_001007773	397 reads assembled to NM_0010077 73	42534	398	53.9%	53.8%
NM_001044814	726 reads assembled to NM_0010448 14	74395	727	54.0%	55.7%
NM_001291708	713 reads assembled to NM_0012917 08	73852	714	60.3%	58.1%
NM_001030105	1,000 reads assembled to NM_0010301 05	102428	1001	37.1%	58.3%
NM_194424	5,904 reads assembled to	602473	5905	26.0%	58.6%

NM_194424					
NM_213342	9,989 reads assembled to NM_213342	1013025	9990	20.3%	59.4%
NM_001037423	880 reads assembled to NM_0010374 23	90850	881	23.7%	74.6%
AY581204	109,308 reads assembled to AY581204	11118217	10930 9	2.8%	77.5%
NM_200978	2,901 reads assembled to NM_200978	297370	2902	12.0%	81.0%
NM_199879	807 reads assembled to NM_199879	84629	808	47.3%	84.2%
NM_001146149	21 reads assembled to NM_0011461 49	4321	22	75.7%	86.0%
NM_200172	706 reads assembled to NM_200172	73059	707	37.6%	87.8%
NM_173265	16 reads assembled to NM_173265	3650	17	59.4%	89.4%
NM_001110479	662 reads assembled to NM_0011104 79	68568	663	48.0%	90.1%

NM_001045036	108 reads assembled to NM_001045036	12111	109	63.2%	90.4%
NM_001137657	73 reads assembled to NM_001137657	16715	74	66.4%	90.6%
NM_001045330	761 reads assembled to NM_001045330	79569	762	8.7%	92.1%
NM_001006660	92 reads assembled to NM_001006660	13885	93	75.3%	92.1%
NM_199620	1,599 reads assembled to NM_199620	163633	1600	32.3%	92.2%
NM_001143918	38 reads assembled to NM_001143918	6768	39	71.9%	92.6%
NM_001137661	55 reads assembled to NM_001137661	14906	56	75.2%	93.0%
NM_173270	2,941 reads assembled to NM_173270	298826	2942	46.8%	93.1%
AY682553	30 reads assembled to	5033	31	60.3%	93.1%

AY682553					
NM_131875	354 reads assembled to NM_131875	38985	355	43.1%	93.7%
NM_205554	934 reads assembled to NM_205554	96109	935	16.1%	94.3%
NM_001024454	1,539 reads assembled to NM_0010244 54	157839	1540	44.4%	94.3%
NM_001042720	80 reads assembled to NM_0010427 20	12529	81	77.4%	94.4%
NM_001034971	339 reads assembled to NM_0010349 71	36636	340	68.9%	94.5%
NM_173237	1,412 reads assembled to NM_173237	144347	1413	36.0%	94.7%
AY682554	83 reads assembled to AY682554	10225	84	60.6%	95.3%
NM_001031676	37,030 reads assembled to NM_0010316 76	3742442	37031	8.7%	95.5%
NM_131847	229 reads assembled to	24724	230	43.1%	95.5%

NM_131847					
NM_200909	12,325 reads assembled to NM_200909	1246793	12326	30.9%	95.7%
NM_001002539	358 reads assembled to NM_001002539	37201	359	47.0%	95.7%
NM_173254	298 reads assembled to NM_173254	31367	299	47.5%	95.7%
NM_001144799	185 reads assembled to NM_001144799	20430	186	57.1%	95.7%
NM_201296	16,352 reads assembled to NM_201296	1654134	16353	4.3%	95.8%
NM_001122710	159 reads assembled to NM_001122710	17692	160	57.9%	95.9%
NM_001014826	356 reads assembled to NM_001014826	40600	357	53.0%	96.2%
NM_001020698	1,729 reads assembled to NM_001020698	175608	1730	22.8%	96.3%
NM_001030284	483 reads	50698	484	37.1%	96.3%

	assembled to NM_0010302 84				
NM_200587	1,274 reads assembled to NM_200587	132763	1275	38.8%	96.3%
NM_131617	518 reads assembled to NM_131617	55826	519	59.6%	96.3%
NM_173255	776 reads assembled to NM_173255	79976	777	21.3%	96.4%
NM_131444	63,582 reads assembled to NM_131444	6422851	63583	6.9%	96.5%
NM_001034988	1,873 reads assembled to NM_0010349 88	191998	1874	35.1%	96.5%
NM_212928	380 reads assembled to NM_212928	40730	381	15.8%	96.6%
NM_001144782	295 reads assembled to NM_0011447 82	32462	296	63.2%	96.6%
NM_001105136	214 reads assembled to NM_0011051 36	23138	215	47.8%	96.7%
NM_001012247	3,987 reads	418021	3988	62.1%	96.8%

	assembled to NM_0010122 47				
NM_200882	48,836 reads assembled to NM_200882	4935230	48837	10.5%	96.9%
NM_001005320	564 reads assembled to NM_0010053 20	60882	565	48.0%	96.9%
NM_199537	3,904 reads assembled to NM_199537	395928	3905	14.4%	97.0%
NM_001030280	892 reads assembled to NM_0010302 80	92095	893	15.4%	97.0%
NM_001018123	1,411 reads assembled to NM_0010181 23	143330	1412	17.3%	97.1%
NM_131197	11,789 reads assembled to NM_131197	1192209	11790	34.9%	97.2%
NM_001002526	186 reads assembled to NM_0010025 26	19781	187	40.7%	97.3%
NM_001077355	23,024 reads assembled to NM_0010773	2327300	23025	1.2%	97.5%

55					
NM_001034979	1,978 reads assembled to NM_001034979	202142	1979	31.7%	97.6%
NM_001017818	31,255 reads assembled to NM_001017818	3157807	31256	39.0%	98.0%

Tabela 3. Contigs gerados na montagem do transcriptoma de *Rhamdia quelen* evidenciando similaridade aos genes relacionados à pigmentação em *Danio rerio*.

Ref Seq Name	Description	# Nucleotides	# Sequences	% Identical Sites	% Pairwise Identity
NM_001030284	4 reads assembled to NM_001030284	6374	5	26.8%	27.5%
NM_213342	126 reads assembled to NM_213342	157666	127	8.0%	28.9%
NM_205554	21 reads assembled to NM_205554	20539	22	14.3%	29.2%
NM_173265	424 reads assembled to NM_173265	428816	425	3.7%	29.5%
NM_131197	153 reads	169657	154	1.4%	29.6%

	assembled to NM_131197				
NM_194424	70 reads	73080	71	14.3%	29.6%
	assembled to NM_194424				
AY682554	111 reads	155366	112	32.6%	29.9%
	assembled to AY682554				
NM_001080678	72 reads	117592	73	4.5%	30.3%
	assembled to NM_001080678				
NM_201332	3 reads assembled to NM_201332	3590	4	26.9%	30.3%
NM_001030105	16 reads	19493	17	36.3%	30.3%
	assembled to NM_001030105				
NM_200309	43 reads	44330	44	6.9%	30.6%
	assembled to NM_200309				
NM_212928	109 reads	109216	110	8.8%	30.9%
	assembled to NM_212928				
NM_131444	53 reads	68550	54	44.3%	30.9%
	assembled to NM_131444				
NM_001017770	16 reads	24142	17	15.9%	31.0%
	assembled to NM_001017770				
NM_001008626	17 reads	27307	18	11.3%	31.6%
	assembled to				

NM_001008626					
NM_001110469	51 reads assembled to NM_001110469	61217	52	27.1%	32.8%
NM_199673	15 reads assembled to NM_199673	16383	16	24.6%	33.1%
NM_001082848	13 reads assembled to NM_001082848	16689	14	18.1%	33.9%
NM_200909	36 reads assembled to NM_200909	33478	37	48.8%	37.0%
NM_001031676	13 reads assembled to NM_001031676	22111	14	33.6%	37.9%
NM_199537	13 reads assembled to NM_199537	19210	14	45.0%	38.7%
NM_001110479	19 reads assembled to NM_001110479	32825	20	58.3%	40.2%
NM_001077355	11 reads assembled to NM_001077355	14429	12	48.9%	40.8%
NM_200882	11 reads assembled to NM_200882	28319	12	36.3%	41.6%
NM_200587	6 reads assembled to NM_200587	10608	7	56.8%	42.2%

