

Viviani França de Sene

**Citogenética molecular e caracterização cromossômica no gênero
Eigenmannia (Teleostei, Gymnotiformes, Sternopygidae)**

Mestrado

**Botucatu
2011**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU**

**Citogenética molecular e caracterização cromossômica no gênero
Eigenmannia (Teleostei, Gymnotiformes, Sternopygidae)**

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

Viviani França de Sene

Orientador: Prof. Dr. Fausto Foresti

Co-orientador: Dr. José Carlos Pansonato Alves

Botucatu

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *SELMA MARIA DE JESUS*

Sene, Viviani França de.

Citogenética molecular e caracterização cromossômica no gênero
Eigenmannia (Teleostei, Gymnotiformes, Sternopygidae) / Viviani França de
Sene. – Botucatu, 2011

Dissertação (mestrado) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade
Estadual Paulista, 2011

Orientador: Fausto Foresti

Capes: 20204000

1. Peixe - Genética.

Palavras-chave: DNA ribossômico; *Eigenmannia*; Heterocromatina; Marcadores
moleculares; Rearranjos cromossômicos.

“Nas palmas de tuas mãos leio as linhas da minha vida...”

Cora Coralina

Dedico aos meus queridos pais José Roberto e Angela Maria
pelo amor incondicional.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus pelo dom da vida, por minha família maravilhosa e meus amigos.

Aos meus queridos avos Manoel, José, Joana e Antônia pelos momentos inexplicáveis “O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis” Fernando Pessoa.

Aos meus familiares pelo apoio e incentivo, em especial meus irmãos Vanessa e Vinícius, pela amizade, carinho e principalmente pela presença constante na minha vida.

À FAPESP pela concessão da bolsa de estudos e o financiamento do projeto de pesquisa.

Ao meu orientador Prof. Dr. Fausto Foresti, os meus mais sinceros agradecimentos pela oportunidade e pelo exemplo de vida. “A quem te pedir um peixe, dá uma vara de pescar. Pensando bem, não só a vara de pescar, também a linha, o anzol, a chumbada, a isca...” Cora Coralina.

Ao meu co-orientador Dr. José Carlos Pansonato Alves pela valiosa orientação, apoio e incentivo de sempre, à paciência e principalmente pela amizade agradeço imensamente por tudo!

Ao técnico do laboratório Renato Devidé, pela disposição em tudo que precisei e pela amizade.

Aos professores Dr. Artur Antônio Andreato e Dr. Cláudio de Oliveira, pelo exemplo, dedicação e incentivo em todos os momentos na vida acadêmica.

Aos amigos, Luiz Ricardo Paiva, Igor Ramos, Rita Camila Sampaio, Janaina Hadlich e Patrícia Hamada em especial a Juliana Gimenez por abrir as portas, pelo acolhimento e pela amizade “Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, é porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra...” Charles Chaplin.

Aos amigos de Botucatu Amanda, Priscilla, Ricardo, Aline, Érica, Elkin, Maria Ligia, Milke, Raquel, Kelly, Luz, Débora, Duílio, Patrícia, Vanessa, que se tornaram especiais, pelo carinho, pela disposição, pelas risadas e momentos de descontração “tudo que é bom dura o tempo necessário para se tornar inesquecível” Fernando Pessoa.

Aos amigos do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes pelo companheirismo, Bruno Melo, Bruno Franco, Bruno Ferrete, Gabriel, Guilherme, Luiz Henrique, Fernando Yuldi, Fernando Mendonça, Ricardo Britzki, Victor, Luciana,

Mahmould, Gleisy, Marlon, Jeferson, Tatiane enfim todos pelos momentos que passamos juntos.

Aos funcionários do departamento de Morfologia, ao Instituto de Biociências da Unesp de Botucatu e a pós graduação pelo auxílio pelo apoio em especial à D. Thera e D. Iolanda pelo carinho.

Aos amigos queridos e eternos Camila Ogava, Nayara Jorge, Camila Felcar, Mônica Maruchi, Wesley Diego e Viviane Nunes, pelo carinho, compreensão e sempre presente mesmo na distância “Mesmo que as pessoas mudem e suas vidas se reorganizem, os amigos devem ser amigos para sempre, mesmo que não tenham nada em comum, somente compartilhar as mesmas recordações” Vinícius de Moraes.

A todos que de alguma forma colaboraram acreditaram e me apoiaram para que mais um sonho acontecesse deixo meus sinceros agradecimentos.

Muito Obrigada!