NM_001037423	17 reads assembled to NM_001037423	16096	18	37.4%	42.4%
NM_201134	19 reads assembled to NM_201134	47934	20	12.8%	42.6%
NM_199620	29 reads assembled to NM_199620	35718	30	47.5%	42.7%
AY581204	163 reads assembled to AY581204	124257	164	3.1%	45.8%
NM_173270	26 reads assembled to NM_173270	27502	27	40.7%	46.3%
NM_001137661	8 reads assembled to NM_001137661	13101	9	41.4%	47.2%
NM_001024454	5 reads assembled to NM_001024454	8954	6	64.6%	48.6%
AY538713	6 reads assembled to AY538713	7657	7	25.1%	50.0%
NM_001291708	14 reads assembled to NM_001291708	16453	15	38.1%	50.5%
NM_001045330	9 reads assembled to NM_001045330	17140	10	52.0%	52.0%
NM_001007773	7 reads assembled to	6595	8	52.4%	52.0%

NM_001007773					
NM_001030280	4 reads assembled to NM_001030280	8341	5	21.6%	52.9%
NM_001034988	8 reads assembled to NM_001034988	10876	9	48.5%	53.8%
NM_001044814	7 reads assembled to NM_001044814	8258	8	46.0%	53.9%
NM_001143918	4 reads assembled to NM_001143918	11379	5	32.3%	55.5%
NM_001002539	5 reads assembled to NM_001002539	3644	6	51.9%	58.3%
NM_001089471	6 reads assembled to NM_001089471	14455	7	19.9%	59.9%
NM_001006660	4 reads assembled to NM_001006660	6410	5	65.9%	66.3%
AY682553	7 reads assembled to AY682553	14239	8	39.8%	69.0%
NM_200978	31 reads assembled to NM_200978	95600	32	37.6%	70.3%
NM_131617	5 reads assembled to NM_131617	6569	6	70.5%	70.8%
NM_001045036	11 reads	5836	12	61.1%	70.9%

	assembled to NM_001045036				
NM_001017818	76 reads	44054	77	49.9%	71.9%
	assembled to NM_001017818				
NM_173254	3 reads assembled to NM_173254	3761	4	58.5%	72.6%
NM_001034971	10 reads	18547	11	55.9%	73.5%
	assembled to NM_001034971				
NM_001005320	2 reads assembled to NM_001005320	4575	3	74.5%	76.3%
NM_001146149	4 reads assembled to NM_001146149	4159	5	73.0%	76.4%
NM_001012247	7 reads assembled to NM_001012247	37080	8	72.1%	79.8%
NM_131875	9 reads assembled to NM_131875	19046	10	51.3%	80.0%
NM_201296	3 reads assembled to NM_201296	8160	4	71.7%	80.2%
NM_001144799	2 reads assembled to NM_001144799	2819	3	81.6%	81.9%
NM_001042720	4 reads assembled to NM_001042720	9483	5	77.9%	82.9%

NM_001033918	19 reads assembled to NM_001033918	31988	20	48.5%	85.8%
NM_001020698	4 reads assembled to NM_001020698	5376	5	86.6%	86.2%

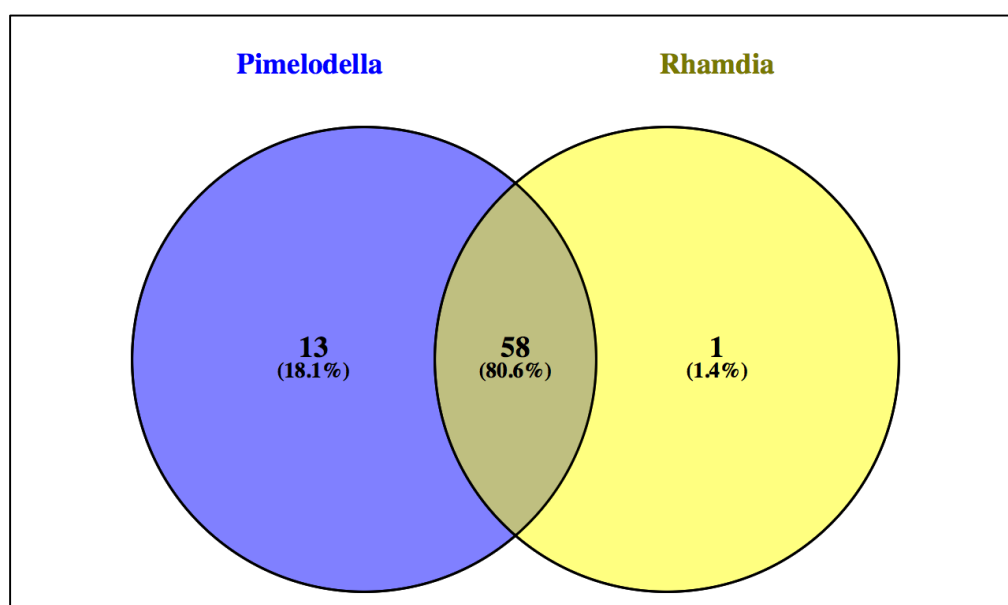


Figura 1. Gráfico gerado a partir do programa Venny 2.1 evidenciando a quantidade dos genes identificados relacionados com pigmentação e similares desses genes aos de zebrafish (*Danio rerio*).



Figura 2. Exemplares de **a** *Pimelodella avanhadavae* e em **b** *Rhamdia quelen* provenientes do Rio Araquá, bacia do Rio Tietê, Botucatu-SP, Brasil evidenciando os padrões de coloração das espécies de peixes da família Heptapteridae. A barra equivale a 1 cm.

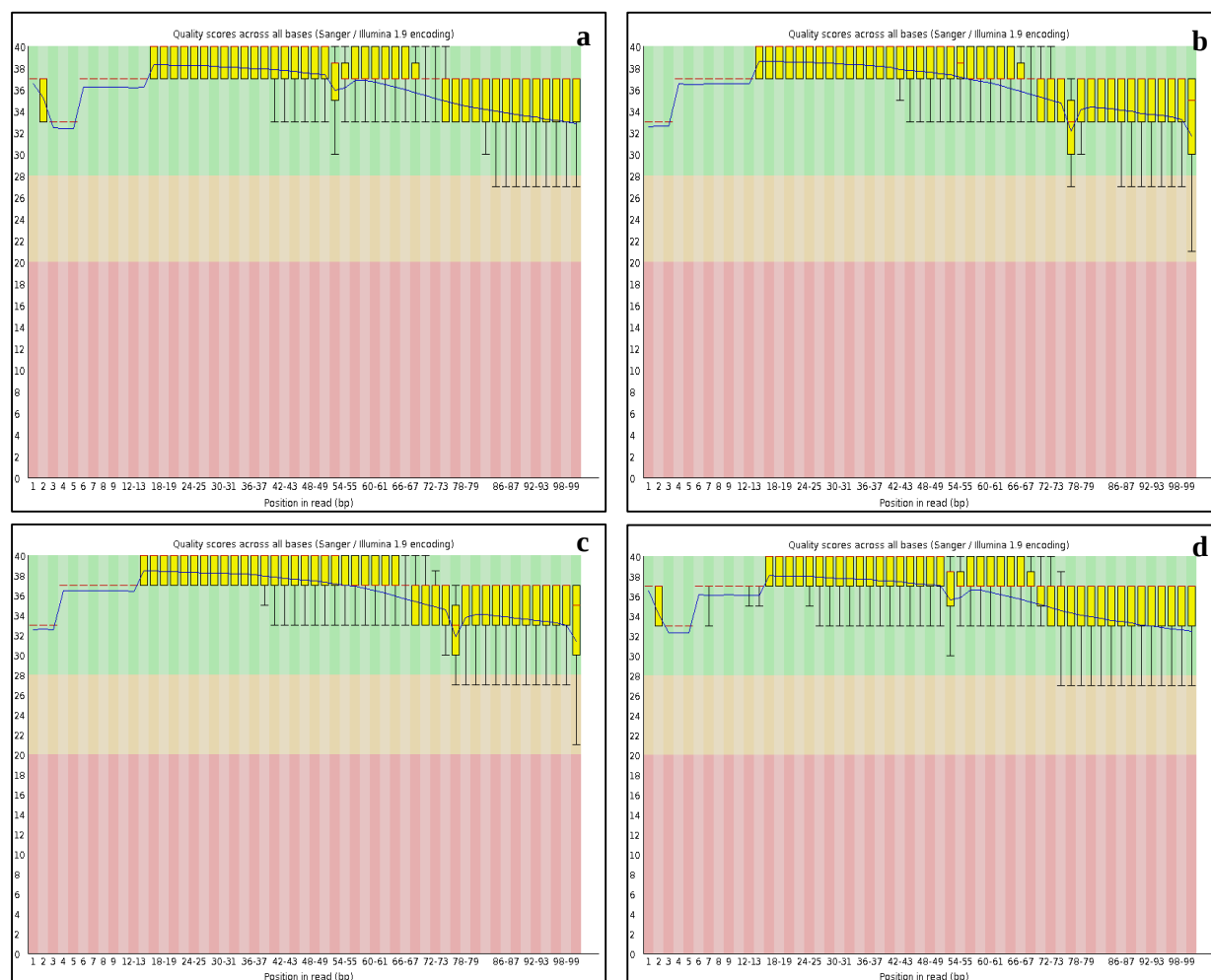


Figura 3. Gráfico representando a qualidade do sequenciamento com base nos reads 1 e 2 obtidos em **a** e **b** para *Pimelodella avanhandavae* e em **c** e **d** obtidos para *Rhamdia quelen*.

5 Considerações finais

O presente estudo se inseriu no programa geral de estudos de Citogenética e Genética Molecular de Peixes Neotropicais que vem sendo desenvolvido no Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (IBB/UNESP/Botucatu), visando aumentar o conhecimento sobre a composição cariotípica e a estrutura molecular dos peixes, estudando de modo mais específico a composição cariotípica e as características estruturais dos cromossomos das cinco espécies mais representativas da família Heptapteridae.

Os estudos citogenéticos realizados nas espécies *Rhamdia quelen*, *Pimelodella vanhadavae*, *Cetopsorhamdia iheringi*, *Heptapterus mustelinus* e *Imparfinis mirini* trouxeram informações significativas relacionadas aos processos de diversificação cromossômica, às relações entre os componentes desta família de peixes e à evolução cariotípica neste grupo. Os representantes analisados evidenciaram uma variação cariotípica de $2n=46$ a $2n=58$ cromossomos, sendo $2n=58$ cromossomos o número diploide predominante. As análises citogenéticas convencionais com bandamento C revelaram que os segmentos de heterocromatina são escassos, sendo os blocos heterocromáticos encontrados em pequena quantidade e distribuídos pelo genoma, demonstrando uma prevalência de bandas pálidas e pouco evidentes em todas as espécies estudadas.

O mapeamento cromossômico dos genes de DNA ribossomal 5S e 18S mostrou diferentes padrões de distribuição nas espécies analisadas. Enquanto as espécies *Cetopsorhamdia iheringi* e *Imparfinis mirini* apresentaram essas duas sequências de DNAr em sintonia, nas demais espécies as marcações foram identificadas em cromossomos distintos. Essa condição possivelmente se deve ao fato destas sequências terem passado por processos evolutivos independentes e, em decorrência, possuírem dinâmicas funcionais diferentes. Desta forma, o distanciamento físico destes dois tipos de sequências poderia

constituir um cenário mais interessante para um melhor desempenho das suas funções fisiológicas.

No presente estudo foi aplicada a técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) para analisar a distribuição de diferentes sequências microssatélite no genoma utilizando os oligonucleotídeos marcados (CA)₁₅, (GA)₁₅, (CG)₁₅ e (TTA)₁₀. Marcações conspícuas fluorescentes foram identificadas preferencialmente nas regiões terminais dos cromossomos, sendo que alguns sinais também foram observados tanto em regiões eucromáticas como heterocromáticas dos cromossomos, mostrando a contribuição destas sequências repetitivas na diversificação cromossômica das espécies analisadas. Tais informações vêm se juntar ao crescente entendimento do papel das sequências de DNA repetitivo na estruturação e funcionamento do genoma e, neste caso nas principais espécies da família Heptapteridae.

Além das análises citogenéticas também foi realizado um estudo envolvendo as espécies *Rhamdia quelen* e *Pimelodella vanhadavae*, utilizando o transcriptoma como ferramenta para identificação da ocorrência dos genes relacionados à cor e sua atuação no desenvolvimento de padrões de coloração em peixes. A comparação dos dados obtidos e sua aplicação em outras espécies de peixes da mesma família e de grupos relacionados poderão resultar numa melhor compreensão dos mecanismos genéticos envolvidos na determinação dos padrões de colorido nestas espécies, bem como da importância e desempenho dos genes envolvidos nestes processos.

6 Referência Bibliográficas

- Abucarma M and Martins-Santos IC. (2001). Karyotype and B chromosome of *Rhamdia* species (Pisces, Pimelodidae) endemic in the River Iguaçu basin. *Cytologia* 66: 299-306.
- Alexandrou M, et al. (2011). Competition and phylogeny determine community structure in Müllerian co-mimics. *Nature* 469: 84-86.
- Almeida-Toledo LF, Foresti F, Toledo-Filho SA. (2000b). Karyotypic evolution in Neotropical freshwater fish. In: *Chromosome Today Switzerland*: Birkhauer Verlag 13:169-182.
- Almeida-Toledo LF, Foresti F, Trajano E, and Toledo-Filho AS. (1992). Cytogenetic analysis of the blind catfish *Pimelodella kronei* and of its presumed ancestor *Pimelodella transitoria*. *Caryologia* 45: 255-262.
- Almeida-Toledo LF, Foresti F. (2001). Morfologically differentiated sex chromosomes in Neotropical freshwater fish. *Genética* 76767.111: 1-3.
- Almeida-Toledo LF, Garcia C. (2008). Snálises cromossômicas comparativas em espécies do gênero *Pimelodella* (Siluriformes, Heptapteridae): ocorrência de cromossomos sexuais e polimorfismos estruturais e numéricos. *Anais XII Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes*. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia – MG.
- Alves AL, Oliveira C, Nirchio M, Granado A, Foresti F. (2006). Karyotypic relationships among the tribes of *Hypostominae* (Siluriformes: Loricariidae) with description of X0 sex chromosome system in a Neotropical fish species. *Genetica* 128:1-9.
- Alves-Costa FA, Wasko AP, Oliveira C, Foresti F, Martins C. (2006). Genomic organization and evolution of the 5S ribosomal DNA in Tilapiini fishes. *Genetica* 127: 243-252.
- Alves-Gomes JA. (2001). The evolution of electroreception and bioelectrogenesis in teleost fish: a phylogenetic perspective, *Journal of Fish Biology* 58: 1489–1511.