Resumo

Foram analisadas seis espécies/citótipos de peixes do gênero *Eigenmannia*, *Eigenmannia* sp1, *Eigenmannia* sp2, *E. cf. trilineata*, *Eigenmannia* sp e dois citótipos de *E. virescens* de diferentes bacias hidrográficas brasileiras, com o uso de técnicas citogenéticas básicas (coloração com Giemsa, localização das RONS pela marcação com nitrato de Prata e bandamento C) e moleculares (hibridação fluorescente *in situ* com sondas de DNAr 18S e 5S, com sondas teloméricas (TTAGGG)_n, com sondas para elementos retrotransponíveis Rex 1 e Rex 3 e também por microdissecção, amplificação e hibridação *in situ* fluorescente com sonda produzida a partir do cromossomo sexual Y de *Eigenmannia* sp2). As espécies/citótipos analisados apresentaram intensa variação em seus números diploides, de 2n=28 cromossomos em *Eigenmannia* sp1, 2n=31/32 em *Eigenmannia* sp2, 2n=34 em *E. cf. trilineata*, 2n=36 em *Eigenmannia* sp e 2n=38 em *E. virescens*, além da ocorrência de sistema sexual XX-XY no citótipo de *E. virescens* do rio Ribeirão Claro (chamado de *E. virescens*-XY) e ausência desse sistema no citótipo do rio Mogi-Guaçu (chamado de *E. virescens*), bem como a ocorrência de sistema múltiplo do tipo X₁X₁X₂X₂-X₁X₂Y em *Eigenmannia* sp2 do rio Araquá. O DNAr 5S está organizado em duas classes distintas e foi localizado em diferentes cromossomos entre estas espécies/citótipos, mas sempre em posição terminal dos cromossomos, com exceção apenas do par cromossômico 7 de *Eigenmannia* sp1, que possui DNAr 5S em posição intersticial. Ainda, sequências de DNAr 5S foram localizadas no par sexual XY do citótipo de *E. virescens*-XY, evidenciando uma nova característica dos cromossomos sexuais deste grupo. As RONS, identificadas pelo tratamento com nitrato de Prata e pela sonda de DNAr 18S, foram sempre localizadas em compartimentos cromossômicos distintos do DNAr 5S e, apesar de serem localizadas em diferentes cromossomos entre as amostras analisadas, mantiveram-se conservadas durante o processo de diferenciação cariotípica deste grupo. A análise da heterocromatina constitutiva, através do bandamento C, revelou que as espécies com menor número cromossômico possuem menor quantidade desta porção genômica e que os cromossomos sexuais observados em duas espécies/citótipos apresentam padrões distintos de heterocromatinização. Enquanto os cromossomos X e Y de *Eigenmannia* sp2 possuem heterocromatina apenas em posição centromérica, os cromossomos sexuais de *E. virescens*-XY, notadamente o X, possui grandes blocos heterocromáticos em posição terminal. Experimentos de hibridação *in situ* foram realizados também usando sondas produzidas a partir dos elementos retrotransponíveis Rex 1 e Rex 3. Para todas as espécies analisadas, tanto o elemento retrotransponível Rex 1 quanto Rex 3 apresentaram um padrão de dispersão

similar, sendo que os dois elementos estão organizados em pequenos *clusters* e dispersos em todos os cromossomos das espécies/citótipos analisadas, com exceção de *Eigenmannia* sp2, que apresentou um acúmulo acentuado do elemento Rex 3 em regiões centroméricas ricas em heterocromatina. Foi produzida ainda, uma sonda a partir do cromossomo sexual Y de *Eigenmannia* sp2, obtida por microdissecção cromossômica e DOP-PCR. Essa sonda evidenciou sinais de hibridação nos cromossomos Y e X e também nos blocos heterocromáticos de alguns cromossomos autossômicos. Estas análises, além de confirmar hipóteses sobre a evolução cariotípica no gênero *Eigenmannia*, trazem novas informações acerca da distribuição do material genético presente nos cromossomos das amostras analisadas, fornecendo novos subsídios para o entendimento do processo de diferenciação cromossômica neste complexo grupo de peixes Neotropicais.

Abstract

Conventional (Giemsa, Ag-NOR, C-banding) and molecular (Fluorescent *in situ* hybridization with 18S and 5S rDNA probes, telomeric repeats (TTAGGG)_n, *Rex1* and *Rex3* retrotransposable elements and microdissection, amplification and fluorescent *in situ* hybridization with probes produced from the Y sex chromosome of *Eigenmannia* sp2.) cytogenetic studies were carried out in six fish species/cytotypes of the genus *Eigenmannia* from different Brazilian hydrographic basins. The analyzed species/cytotypes presented an intense variation in diploid number, ranging from 2n=28 chromosomes in *Eigenmannia* sp1, 2n=31/32 in *Eigenmannia* sp2, 2n=34 in *Eigenmannia* cf. *trilineata*, 2n=36 in *Eigenmannia* sp to 2n=38 in *E. virescens*, besides the occurrence of a sex chromosome system XX-XY in the cytotypes of *E. virescens* from Ribeirão Claro river (named as *E. virescens*-XY) and absence of this sex chromosome system in the cytotypes of Mogi-Guaçu river (named *E. virescens*), as well as the occurrence of a multiple sex chromosome system X₁X₁X₂X₂-X₁X₂Y in *Eigenmannia* sp2 from Araquá river. The 5S rDNA is organized in two distinct classes and was located in different chromosomes between these species/cytotypes; on the other hand, the location in the terminal position of chromosomes was a conserved feature, with exception of chromosome pair 7 in *Eigenmannia* sp1, which had 5S rDNA sites in an interstitial position. Yet, 5S rDNA signals were detected on the XY sex chromosome of *E. virescens*-XY, showing some new characteristics of sex chromosomes in this group. The NORs, identified by silver nitrate staining and 18S rDNA probes, were always located in distinct chromosome compartments of 5S rDNA and besides located in different chromosomes in all analyzed samples, they remained conserved through the karyotypic differentiation process in this group. The analysis of constitutive heterochromatin, through C-banding, revealed that species with reduced diploid number had reduced quantity of this genomic portion and also that the different sex chromosomes systems present in two species/cytotypes had distinct patterns of heterochromatinization. The chromosomes X and Y of *Eigenmannia* sp2 had only centromeric heterochromatin, while the sex chromosomes of *E. virescens*-XY, notably the X, had great terminal heterochromatic blocks. Experiments involving *in situ* hybridization using probes of *Rex1* and *Rex3* revealed that, for all analyzed species, both retroelements presented similar dispersed patterns, organized in small *clusters* and dispersed in all chromosomes of all analyzed species/cytotypes, except in *Eigenmannia* sp2, which presented great blocks of *Rex3* element in centromeric areas, rich in heterochromatin. Also, a probe from the Y sex chromosome of *Eigenmannia* sp2 was produced by microdissection and DOP-PCR. This probe hybridized on both X and Y chromosomes, additionally hybridization signals were

observed in heterochromatic segments of some autosomes. Apart from confirming some hypothesis about karyotypic evolution of the genus *Eigenmannia*, these analyses bring some new information about the distribution of genetic material on chromosomes of the analyzed samples, providing some new material for the understanding of chromosome differentiation in this complex group of Neotropical fish.