- Amici A, Rollo F. (1991). The nucleotide sequence of the 5S ribosomal RNA gene of *Pyenophora graminea*. *Nucleic Acids Research* 19:5073.
- Andreatta AA, Almeida-Toledo LF, Oliveira C, Toledo-Filho SA. (1993). Chromosome studies in *Hypoptopomatinae* (Pisces, Siluriformes, Loricaridae): II. ZZ/ZW sex chromosome system, B chromosomes, and constitutive heterocromatin differentiation in *Microlepidogaster leucofrenatus*. *Cytogenetics and Cell Genetics* 63:215-220.
- Arratia G, Kapoor BG, Chardon M, Diogo R. (2003). Catfishes. 2 vol., Phmouth: Science Publischers 844p.
- Artoni RF, Bertollo LAC. (2002). Evolutionary aspects of the ZZ/ZW sex chromosome system in the Characidae fish, genus *Triportheus*. A monophyletic state and NOR location on the W chromosome. *Heredity* 89: 15-19.
- Bates GP, Wainwright BJ, Williamson R, Brown SDM. (1986). Microdissection and microclonning from the short arm of human chromosome 2. *Molecular and Cellular Biology* 6:3826-3830.
- Bertollo LAC, Cavallaro ZI. (1992). A highly differentiated ZZ/ZW sex chromosome system in a Characidae fish *Triportheus guentheri*. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 60: 60-63.
- Bertollo LAC, Mestriner CA. (1998). The X1X2Y sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus* II Meiotic analysis. *Chromosome Research* 6:141-147.
- Biémont C and Vieira C. (2006). Junk DNA as an evolutionary force. *Nature* 443:521-524
- Biet E, Sun J, Dutreix M. (1999). Conserved sequence preference in DNA binding among recombinant proteins: abnormal effect of sDNA secondary structure. *Nucl. Acid. Res.*, v.27, p.596- 600.
- Bitencourt JA, Affonso PRAM, Giuliano-Caetano L, Carneiro PLS, Dias AL. (2012). Population divergence and peculiar karyoevolutionary trends in the loricariid fish *Hypostomus aff. unae* from northeastern Brazil. *Genet Mol Res* 11:933–943
- Bockmann FA. (1994). Description of *Mastiglanis asopos*, a new pimelodid catsh from northern Brazil, with comments on phylogenetic relationships inside the subfamily

- Rhamdiinae (Siluriformes: Pimelodidae). Proceedings of the Biological Society of Washington 107: 760–777.
- Bockmann FA. (2007). Família Heptapteridae. In: Catálogo das Espécies de Peixes de Água Doce do Brasil (Buckup PA, Menezes NA and Ghazzi MS, eds.). Museu Nacional, Rio de Janeiro, 104-109.
- Bockmann FA, Guazelli GM. (2003). Heptapteridae. In: Reis, R. E., Kullander, S. O., and Ferraris, Jr., C. J. (eds.). Check list of Freshwater Fishes of South and Central America (CLOFFSCA), 1st edition. Edipucrs, Porto Alegre 406–431.
- Borba, RS, Parise-Maltempi, PP, and Alves, AL. (2009). Tendência da evolução cariotípica na família Heptapteridae (Teleostei: Siluriformes). In: Resumos do 55º Congresso Brasileiro de Genética, Águas de Lindóia.
- Borba RS, Silva EL, Pacheco ACS, Parise-Maltempi PP, Alves AL. (2011). Trends in the karyotypic evolution of the Neotropical catfish family Heptapteridae Bockmann 1998 (Teleostei: Siluriformes). Reviews in Fish Biology and Fisheries, 22: 509-518.
- Britski HA. (1981). Peixes de água doce. In: Carvalho, J.C.M. (Coord.) Atlas da fauna brasileira. Melhoramentos, São Paulo, SP 84-93 pp.
- Britski HA, Sato Y, Rosa ABS (1988). Manual de identificação de peixes da região de Três Marias (com chave de identificação para os peixes da Bacia do São Francisco). 3^a ed. Minas Gerais, Ministério da Irrigação - CODEVASF 115p.
- Buckup PA, Menezes NA, Ghazzi MS. (2007). Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil. Série livros 23 Museu Nacional. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- Centofante L, Bertollo LAC, Moreira Filho O. (2002). A ZZ-ZW sex chromosome system in a new species of the genus *Parodon* (Pisces, Parodontidae). Caryologia 55:139-150.
- Centofante L, Bertollo LAC, Buckup PA, Moreira-Filho O. (2003). Chromosomal divergence and maintenance of sympatric *Characidium* fish species (Chrenuchidae, Characidiinae). Hereditas 138: 213-218.

- Charlesworth B, Sniegowski P, Stephan W. (1994). The evolutionary dynamics of repetitive DNA in Eukaryotes. *Nature*, 371: 215-220.
- Cioffi MB, Martins C, Bertollo LAC. (2010). Chromosome spreading of associated transposable elements and ribosomal DNA in the fish *Erythrinus erythrinus*. Implications for genome change and karyoevolution in fish. *BMC Evolutionary Biology*, 10:271-280.
- Cioffi MB, Kejnovský E, Marquioni V, Poltronieri J, Molina WF, Diniz D et al. (2012). The key role of repeated DNAs in sex chromosome evolution in two fish species with ZW sex chromosome system. *Mol Cytogenet* 5:28
- Cioffi MB, Moreira-Filho O, Almeida-Toledo LF, Bertollo LAC (2012) Review Paper. The contrasting role of heterochromatin in the differentiation of sex chromosomes: an overview from Neotropical fishes. *Journal of Fish Biology*, 80: 2125–2139.
- Cole CJ, Levans CR. (1971). Chromosome preparations of amphibian and reptiles: improved technique. *Herpetology* 3:102-1971.
- Dawe RK. (2003). RNA interference, transposons, and the centromere. *The Plant Cell Online*, 15: 297-301.
- de Pinna MCC (1998). Phylogenetic relationships of Neotropical Siluriformes: historical overview and synthesis of hypothesis. In: Malabarba, LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZMS, Lucena CAS, (eds.) *Phylogeny and classification of Neotropical Fishes*. Edpurcs, Porto Alegre, Brasil 279-330.
- de Souza L, Giuliano-Caetano L, Dias AL. (2004). Banding chromosome pattern of two species of *Pimelodus* (Siluriformes, Pimelodidae) from the Paraná River basin of Brazil. *Folia Biol.* 52: 165-169.
- Deng HX, Yoshiura KI, Dirks RW, Harada N, Hirota T, Tsukamoto K, Jinno Y, Nuikawa N. (1992). Chromosome-band-specific painting: chromosome *in situ* suppression hybridization using PCR products from a microdissected chromosome band as probe tool. *Human Genetics*, 89:13-17.
- Dias AL, Foresti F. (1993). Cytogenetic studies on fishes of the family Pimelodidae (Siluroidei). *Rev Brasil Genet* 16:585–600

- Dimitri P, Junakovici N. (1999). Revising the selfish DNA hypothesis new evidence on accumulation of transposable elements in heterochromatin. *Trends in Genetics* 15: 123-124
- Drouin G, Moniz de Sá M. (1995). The concerted evolution of 5S ribosomal genes linked to the repeats of other multigene families. *Molecular Biology Evolution*, 12: 481-493.
- Fenocchio AS, Bertollo LAC. (1990). Supernumerary chromosomes in a *Rhamdia hilarii* population (Pisces, Pimelodidae), *Genetica* 81: 193–198.
- Fenocchio AS, Bertollo LAC, Takahashi CS, Camacho JP. (2000). Considerations on B-chromosome origin and distribution in fish populations of genus *Rhamdia* (Siluriformes, Pimelodidae). *Folia Biologica* 48, 105-109.
- Fenocchio AS, Swarça AC, Dias AL, Cestari MM. (2002). Caracterização Cromossômica (Giemsa, Bandas C, NORS, CMA3 e FISH) de *Rhamdia quelen* do Alto Rio Iguaçu (Estado do Paraná). In: Anais do IX Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes, Universidade Estadual de Maringá, Maringá.
- Fenocchio AS, Bertollo LAC, Takahashi CS, Dias AL, Swarça AC. (2003). Cytogenetic studies and correlate considerations on Rhamdiinae relationships (Pisces, Siluroidei, Pimelodidae), *Cytologia* 68:363-368
- Ferraris Jr CJ. (2007). Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. *Zootaxa* 1418: 1-628.
- Ferraris Jr CJ. (1988). Relationships of the Neotropical catfish genus *Nemuroglanis*, with a description of a new species (Osteichthyes: Siluriformes: Pimelodidae). *Proceedings of the Biological Society of Washington* 101: 509–516.
- Ferraris Jr CJ. (2007). Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. *Zootaxa* 1418: 1–628.
- Ferreira DC, Porto-Foresti F, Oliveira C, Foresti F. (2011a). Transposable elements as a potential source for understanding the fish genome. *MobGen- et Elements* 1:1–6.
- Ferreira DC, Oliveira C, Foresti F. (2011b). Chromosome mapping of retrotransposable

- elements *Rex1* and *Rex3* in three fish species in the subfamily Hypoptopomatinae (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). *Cytogenet Genome Res* 132:64–70.
- Ferreira IA, Martins C. (2008). Physical chromosome mapping of repetitive DNA sequences in Nilo tilapia *Oreochromis niloticus*: Evidences for a differential distribution of repetitive elements in the sex chromosomes. *Micron* 39: 411-418.
- Fink SV, Fink WL. (1981). Interrelation ships of the ostariophysan fishes(Teleostei). *Zool J Linnean Soc* 72:297-353.
- Fonseca YM, Oliveira C, Foresti F, Maistro EL. (2003). First cytogenetic description of the species *Rhamdela microcephala* (Pisces, Heptapteridae), *Cytologia* 68: 31–34.
- Foresti F, Toledo FS, Almeida-Toledo LF. (1981). Polymorphic nature of the nucleolus organizer regions in fishes. *Cytogenetics Cell Genetics* 31: 134-141.
- Galetti Jr PM, Martins C. (2004). Contribuição da hibridação *in situ* para o conhecimento dos cromossomos de peixes. In: Guerra M (Ed). *Fluorescence in situ hybridization: conceitos e aplicações na citogenética*. Ribeirão Preto, SBG 61-88.
- Garcia C, Moreira-Filho O, Bertollo LAC, Centofante L. (2003). B chromosomes and natural triploidy in *Rhamdia* sp. (Pisces, Siluriformes, Heptapteridae), *Cytologia* 68: 403-411.
- Garcia C. (2005). Contribuição aos estudos citogeneticos em algumas espécies de 5 famílias de Siluriformes do Rio São Francisco. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- Garcia C, Almeida-Toledo LF. (2006). Conservação cariotípica em populações de Imparfinis (Siluriformes, Heptapteridae) das bacias do Mogi-Guaçu, Paranapanema e Paraíba do Sul. In: *Brazilian Symposium of Fish cytogenetics and Genetics. International Congress of Fishes Genetics*, SBG São Carlos, 110.
- Garcia C and Moreira-Filho O. (2008). Localization of ribosomal genes in three *Pimelodus* species (Siluriformes, Pimelodidae) of the São Francisco River: 5S genes as species markers and conservation of the 18S rDNA sites. *Genet. Mol. Biol*, 31: 261-264.
- Garcia C, Oliveira C, Almeida-Toledo LF. (2010). Karyotypic evolution trends in *Rhamdia*

- quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) with considerations about the origin and differentiation of its supernumerary chromosomes. *Genetics and Molecular Research* 9: 365–384.
- Garcia C, Almeida-Toledo LF. (2010). Comparative chromosomal analyses in species of the genus *Pimelodella* (Siluriformes, Heptapteridae): occurrence of structural and numerical polymorphisms *Caryologia* 63:32–40
- Gouveia JG, Moraes VPO, Sampaio TR, da Rosa R, Dias AL. (2012). Considerations on karyotype evolution in the genera *Imparfinis* Eigenmann and Norris 1900 and *Pimelodella* Eigenmann and Eigenmann 1888 (Siluriformes: Heptapteridae). *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 23: 215-227.
- Griffiths, SP (2000). The use of clove oil as an anaesthetic and method for sampling intertidal rockpool fishes. *J. Fish Biol.* 57: 1453–1464.
- Hashimoto DT, Porto-Foresti F. (2010). Chromosome polymorphism of heterochromatin and nucleolar regions in two populations of the fish *Astyanax bockmanni* (Teleostei: Characiformes). *Neotrop Ichthyol*, 8(4):861-866.
- Hatanaka TE, Gatetti PM Jr. (2004). Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus*, Agassiz 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetica* 122:239–244
- Henning F, Trifonov V, Ferguson-Smith MA, Almeida-Toledo LF. (2008). Non-homologous sex chromosomes in two species of the genus *Eigenmannia* (Teleostei: Gymnotiformes). *Cytogenetic and Genome Research*, 121: 55-58.
- Hochberg VBM, Erdtmann B. (1988). Cytogenetical and morphological considerations on *Rhamdia quelen* (Pisces, Pimelodidae): the occurrence of B chromosomes and polymorphic NOR regions. *Rev. Bras. Gent.* 11: 563-576.
- Howel WM, Black DA. (1980). Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, 36: 1014-1015.
- Hu L, Sham JS, Tjia WM., Tan YQ, Lu GX, Guan XY. (2004). Generation of a complete set of human telomeric band painting probes by chromosome microdissection.

Genomics, 83: 298-302.

Hua-Van A, Le Rouzic A, Maisonhaute C, Capy P. (2005). Abundance, distribution and dynamics of retrotransposable elements and transposons: similarities and differences. *Cytogenetic and Genome Research* 110: 426-440.

Jain D, Hebden AK, Nakamura TM, Miller KM, Cooper JP. (2010). HAATI survivors replace canonical telomeres with blocks of generic heterochromatin. *Nature* 467: 223–227. doi: 10.1038/nature09374

Jesus CM, Galetti-Júnior PM, Valentini SR, Moreira-Filho O. (2003). Molecular characterization and chromosomal localization of two families of satellite DNA in *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae), a species with B chromosomes. *Genetica* 118: 25-32.

Jurka J, Kapitonov VV, Pavlicek A, Klonowski P, Kohany O, Walichiewicz J. (2005). Repbase update, a database of eukaryotic repetitive elements. *Cytogenet Genome Research* 110: 462-467

Kantek DLZ, Peres WAM, Buckup PA, Moreira-Filho O. (2009). Cytogenetics of *Imparfinis schubarti* (Siluriformes: Heptapteridae) from the Piumhi drainagem, a diverted river in Minas Gerais State, Brazil, *Zoologia* 26:733–738.

Kapoor BG. Science Publisher, Inc., USA.

Katagiri T, Asakawa S, Minagawa S, Shimizu N, Hino I, Aoki T. (2001). Construction and characterization of BAC libraries for three fish species; rainbow trout, carp and tilapia. *Animal Genetics* 32: 200–204.

Kavalco, KF; Pazza, R; Bertollo, LAC.; Moreira-Filho, O. (2004). Gene mapping of 5S rDNA sites in eight fish species from the Paraíba do Sul river Basin, Brazil. *Cytogenet. Genome Res* 106:107-110

Kejnovský E, Michalovova M, Steflova P, Kejnovska I, Manzano S, Hobza R, ... Vyskot B. (2013). Expansion of microsatellites on evolutionary young Y chromosome. *PloS One*, 8(1), e45519.

Kelsh RN, et al. (1996). Zebrafish pigmentation mutations and the processes of neural crest development. *Development* 123, 369-389.

- Kidwell MG. (2002). Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. *Genetica* 115: 49-63
- Kocher TDW, Lee H, Sobolewska D, Penmanad B, Mcandrew. (1998). A genetic linkage map of a cichlid fish, the tilapia *Oreochromis niloticus*. *Genetics* 148: 1225-1232.
- Kubat Z, Hobza R, Vyskot B, Kejnovsky E. (2008). Microsatellite accumulation on the Y chromosome in *Silene latifolia*. *Genome* 51:350–6.
- LeGrande WH. (1981). Chromosomal evolution in North American catfishes (Siluriformes, Ictaluridae) with particular emphasis on the madtoms, *Noturus* Copeia 1:33–52.
- Levan A, Fredga K, Sandberg AA. (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52:201–220
- Li YC, Kord AB, Fahima T, Berles A, Nero E. (2002). Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutation mechanisms: a review. *Molecular Ecology* 11:2453-2465.
- Li YC, et al. (2005) Karyotypic evolution of a novel cervid satellite DNA family isolated by microdissection from the Indian muntjac Y chromosome. *Chromosoma* 114: 28-38.
- Liu Z, Li P, Kocabas A, Karsi A, Ju Z. (2001). Microsatellite containing genes from the channel catfish brain: evidence of trinucleotide repeat expansion in the coding region of nucleotide excision repair gene RAD23B. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 289:317-324.
- Ludecke HJ, Senger G, Claussen U, Horsthemke B. (1989). Cloning defined regions of the human genome by microdissection of banded chromosomes and enzymatic amplification. *Nature* 338: 348-350.
- Lundberg JG, Bornbush AH, Mago-Leccio F. (1991a). *Gladioglanis conquistador* n. sp. from Ecuador with Diagnoses of the Subfamilies Rhamdiinae Bleeker and Pseudopimelodinae n. subf. (Siluriformes: Pimelodidae), *Copeia* 1: 190–209.
- Lundberg JG, Mago-Leccia F, Nass P. (1991b). *Exallodontus aguanai*, a new genus and species of Pimelodidae (Pisces, Siluriformes) from deep river channels of South