Sumário

1 Introdução	1
1.1 Consideração sobre a sistemática e a taxonomia de peixes.....	1
1.2 Consideração sobre a citogenética de peixes	2
1.3 Cromossomos sexuais em peixes Neotropicais.....	3
1.4 Citogenética molecular e microdissecção cromossômica	4
2 Objetivos	9
3 Materiais e métodos	10
3.1 Materiais.....	10
3.2 Métodos.....	12
3.2.1 Obtenção de células mitóticas	12
3.2.2 Obtenção dos cromossomos metafásicos mitóticos	12
3.2.3 Coloração convencional com Giemsa	13
3.2.4 Caracterização das regiões organizadoras de nucléolo (Ag-NORs).....	13
3.2.5 Detecção da heterocromatina constitutiva (bandamento C).....	14
3.2.6 Extração de DNA genômico	14
3.2.7 Preparação das sondas de DNA para hibridação fluorescente <i>in situ</i> (FISH)	15
3.2.7.1 Preparação das sondas de DNAr 18S e 5S	15
3.2.7.2 Preparação da sonda telomérica	16
3.2.7.3 Preparação de sondas para elementos retrotransponíveis Rex 1 e Rex 3	17
3.2.8 Microdissecção cromossômica	17
3.2.8.1 DOP-PCR	18
3.2.8.2 Primeira PCR	18
3.2.8.3 Segunda PCR	19
3.2.8.4 PCR de marcação	20
3.2.9 Hibridação <i>in situ</i> fluorescente (FISH)	20
3.3 Estudos Cariotípicos	21
4 Resultados e Discussão	23
4.1 Macroestrutura cariotípica.....	23
4.2 Regiões Organizadoras de Nucléolo	27
4.3 DNAr 5S.....	29
4.4 Elementos Retrotransponíveis - Rex1 e Rex3.....	33
4.5 Pintura Cromossômica - Sonda Y	37
5 Considerações finais	40

6 Referências 44



Eigenmannia sp2

Introdução

1 Introdução

1.1 Considerações sobre a sistemática e a taxonomia de peixes

Segundo Nelson (2006), existem 54.711 espécies de vertebrados, dentre as quais 27.977 são espécies válidas e já identificadas de peixes. Deste total, 26.761 espécies são Actinopterygii (peixes com nadadeiras raiadas), 1.100 são Chondrichthyes (tubarões, raias e quimeras), 108 são Myxinoidea e Petromyzontoidea (feiticeiras e lampréias) e oito são Sarcoptrygii. As demais 26.734 espécies de vertebrados estão incluídas no grupo dos tetrápodos (Nelson, 2006).

A ictiofauna de água doce Neotropical é a mais rica de todo o planeta (Schaefer, 1998). De acordo com Reis *et al.* (2003), das 13.000 espécies de peixes de água doce estimadas, aproximadamente 6.000 espécies encontram-se na região Neotropical, das quais 4.475 são consideradas válidas e cerca de 1.550 são conhecidas, porém, ainda não descritas formalmente. A fauna de peixes de águas continentais do Brasil é a mais rica do mundo com 2.587 espécies já descritas e existindo ainda muitas desconhecidas (Buckup *et al.*, 2007). Dentro desse universo de espécies de água doce, destacam-se os representantes da superordem Ostariophysii que representam 71% da ictiofauna de água doce neotropical (Fink e Fink, 1981; Reis *et al.*, 2003).

Os peixes pertencentes à ordem dos Gymnotiformes, popularmente conhecidos como “peixes elétricos” ou “peixes espada”, constituem um grupo endêmico das águas doces da região Neotropical (Albert e Crampton, 2003). Esta ordem possui mais de 100 espécies e 27 gêneros que estão agrupados em cinco famílias: Gymnotidae, Rhamphichthyidae, Hypopomidae, Sternopygidae e Aptenorotidae (Mago-Leccia, 1994). Uma característica peculiar dos Gymnotiformes é a emissão contínua de descargas elétricas de baixas voltagens, que está intimamente relacionada aos hábitos noturnos e ambientes de rios. Estas descargas apresentam funções de eletro-localização (navegação, defesa e localização de presas) e eletrocomunicação, podendo esta última função inclusive, constituir uma barreira pré-zigótica de isolamento, dada à ocorrência de padrões espécie-específicos para este caráter (Alves-Gomes, 2001).

Na família Sternopygidae, o gênero *Eigenmannia* apresenta oito espécies, com data de separação estimada em 16 milhões de anos. A diversidade de espécies não pode ainda ser estabelecida devido à necessidade de revisão taxonômica do gênero. As espécies já descritas

provavelmente são, na realidade, grupos de espécies crípticas morfologicamente identificadas (Albert, 2001; Moysés, 2005).

1.2 Considerações sobre a citogenética de peixes

Os estudos citogenéticos tiveram um grande desenvolvimento nos últimos anos, devido basicamente à utilização de novas técnicas para análise cromossômica, o que tem possibilitado à Citogenética contribuir mais efetivamente não só para estudos taxonômicos e filogenéticos, como também para uma maior compreensão da estrutura cromossômica. Em peixes, a crescente aplicação de técnicas de bandamento cromossômico, notadamente as de bandas C e bandas de 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 o entendimento das relações evolutivas existentes entre diferentes táxons (revisão em Almeida-Toledo *et al.*, 2000b). Ultimamente, o desenvolvimento de sondas específicas como as de genes ribossômicos e de histonas, constituídas por DNA de moderada repetitividade, as de DNA altamente repetitivo (DNA satélite) e o advento da microdissecção cromossômica, método que possibilita o isolamento direto de DNA de qualquer região citogeneticamente reconhecida, tem possibilitado a hibridização em cromossomos metafásicos através de 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 (revisão em Phillips e Reed, 1996; Henning, 2007).

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 de peixes de água doce neotropicais. Essa abordagem citogenética aplicada ao gênero *Eigenmannia*, a partir do final da década de setenta, revelou que, a verificada ocorrência de uma única espécie, *Eigenmannia virescens* para os rios de várias bacias brasileiras, na realidade trata-se de um complexo de espécies, com a existência de pelo menos cinco citótipos na bacia superior do rio Paraná, dois citótipos no rio São Francisco, três na região Amazônica, além de um extenso polimorfismo cromossômico na ilha de Marajó (Almeida-Toledo, 2000). Além dos esclarecimentos

citotaxonômicos, os estudos citogenéticos nesse grupo evidenciaram a ocorrência de distintos sistemas de cromossomos sexuais morfologicamente diferenciados na maioria dos citótipos (revisão em Almeida-Toledo e Foresti, 2001). A aplicação de técnicas moleculares em alguns desses citótipos, como a marcação pelos fluorocromos Cromomicina A₃ e Mitramicina, permitiram caracterizar em duas das espécies desse complexo, as regiões heterocromáticas ligadas aos cromossomos sexuais como sendo regiões ricas em pares de bases GC. Do mesmo modo, a aplicação de fluorocromos e endonucleases de restrição, aliada às técnicas de coloração convencional, trouxe esclarecimentos acerca dos mecanismos envolvidos na formação do cromossomo Y em *Eigenmannia* sp2, corroborando com uma hipótese anteriormente postulada que sugeria que nessa espécie a determinação sexual estaria realmente relacionada a regiões cromossômicas GC positivas (Almeida-Toledo *et al.*, 2000a).

Utilizando microdissecção cromossômica, Henning *et al.* (2008), produziu sondas para hibridação *in situ* fluorescente a partir do cromossomo sexual X de *Eigenmannia virescens* (2n=38 cromossomos) e do Y de *Eigenmannia* sp2 (2n=31, 32 cromossomos). A hibridação *in situ* do cromossomo X de *E. virescens* em sua população mais próxima, também com 38 cromossomos, mas sem sistema cromossômico sexual diferenciado, mostrou que o cromossomo X é homólogo a um par de acrocêntricos, condizente com o modelo proposto para diferenciação dos cromossomos sexuais por acúmulo de heterocromatina. Já a hibridação dessa mesma sonda em *Eigenmannia* sp2, que também possui sistema sexual, mostrou apenas marcações em um par de cromossomos acrocêntricos. Por outro lado, a sonda produzida a partir do cromossomo Y de *Eigenmannia* sp2 e hibridada em *Eigenmannia virescens* (2n=38, XY), mostrou marcações em um par de metacêntricos e em um par de acrocêntricos. Em ambos os casos, os cromossomos sexuais não foram marcados pelas sondas, revelando a inexistência de homologia entre os sistemas sexuais dessas espécies.

Estes dados revelam que os sistemas XY em *Eigenmannia* não tiveram a mesma origem, mas que possivelmente deram suporte aos rearranjos cromossômicos propostos para explicar a origem dos cromossomos sexuais nesse gênero (Henning, 2007).

1.3 Cromossomos sexuais em peixes Neotropicais

Diferentes sistemas de cromossomos sexuais já foram descritos dentre os peixes Neotropicais. Embora a maioria das espécies não apresente cromossomos sexuais morfologicamente diferenciados, sistemas de cromossomos sexuais simples e múltiplos já foram evidenciados em diferentes grupos sendo do tipo ZZ/Z0, XX/X0, ZZ/ZW, XX/XY,

$X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$, XX/XY_1Y_2 , ZZ/ZW_1W_2 , $Z_1Z_1Z_2Z_2/Z_1Z_2W_1W_2$ (Devlin e Nagahama, 2002) como muitos deles já identificados em peixes Neotropicais (Galetti Jr. e Foresti, 1986; Moreira-Filho *et al.*, 1993; Almeida-Toledo, 1998; Centofante *et al.*, 2002; Alves *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2006). A heterogametia feminina, principalmente o sistema ZZ/ZW , tem sido o mecanismo mais frequente, correspondendo a mais de 50% das ocorrências de cromossomos sexuais. Neste caso enquadram-se algumas espécies dos gêneros *Leporinus*, *Parodon*, *Thorococarax*, *Potamorhina*, *Semaprochilodus*, *Cheirodon*, *Odontostilbe*, *Hypostomus*, *Microlepdogaster*, *Loricariichthys*, *Opsodoras*, *Eigenmannia*, *Gambusia*, (Centofante *et al.*, 2002), *Apareiodon* (Vicari, *et al.*, 2006; Rosa *et al.*, 2006), além de algumas espécies do gênero *Characidium* (Maistro *et al.*, 1998; Centofante *et al.*, 2001, 2003; Pansonato-Alves *et al.*, 2010; 2011).