- America, and delimitation of the subfamily Pimelodinae. *Proc Biol Soc Wash* 104: 840-869.
- Maistro EL, Oliveira C, Foresti F. (2002). Cytogenetic analysis of A and B chromosomes of *Rhamdia hilarii* (Teleostei, Pimelodidae): C-Banding, silver nitrate and Cma3 staining and Restriction Endonuclease banding. *Cytologia* 67: 25-31.
- Mandrioli M. (2000). Mariner-Like transposable elements are interspersed within the rDNA- associated heterochromatin of the pufferfish *Tetraodon fluviatilis* (Osteichthyes). *Chromosome Res* 8:177–179.
- Marchal JA, Acosta MJ, Nietzel H, Sperling K, Bullejos M, Díaz de la Guardia R, Sánchez A. (2004). X chromosome painting in *Microtus*: Origin and evolution of the giant sex chromosomes. *Chromosome Research* 12: 767-776.
- Margarido VP, Moreira-Filho O. (2008). Karyotypic differentiation through chromosome fusion and number reduction in *Imparfinis hollandi* (Ostariophysi, Heptapteridae). *Genet Mol Biol* 31:235–238.
- Mariotto S, Artoni RF, Miyazawa CS. (2004). Occurrence of sexual chromosome, of the type ZZ/ZW, in *Ancistrus cf. dubius* (Loricariidae, Ancistrinae) of the Paraguay river basin, Mato Grosso, Brazil, *Caryologia* 57:327–331.
- Martinez ERM, Nirchio M, Granado A, Foresti F, Oliveira C. (2008). Cytogenetic analysis of three catfish species of the family Pseudopimelodidae (Teleostei, Siluriformes), *Genet Mol Biol* 31:692–696.
- Martins C, Galetti Jr. PM. (2000). Conservative distribution of 5S rDNA loci in *Schizodon* (Pisces, Anostomidae) chromosomes. *Chrom Res* 8: 353-355.
- Martins C, Wasko AP, Oliveira C, Porto-Foresti F, Parise-Maltempo PP, Wright JM, Foresti F (2002). Dynamics of 5S rDNA in the tilapia (*Oreochromis niloticus*) genome: Repeat units, inverted sequences, pseudogenes and chromosome loci, *Cytogenetic and Genome Research* 98: 78-85.

- Martins C, Oliveira C, Wasko AP, Wright JM (2004). Physical mapping of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) genome by fluorescent in situ hybridization of repetitive DNAs to metaphase chromosomes – a review. *Aquaculture*, 231 : 37-49.
- Martins C, Wasko AP. (2004). Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish genome. In: Williams CR, ed, *Focus on Genome Research*. Hauppauge, NY, USA: Nova Science Publishers, 289-318.
- Martins C. (2007). Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome: In: *Fish Cytogenetics*. Eds: Pisano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F, Kapoor BG. Science Publisher, Inc., USA.
- Mees, GF (1974). Auchenipteridae and Pimelodidae. *Zool. Verh* v.132:115-246
- Meltzer PS, Guan XY, Burgess A, Trent JM (1992). Rapid generation of region specific probes by chromosome microdissection and their application. *Nature Genetics*, 1: 24-28.
- Meltzer PS, Guan XY, Su AS, Gracia E, Trent JM. (1997). Identification of region specific genes by chromosome microdissection. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 93: 29-32.
- Milani D; Cabral-de-Mello, DC. (2014). Microsatellite Organization in the Grasshopper *Abracris flavolineata* (Orthoptera: Acrididae) Revealed by FISH Mapping: Remarkable Spreading in the A and B Chromosomes. *PLoS One*, 9:5.
- Molina WF, Schmid M, Galetti Jr. PM .(1998). Heterochromatin and sex chromosomes in the Neotropical fish genus *Leporinus* (Characiformes, Anostomidae). *Cytobios* 94: 141-149
- Moreira-Filho O, Bertollo LAC, Galetti Jr PM. (1993). Distribution of sex chromosome mechanisms in neotropical fish and description of a ZZ/ZW system in *Parodon hilarii* (Parodontidae). *Caryologia*, 46: 115-125.
- Nelson SJ. (2006). *Fishes of the world*. 4 th. Ed. United States of America. John Wiley & Sons. 600p.
- Neusser M, Münchb M, Anzenbergerb G, Müllera S. (2005). Investigation of marmoset hybrids (*Cebuella pygmaea* × *Callithrix jacchus*) and related Callitrichinae

- (Platyrrhini) by cross-species chromosome painting and comparative genomic hybridization. *Cytogenetic and Genome Research* 108: 191-196.
- Nieves M, Mühlmann M, Mudry MD. (2005). Heterochromatin and chromosome evolution: a FISH probe of *Cebus apella paraguayanus* (Primate: Platyrrhini) developed by chromosome microdissection. *Genetics and Molecular Research* 4: 675-683.
- Nuntakarn L, Mevatee U, Withyachumnarnkul B, Leardkamolkarn V, Fuchareon S. (2002). Application of micro-FISH for characterization of structural human chromosome abnormalities. *Science Asia*, 28:1-9.
- Oliveira C, Almeida-Toledo LF, Foresti F, Britski HA, Toledo-Filho AS. (1988). Chromosome formulae of Neotropical freshwater fishes. *Ver. rasil. Genet* 11:577-624.
- Oliveira C, Gosztonyi AE (2000). A cytogenetic study of *Diplomystes mesembrinus* (Teleostei, Siluriformes, Diplomystidae) with a discussion of chromosome evolution. Pansonato-Alves JC, Vicari MR, Oliveira C, Foresti F. (2011) Chromosomal diversification in populations of *Characidium cf. gomesi* (Teleostei, Crenuchidae). *Journal of Fish Biology*, 78: 183-194.
- Oliveira C, Almeida-Toledo LF, Foresti F. (2006) Karyotypic Evolution in Neotropical Fishes (Pisano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F, Kaapoor BG. eds) *Fish Cytogenetics*. USA. Science Publisher. 111-152.
- Parise-Maltempi PP, Martins C, Oliveira C, Foresti F. (2007). Identification of a new repetitive element in the sex chromosomes of *Leporinus elongatus* (Teleostei: Characiformes: Anostomidae): new insights into the sex chromosomes of *Leporinus*. *Cytogenet. Gen. Res.*, v.116, n.3, p.218-223.
- Pendas AM, Moran P, Garcia-Vazquez E. (1993). Multi-chromosomal location of ribosomal RNA genes and heterochromatin association in brown trout. *Chromosome Res* 1:63-67
- Phillips RB, Reed KM. (1996). Application of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) techniques to fish genetics: a review. *Aquaculture* 140: 197-216.