A ocorrência de cromossomos sexuais heteromórficos não é regra geral entre os peixes. De fato, apenas cerca de 5-6% das espécies cariotipadas apresentam essa característica, correspondendo ao redor de 55 casos descritos (Moreira-Filho *et al.*, 1993; Almeida-Toledo e Foresti, 2001). Entre os sistemas simples, como no sistema ZZ/ZW , a heterocromatina está associada à diferenciação morfológica desses cromossomos, principalmente do cromossomo W (Galetti Jr. e Foresti, 1986; Feldberg *et al.*, 1987; Bertollo e Cavallaro, 1992; Moreira-Filho *et al.*, 1993; Andreatta *et al.*, 1993; Artoni *et al.*, 2001; Artoni e Bertollo, 2002; Centofante *et al.*, 2002; Vicari *et al.*, 2008, Pansonato-Alves *et al.*, 2010). Entretanto, entre os sistemas múltiplos, os rearranjos estruturais estão associados com a diferenciação desses sistemas, principalmente a translocações e fusões (Moreira-Filho *et al.*, 1993; Bertollo *et al.*, 1997; Bertollo e Mestriner, 1998).

Por sua vez, é também interessante ressaltar que a coexistência de diferentes sistemas de cromossomos sexuais não é um atributo do grupo dos peixes como um todo, mas pode ser também verificada entre espécies de uma mesma família assim como de um mesmo gênero, evidenciando processos de evolução independente desses sistemas (Moreira-Filho *et al.*, 1993; Jesus e Moreira-Filho, 2000; Almeida-Toledo e Foresti, 2001; Centofante *et al.*, 2002).

1.4 Citogenética molecular e microdissecção cromossômica

A crescente aplicação da metodologia de citogenética molecular possibilitou um aumento significativo do conhecimento sobre a estrutura e o comportamento dos cromossomos durante a mitose e a meiose, assim como a descrição de alterações cromossômicas não identificadas através das análises cromossômicas convencionais.

Os estudos genéticos e citogenético-moleculares têm demonstrado que a identificação das sequências de DNA e genes podem ser muito úteis como ferramentas para definir a estrutura e revelar a organização e evolução do genoma das espécies, além da grande possibilidade de sua localização nos cromossomos ser utilizada como marcador citogenético entre diferentes espécies.

Marcadores citogenéticos e genéticos baseados na estrutura da molécula de DNA têm sido desenvolvidos para emprego na aquicultura, com o objetivo de melhorar traços importantes dos estoques de peixes, como o aumento do crescimento e a resistência a doenças. De modo semelhante, 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. Os mapas genéticos são de grande importância também para estudos comportamentais, morfológicos, filogeográficos e evolutivos, entre outros.

Atualmente os mapas genéticos podem ser construídos de três maneiras: (1) pelo mapeamento físico, que localiza segmentos de DNA nos cariótipos das espécies por metodologias citogenéticas; (2) por método do estabelecimento de mapas genéticos de ligação, que se destinam a ordenar os marcadores moleculares nos cromossomos baseando-se na frequência de recombinação entre os locos gênicos; e (3) o último tipo de mapa que se baseia no seqüenciamento completo de nucleotídeos do genoma de uma espécie (Martins *et al.*, 2004). Em ciclídeos, que representam um grupo de peixes bastante estudados 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 descrito na literatura um mapa genético de ligação construído a partir de microssatélites e AFLPs (Anonymous Fragment Length Polymorphisms) (Kocher *et al.*, 1998) e o primeiro mapa físico que reúne todos os tipos de sequências repetitivas já mapeadas nos cromossomos de *Oreochromis niloticus* (Martins *et al.*, 2004).

Os rearranjos cromossômicos envolvendo fusão cêntrica de dois cromossomos subtelocêntricos ou acrocêntricos, com a formação de um único cromossomo metacêntrico, são denominados de fusões Robertsonianas (Robertson, 1916). Este tipo de rearranjo cromossômico caracteriza-se como um dos mais importantes na evolução cariotípica dos vertebrados (Holmquist e Dancis, 1979). Um pré-requisito para a formação das fusões Robertsonianas seria a ocorrência de inativação ou eliminação dos telômeros (Zakian, 1997).

O DNA telomérico, considerado um DNA minissatélite, está presente em praticamente todos eucariotos e localiza-se na porção terminal dos braços dos cromossomos, denominados telômeros, cuja função está relacionada à manutenção da estrutura cromossômica. Esse DNA repetitivo, composto de um número variável de repetições (TTAGGG)_n em cadeia, resolve um problema funcional que é inerente à replicação de moléculas lineares de DNA que constituem os cromossomos (Griffiths *et al.*, 2001).

A microdissecção cromossômica é um método confiável para o isolamento direto de DNA de qualquer região citogeneticamente reconhecida. O material dissecado pode ser usado para várias aplicações, incluindo o estabelecimento 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 muitos fragmentos cromossômicos dissecados de metáfases não coradas ou bandeadas. Posteriormente, Ludecke *et al.* (1989) publicaram 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. Esse 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*). O produto desses PCR é então 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. Em humanos, esta técnica, aliada às metodologias de citogenética clássica, 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 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).

A compactação do genoma dos vertebrados de sangue-frio distingue-se consideravelmente quando comparada a 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). A constatação desta impossibilidade ocasionou um “gap” em relação à nomenclatura, pareamento e descrição de processos estruturais que envolvem determinadas regiões cromossômicas em peixes. Levando-se em consideração que a pintura cromossômica tem sido amplamente utilizada em estudos citogenéticos e evolutivos em outros grupos, ela pode caracterizar-se como uma tecnologia muito promissora a ser empregada na análise de homologies e diferenciação cromossômica em peixes. Recentemente, Henning *et al.* (2010) 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.

Em outro estudo, Diniz *et al.* (2008) utilizaram uma sonda elaborada após microdissecção do cromossomo Z de *Triportheus nematurus*, que foi hibridada sobre os cromossomos de várias outras espécies desse mesmo gênero. Os resultados obtidos foram significativos. Nos machos, observou-se uma hibridação completa do cromossomo Z, ou seja, a sonda sintetizada teve homologia total entre essas espécies. Nas fêmeas, além da hibridação completa do cromossomo Z, o cromossomo W mostrou sinais reduzidos de hibridação distribuídos preferencialmente nos braços curtos e na região intersticial dos braços longos desse cromossomo, variando de acordo com a espécie analisada.

Os testes de hibridação da sonda Z em outros gêneros de Characidae (*Chalceus* sp, *Brycon* sp, *Astyanax scabripinnis*, *Astyanax fasciatus* e *Salminus hilarii*) foram sempre negativos. A ausência de hibridação da sonda Z de *Triportheus* nos cromossomos das espécies dos demais gêneros testados, além de evidenciar claramente a independência na diferenciação dos cromossomos sexuais, reforça também a proposta de que o sistema ZZ/ZW deve representar, de fato, uma condição sinapomórfica característica no gênero *Triportheus*, possivelmente pré-datando à especiação nesse grupo. Diante destes resultados, foi confirmada a hipótese de que o cromossomo Z é conservado em *Triportheus*, e que o cromossomo W das diferentes espécies mostra-se distinto, tanto em relação ao tamanho quanto à distribuição da heterocromatina foi confirmada. Portanto, essa metodologia apresenta-se como uma ferramenta citogenética bastante poderosa, uma vez que além de evidenciar as regiões eucromáticas, mostrou também que o cromossomo W passou por prováveis rearranjos adicionais envolvendo essa porção cromatínica.

Neste sentido, o conhecimento da estrutura molecular dos cromossomos das espécies/citótipos de *Eigenmannia*, bem como o mapeamento físico para visualização da distribuição de sequências gênicas específicas (DNAr, elementos transponíveis, histonas) e a

análise dos cromossomos sexuais por pintura cromossômica podem fornecer informações significativas sobre os mecanismos de diversificação cromossômica e contribuir com estudos filogenéticos e evolutivos neste grupo de peixes.



Eigenmannia sp1

Objetivos

2. Objetivos

Os objetivos do presente trabalho consistiram em desenvolver a análise do cariótipo e aprofundar os estudos citogenéticos-moleculares em espécies/citótipos de *Eigenmannia* que apresentaram $2n=28$; $2n=31,32$; $2n=34$; $2n=36$ e $2n=38$ cromossomos que ocorrem nos componentes hidrográficos das bacias do rio Grande, Tietê, Paranapanema e Amazonas, com a finalidade de:

a) ampliar o conhecimento sobre a estrutura cromossômica neste grupo de peixes, estabelecendo e comparando a constituição cariotípica de espécies que ocorrem principalmente nos componentes da bacia hidrográfica do Alto Rio Paraná;

b) mapear a localização dos genes de DNA repetitivo (DNA ribossômico 5S e 18S) identificando sua posição cromossômica e relação entre espécies (citótipos), com a utilização da técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH);

c) ampliar o mapeamento cromossômico dos representantes deste grupo, com o uso de novos marcadores citogenéticos, como as sequências para elementos retrotransponíveis Rex 1 e Rex 3.

d) analisar a distribuição cromossômica das sequências teloméricas (TTAGGG)_n, por hibridação *in situ* fluorescente (FISH), identificando possíveis rearranjos cromossômicos;

e) realizar a microdissecção diferencial dos braços do cromossomo neo-Y de *Eigenmannia* sp2, a amplificação do seu material genético por DOP-PCR e a marcação com fluorocromos distintos, produzindo sondas específicas para cada braço cromossômico;

f) hibridar as sondas produzidas (item e) em cromossomos mitóticos e meióticos para a correta identificação, bem como análise e comportamento durante a meiose, dos cromossomos envolvidos na formação desse cromossomo sexual.



Eigenmannia virescens - XY

Materiais e Métodos

3 Materiais e Métodos

3.1 Materiais

No presente trabalho foram analisadas sete espécies/citótipos de peixes do gênero *Eigenmannia* (Tabela 1). Após cada coleta foram preparadas suspensões celulares para obtenção e análise dos cromossomos mitóticos e retirados fragmentos do fígado (fixados em etanol 95%) para estudos moleculares. 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.