- Pinhal D, Yoshimura TS, Araki CS, Martins C. (2011). The 5S rDNA family evolves through concerted and birth-and-death evolution in fish genomes: an example from freshwater stingrays. *BMC Evolutionary Biology*, 11:151.
- Pinkel D, Straume T, Gray JW. (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:2934–2938
- Pinna MC. (1998). Phylogenetic relationships of Neotropical siluriforms (Teleostei: Ostario-physi): historical overview and synthesis of hypotheses. In: Malabarba LR, Vari RE, Lucena ZM, Lucena CA (Eds) *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Edipucrs, Porto Alegre, 279–330.
- Reis RE, Kullander SO, Ferraris C. (2003). *Check List of freshwater Fishes of South and Central America*. Porto Alegre: Edipucrs, 742 p.
- Roman, M. P., and Margarido, V. P. (2000). Estudos citogenéticos em três gêneros de Siluriformes (PISCES) coletados no Rio Iguaçu Quedas do Iguaçu Paraná. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- Ruiz-Ruano FJ, Cuadrado A, Montiel EE, Camacho JPM, López-León MD. (2014). Next generation sequencing and FISH reveal uneven and nonrandom microsatellite distribution in two grasshopper genomes. *Chromosoma*.
- Sampaio TR, Gravena W, Gouveia JG, Giuliano-Caetano L, Dias ALB. (2011). Microchromosomes in the family Curimatidae (Characiformes): mitotic and meiotic behavior. *Comp Cytogenet* 5:301–313
- Santure A, Gratten J, Mossman J, Sheldon B, Slate J. (2011). Characterization of the transcriptome of a wild great tit *Parus major* population by next generation sequencing. *BMC Genomics*. 12:283.
- Scacchetti PC, Pansonato-Alves JC, Utsunomia R, Claro FL, Almeida-Toledo LF, Oliveira C, Foresti F (2012). Molecular characterization and physical mapping of two classes of 5S rDNA in the genomes of *Gymnotus sylvius* and *G. inaequilabiatus* (Gymnotiformes, Gymnotidae). *Cytogenetic and Genome Research* 136: 131–137.

- Scacchetti PC, Utsunomia R, Pansonato JC, Vicari MR, Artoni RF, Oliveira C, Foresti F.(2015). Chromosomal mapping of repetitive DNAs in *Characidium*: genomic organization and the diversification of ZW sex chromosomes. *Cytogenet Genome* doi: 10.1159/000437165
- Schaefer SA. (1998) Conflict and resolution impact of new taxa on phylogenetic studies of Neotropical cascudinhos (Siluroide: Loticaridae). In: Phylogeny and classification of Neotropical fishes.(Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZMS, Lucana CAS, eds). EDIPUCRS, Porto Alegre, Brasil.
- Schunter C, Vollmer SV, Macpherson E and Pascual M (2014). Transcriptome analyses and differential gene expression in a non-model fish species with alternative mating tactics. *BMC Genomics*. 15:167.
- Schwartz JH (2001). The many dimensions of cAMP signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98. 24: 13482–4.
- Sene V, Pansonato-Alves J, 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.
- Sene et al. (2015) Mapping of the Retrotransposable Elements Rex1 and Rex3 in Chromosomes of *Eigenmannia* (Teleostei, Gymnotiformes, Sternopygidae). *Cytogenetic and Genome Research*. 146: 319-324
- Senger G, Ludecke HJ, Horsthemke B, Claussen U. (1990). Microdissection of banded human chromosomes. *Human Genetics*, 84: 507-511.
- Serrana D, Estévez A, Andree K, Johnston I. (2012). Fast skeletal muscle transcriptome of the Gilthead sea bream (*Sparus aurata*) determined by next generation sequencing.13:181.
- Silva M, Camargo EF, Almeida MC, Ludwi LAM. (2008). Monitoramento citogenético aplicado ao repovoamento de *Rhamdia* (Siluriformes, Heptapteridae) do rio Iguaçu.
- Sola L, De Innocentiis, S., Gornung, E. et al. (2000). Cytogenetic analysis of *Epinephelus marginatus* (Pisces: Serranidae), with the chromosome localization of the 18S and 5S rRNA genes and of the (TTAGGG)_n telomeric sequence. *Mar. Biol.* 137: 47–51.

- Stivari MK and Martins-Santos IC. (2004). Karyotype diversity in two populations of *Rhamdia quelen* (Pisces, Heptateridae). *Cytologia* 69:25–43.
- Stolf R, Swarc a AC, Guiliano-Caetano L, Dias AL. (2004). Analyses of karyotype and nucleolus organizer regions of *Imparfinis* aff. *schubarti* (Siluriformes, Pimelodidae) of the Tibagi river basin, Paraná, Brazil, *Caryologia* 57:348–352.
- Sumner AT. (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterocromation. *Exp Cell* 75: 304-306.
- Taguchi T, Akimaru K, Hirai H, Hirai Y, Mwenda JM, Taguchi KY. (2003). A probe generated by chromosome microdissection, useful for analyzing Y chromosome evolution in Old World monkeys. *Chromosome Research* 11: 147-52.
- Vicari MR, Artoni RF, Moreira-Filho O, Bertollo LAC. (2008). Colocalization of repetitive DNAs and silencing of major rRNA genes. A case report of the fish *Astyanax janaeirensis*. *Cytogenet. Genome Res* 122:67–72.
- Vicari MR, Nogaroto V, Noleto RB, Cestari MM, Cioffi MB, Almeida MC, Moreira-Filho, O, Bertollo LAC, Artoni RF. (2010). Satellite DNA in Neotropical fishes: Methods, applications and perspectives. *Journal of Fish Biology*, 76:1094-1116.
- Voltolin TA, Pansonato Alves JC, Senhorini JA, Foresti F, Camacho JPM, Porto- Foresti F. (2013). Common Descent of B Chromosomes in Two Species of the Fish Genus *Prochilodus* (Characiformes, Prochilodontidae). *Cytogenet Genome Res.*141:206–211
- Watanabe H, Suzuki A, Kobayashi M, Takahashi E, Itamoto M, Lubahn DB, Handa H, Iguchi T. (2003). Analysis of temporal changes in the expression of estrogen-regulated genes in the uterus. *Journal of Molecular Endocrinology*, 30 347–358.
- Wiltshire RN, Dennis TR, Sondak VK, Meltzer PS, Trent JM. (2001). Application of molecular cytogenetic techniques in a case study of human cutaneous metastatic melanoma. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 131: 97-103.
- Sumner, AT. (2003). *Chromosomes: organization and function*. London: Blackwell Publishing Company.

- Swarça AC, Fenocchio AS, Cestari MM, Dias AL. (2003b). Analysis of heterochromatin by combination of C-banding and CMA3 and DAPI staining in two fish species (Pimelodidae, Siluriformes). *Genetica* 119:87–92.
- Swarça AC, Vidotto AP, Dias AL. (2003). Cytogenetic characterization of *Pimelodella avanhandave* (Siluriformes, Pimelodidae) from Tibagi River (Paraná state, Brazil), *Caryologia* 56: 421–425.
- Swarça AC, Fenocchio AS, Dias AL. (2007). An update cytogenetic review for species of the Families Pseudopimelodidae, Pimelodidae and Heptapteridae (Pisces, Siluriformes). Suggestion of a cytotaxonomical classification. *Caryologia* 60:338-348
- Telenius H et al. (1992). Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics*, 13: 718-25.
- Terencio ML, Schneider CH, Gross MC, Vicari MR, Farias IP, Passos KB, Feldberg E (2013). Evolutionary dynamics of repetitive DNA in *Semaprochilodus* (Characiformes, Prochilodontidae): a fish model for sex chromosome differentiation. *Sexual Development*, 7(6), 325–33.
- Toledo, V. & Ferrari, I. (1976). Estudo citogenético de *Pimelodella* sp. e *Rhamdia hilarii* (Pimelodinae, Pimelodidae, Pisces): cromossomo marcador. *Científica* 4: 120-123
- Torres GA, Gong Z, Iovene M, Hirsch CD, Buell CR, Bryan GJ, Novák P, Macas J, Jiang J. (2011). Organization and evolution of subtelomeric satellite repeats in the potato genome. *Genetics* 1: 85–92. doi: 10.1534/g3.111.000125
- Tóth G, Gáspári Z, Jurka J (2000). Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Research*, 10(7), 967–81.
- Tsuda JR, de Moraes VPO, Giuliano-Caetano L, Dias AL. (2010). Occurrence of natural triploidy in *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae). *Genetics and Molecular Research* 9: 1929-1935.
- Vanzela ALL, Swarça AC, Dias AL, Stolf R, Ruas PM, Ruas CF, et al. (2002). Differential distribution of (GA)₉+C microsatellite on chromosomes of some animal and plant species. *Cytologia* 67:9-13.