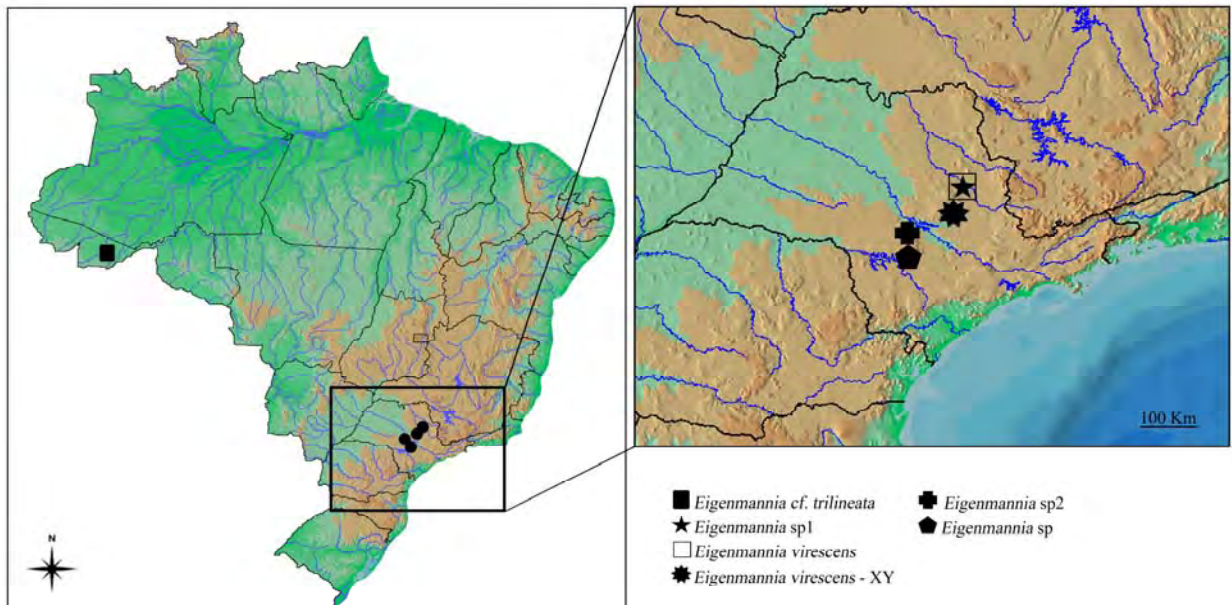


Figura 1. Mapa do Brasil indicando os locais de coleta de espécies/citótipos de *Eigenmannia* analisadas neste estudo.

Tabela 1. Exemplos de *Eigenmannia* analisados neste estudo, localidades de coleta e metodologia utilizada.

Materiais					Métodos						
Espécie/ Citótipo	Exemplares Analisados	Rio	Bacia Hidrográfica	Município	Citogenética Clássica e Molecular						
					Giemsa, RONs e Banda C	DNAr 5S e 18S	Telômeros	Rex 1	Rex 3	Sonda Y	DNAr 5S (Clones)
<i>Eigenmannia</i> sp1	05♀ 06♂	Mogi- Guaçu	Mogi-Guaçu	Araras-SP	X	X	X	X	X		
<i>Eigenmannia</i> sp2	10♀ 08♂	Araquá	Tietê	Botucatu-SP	X	X	X	X	X	X	X
<i>E. cf. trilineata</i>	08♀ 06♂	Acre	Amazonas	Rio Branco- AC	X	X	X		X		
<i>Eigenmannia</i> sp	01♀ 01♂	Hortelã	Paranapanema	Botucatu-SP	X	X	X		X		
<i>E. virescens</i>	11♀ 09♂	Mogi- Guaçu	Mogi-Guaçu	Araras-SP	X	X	X	X	X		X
<i>E. virescens</i> - XY	01♀ 01♂	Ribeirão Claro	Tietê	Rio Claro-SP	X	X	X	X	X		

3.2 Métodos

A análise citogenética convencional envolveu os métodos de estimulação de mitose (Cole e Levans, 1971), preparação direta 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).

A análise citogenética molecular envolveu os métodos para localização cromossômica do DNAr 5S e 18S, com sondas Rex 1 e Rex 3, das sequências teloméricas (TTAGGG)_n com a técnica de hibridação fluorescente *in situ* (FISH) e também microdissecção, amplificação e hibridação *in situ* fluorescente com sondas produzidas a partir do cromossomo sexual Y de *Eigemannia* sp2.

3.2.1 Obtenção de células mitóticas

Com o objetivo de se obter um maior índice mitótico nas preparações foi utilizada a técnica de injeção prévia nos animais de uma solução de fermento biológico, descrita por Cole e Levan (1971) para anfíbios e répteis e adaptada por Oliveira *et al.* (1988) para peixes, que consistiu em:

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

3.2.2 Obtenção dos cromossomos metafásicos mitóticos

A técnica utilizada para obtenção dos cromossomos metafásicos seguiu a descrição de Foresti *et al.* (1981), com algumas adaptações. Essa metodologia envolveu a inibição da polimerização dos microtúbulos pela colchicina, a hipotonização das células em suspensão *in vitro* e a fixação celular pela mistura de metanol/ácido acético. O procedimento consistiu em:

1. anestesiá-lo animal em solução de benzocaína a 0,01%;

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

As lâminas podem ser guardadas no congelador durante muito tempo e serem utilizadas posteriormente para aplicação de diferentes técnicas de bandamento cromossômico.

3.2.3 Coloração convencional com Giemsa

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

1. solução de Giemsa a 5 % em tampão fosfato (pH=6,7) por 10 minutos.

3.2.4 Caracterização das regiões organizadoras de nucléolo (Ag-NORs)

Esta técnica é caracterizada pela reação química da Prata metálica com as proteínas acídicas que compõem o complexo de proteínas nas Regiões Organizadoras de Nucléolo. O procedimento utilizado seguiu a técnica descrita originalmente por Howell e Black (1980), utilizando 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, são 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 10 segundos.
5. deixar secar ao ar.