- Vasconcelos C, Martins-Santos IC. (2000). Chromosome polymorphism in species of the Pimelodidae family (Pisces, Siluriformes). *Hereditas* 132: 103-109.
- Vidotto AP, Swarça CA, Fenocchio AS, Dias AL. (2004). Cytogenetic studies in three *Pimelodella meeki* populations (Pisces, Pimelodidae) from Tibagi River Basin (Brazil), *J Hered* 95:517–520.
- Vissotto PC, Foresti F, Oliveira C. (1997). A ZZ/ZW sex chromosome system in *Imparfinis mirini* (Pisces, Siluriformes). *Cytologia* 62:61–66
- Vissoto PC, Foresti F, Oliveira C. (1999). Supernumerary chromosomes in two species of the family Pimelodidae (Teleostei, Siluriformes), *Chromosome Sci.* 3:9-13.
- Vissotto PC, Foresti F, Oliveira C. (2001) Karyotypic characterization of two species of the genus *Imparfinis* (Teleostei, Siluriformes, Heptapteridae). *Chromosome Sci* 5:97–103
- Watanabe H, Suzuki A, Kobayashi M, Takahashi E, Itamoto M, Lubahn DB, Handa H, Iguchi T. (2003). Analysis of temporal changes in the expression of estrogen-regulated genes in the uterus. *Journal of Molecular Endocrinology*, 30 347–358.
- Yano CF, Margarido VP. (2012). First cytogenetic studies of the genus *Heptapterus* (Actinopterygii, Siluriformes): karyotype differentiation and review of cytogenetic data on the Heptapteridae family, *J Fish Biol* 81:939–953.
- Yano CF, Poltronieri J, Bertollo LAC, Artoni RF, Liehr T, Cioffi MB. (2014). Chromosomal Mapping of Repetitive DNAs in *Triplotheus trifurcatus* (Characidae, Characiformes): Insights into the Differentiation of the Z and W Chromosomes, *Plos ONE* 9(3), 1–7.
- Yang XF, Wang CY, Chen CH, Zhang H, Tian ZR, Li X, et al. (2014). Chromosome constitution and origin analysis in three derivatives of *Triticum aestivum*—*Leymus mollis* by molecular cytogenetic identification. *Genome* 57: 583–591.

Histórico Profissional

Viviani França de Sene

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Zoologia

. Mestrado em Ciências Biológicas (Programa de Pós-Graduação em Zoologia) Unesp

Botucatu: Agosto de 2009 a Julho de 2011 – **Bolsista Fapesp** (2009/12483-0)

Projeto: Citogenética Molecular e caracterização cromossômica no gênero *Eigenmannia* (Teleostei, Gymnotiformes, Sternopygidae) Orientação Dr. Fausto Foresti e Co-orientação Dr. José Carlos Pansonato-Alves.

. Doutorado em Ciências Biológicas (Programa de Pós-Graduação em Zoologia)

Unesp Botucatu: Fevereiro de 2012 a Março de 2016 – **Bolsista Capes** (3300406-

4) **Projeto:** Mapa cromossômico e análise citogenética molecular das espécies e populações de peixes da família Heptapteridae (Siluriformes) nas bacias hidrográficas dos rios Grande, Tietê e Paranapanema. Orientação Dr. Fausto Foresti e Co-orientação Dr. José Carlos Pansonato-Alves.

Prêmios e trabalhos em destaque

O trabalho intitulado em “Caracterização citogenética de uma população de *Eigenmannia virescens* (Pisces, Gymnotiformes) da bacia do Rio Tietê, Botucatu-SP foi escolhido entre os melhores para apresentação na forma oral, na **XIII Semana da Bio**, realizada no Instituto de Biociências, UNESP Botucatu, no período de 02 a 08 de novembro de 2009.

A Sociedade Brasileira de Genética concedeu **Menção Honrosa** pela participação no Prêmio Silvio de Almeida Toledo Filho, com o trabalho na área de Genética, evolução e melhoramento animal, intitulado “Chromosomal Mapping of the elements retrotranspos Rex1 and Rex3 in fish of the genus *Eigenmannia* (Teleostei, Gymnotiformes, Sternopygidae)”. **58º Congresso Brasileiro de Genética**, em Foz do Iguaçu-PR, período de 11 a 14 de setembro de 2012.

O trabalho “Mapeamento cromossômico de DNA repetitivos em *Rhamdia quelen* (Teleostei: Heptapteridae), foi escolhido entre os melhores para apresentação na forma oral, no **XVI Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes** realizado no Centro de Convenções do Hotel Holiday Inn, em Cuiabá MT, durante os dias 25 a 28 de outubro de 2015.

Lista de Publicações

Artigos completos publicados

Sene, Viviani; Pansonato-Alves, José Carlos; Utsunomia, Ricardo; Oliveira, Claudio; Foresti, Fausto. Karyotype diversity and patterns of chromosomal evolution in *Eigenmannia* (Teleostei, Gymnotiformes, Sternopygidae). Comparative Cytogenetics (Print), V. 8, P. 301-311, 2014

Sene, Viviani F.; Pansonato-Alves, José C.; Ferreira, Daniela C.; Utsunomia, Ricardo; Oliveira, Claudio; Foresti, Fausto. Mapping of the retrotransposable elements Rex1 and Rex3 in chromosomes of *Eigenmannia* (Teleostei, Gymnotiformes, Sternopygidae). Cytogenetic And Genome Research (Printed Ed.) V. 146, P. 1, 2015

Sánchez-Romero, Omar; Quezada Abad, César; Quizhpe Cordero, Patricio; de Sene, Viviani França; Nirchio, Mauro; Oliveira, Claudio. First Description of the karyotype and localization of major and minor ribosomal genes in *Rhoadsia altipinna* Fowler, 1911 (Characiformes, Characidae) From Ecuador. Comparative Cytogenetics (Print), V. 9, P. 271-280, 2015

M. Nirchio, C. Oliveira, Z. R. Siccha-Ramirez, V. F. Sene, O. R. Sánchez-Romero, N. R. Ehemann, V. Milana, A. R. Rossi and L. Sola. A possible cryptic Caribbean species of *Scorpaena* (actinopterygii: scorpaeniformes) suggested by cytogenetic and molecular data. *Journal of Fish Biology* (2016) doi:10.1111/jfb.13089.

Artigos submetidos para Publicação

Mauro Nirchio; Claudio Oliveira; Zoila Raquel Siccha-Ramirez; Viviani França Sene; Omar Rogerio Sánchez Romero; Ricardo Britzke; Luciana Sola; Valentina Milana; Anna Rita Rossi. The *Mugil curema* species complex: A new karyotype for the Pacific white mullet mitochondrial lineage

Marine Biology - Manuscript Number: MABI-D-16-00052

Fablene Gomes Paim, Viviani França de Sene e Lígia Souza Lima Silveira da Mota. Jogo da memória: a mosca da fruta

Genética na Escola - Manuscrito número: GE-MS2015-031

Projeto de extensão

O Jogo da memória “A Mosca da Fruta” é uma proposta didática elaborada com intuito de aprimorar os conhecimentos de biologia celular e hereditariedade dos alunos do Ensino Médio durante o curso de extensão **“Experimentando Genética”** ocorrido no Instituto de Biociências, UNESP/ Botucatu. Com o desenvolvimento dessa atividade é esperado um melhor *feedback* dos alunos com seus professores, especialmente numa melhor compreensão sobre as estruturas e organização das células e seus componentes assim como os cromossomos. Atividades lúdicas como o jogo “A mosca da fruta” pode ser uma excelente ferramenta de auxílio na abordagem de conteúdos do ensino de genética possibilitando o desenvolvimento da cognição e motivação além da afeição, socialização, e criatividade dos estudantes. Assim, adotar atividades lúdicas como jogos durante a prática de ensino torna a construção conhecimento mais dinâmico e produtivo.

Colaborações

Foi realizada uma parceria com o Professor Dr. Mauro Nirchio pelos próximos 3 anos junto a Universidade Técnica de Machala, Equador, para a realização de investigações científicas aplicando técnicas de Citogenética Molecular em peixes do Equador, podendo gerar artigos científicos.