3.2.5 Detecção da heterocromatina constitutiva (bandamento C)

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

1. hidrolisar as lâminas por 25 minutos em HCl 0,2N à temperatura ambiente e lavar em água destilada;
2. passar por uma solução saturada de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ por cerca de 15 segundos e lavar em água destilada;
3. lavar rapidamente em HCl 1N a 60°C, lavando, em seguida, em água destilada;
4. incubar por 25 minutos em 2XSSC (pH = 6,8), a 60°C;
5. corar por aproximadamente 10 minutos com Giemsa a 5% em tampão fosfato (pH = 6,7).

3.2.6 Extração de DNA genômico

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.

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

3.2.7.1 Preparação das sondas de DNAr 18S e 5S

A sonda de DNAr 18S foi obtida por PCR (Polymerase Chain Reaction) a partir do DNA total de *Eigenmannia* sp2, 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
		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 *Characidium* cf. *zebra*, 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%.

3.2.7.2 Preparação da sonda telomérica

A sonda utilizada para detecção de sequências teloméricas foi amplificada e marcada por PCR, usando digoxigenina 11-dUTP (Roche Applied Science). Na ausência de DNA molde, foram usados primers (TTAGGG)₅ e (CCCTAA)₅ e os parâmetros para marcação foram: 33,9 µl de água Mili-Q, 5 µl de tampão da enzima Taq polimerase (10X), 2 µl de MgCl₂ (25mM), 1 µl de dATP, dCTP e dGTP e 0,7 µl de dTTP (2mM cada), 1 µl Digoxigenina-11-dUTP, 1,5 µl de cada primer (10mM), 0,4 µl de Taq polimerase (5U/µL) e 1 µl de DNA molde. Total da reação: 50 µl.

O programa de PCR utilizado apresentou as seguintes condições:

	95°C ---- 10 min	
35 ciclos	{ 94°C ---- 45 seg	
		50°C ---- 1 min
		68°C ---- 1 min
		68 °C ---- 7 min
	12 °C ---- manutenção	

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

3.2.7.3 Preparação de sondas para elementos retrotransponíveis Rex 1 e Rex 3

As sondas utilizadas para detecção de sequências transponíveis foram amplificadas e marcadas por PCR, usando digoxigenina 11-dUTP (Roche Applied Science) a partir do DNA total de *Eigenmannia* sp2 e *E. virescens*, usando os primers para o elemento retrotransponível Rex 1 - RTX1-F1 (5'-TTCTCCAGTGGCCTTCAACACC-3') e RTX1-R1 (5'-TTCCTTAAAAATAGAGTCTGCTC-3') e para o Rex 3 RTX3-F1 (5'-TACGGAGAAAACCCATTTTCG 3') e RTX3 -R1 (5'- AAAGTTCCTCGGTGGCAGG - 3'). Os parâmetros para marcação foram: 17,5 µl de água Mili-Q, 2,5 µl de tampão da enzima Taq polimerase (10X), 1 µl de MgCl₂ (25mM), 0,5 µl de dATP, dCTP e dGTP e 0,5 µl de dTTP (2mM cada), 0,5 µl de Digoxigenina-11-dUTP, 0,5 µl de cada primer (10mM), 0,3 µl de Taq polimerase (5U/µL) e 1 µl de DNA molde. Total da reação: 25 µl.

O programa de PCR utilizado apresentou as seguintes condições:

	95°C ---- 5 min	
35 ciclos	$\left\{ \begin{array}{l} 95^{\circ}\text{C} \text{ ---- } 40 \text{ seg} \\ 55^{\circ}\text{C} \text{ ---- } 40 \text{ seg} \\ 72^{\circ}\text{C} \text{ ---- } 2 \text{ min} \\ 72^{\circ}\text{C} \text{ ---- } 5 \text{ min} \end{array} \right.$	
	12°C ---- manutenção	

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

3.2.8 Microdissecção cromossômica

Os procedimentos para a microdissecção cromossômica, segundo o procedimento estabelecido por Mühlmann *et al.* 1995, consistiram em:

1. Diluir uma alíquota da suspensão celular final no fixador (metanol: ácido acético na proporção 3:1), respectivamente.
2. Pingar a suspensão em lamínulas. Secar o material ao ar e corá-lo com solução Giemsa diluída a 5% em tampão fosfato (KH₂PO₄ 0,06M e Na₂HPO₄ 0,449M, pH 6.8) durante 8-10 minutos.
3. Lavar as lamínulas com água destilada e deixá-las secar ao ar.

4. Colocar a lamínula contendo a preparação celular num microscópio invertido (Axiovert 100 – Zeizz) e proceder a microdissecção dos cromossomos com o auxílio de uma agulha de vidro ligada a um micromanipulador mecânico (Eppendorf). Foram microdissecados 15 cromossomos Y de *Eigenmannia* sp2.

5. Colocar os cromossomos microdissecados num tubo de PCR.

3.2.8.1 DOP-PCR

Este procedimento de PCR consistiu numa amplificação inespecífica dos cromossomos microdissectados com o uso de um primer degenerado (DOP-Degenerate Oligonucleotide Primer), conforme proposto por Telenius *et al.*, (1992). A DOP-PCR compreendeu duas etapas de amplificação, sendo uma de baixa estringência (primeira PCR) e outra de alta estringência (segunda PCR e PCR de marcação).

3.2.8.2 Primeira PCR

Na primeira amplificação, condições de baixas temperaturas permitiram o anelamento do primer degenerado e a extensão de vários sítios no genoma.

Num tubo de 0,2 ml, foi preparado um mix contendo os seguintes reagentes:

Água milli-Q autoclavada	6,0 µl
Tampão Termosequenase (10X)	1,0 µl
dNTP (2 mM cada)	1,0 µl
Primer DOP (10 µl)	1,0 µl

Após a adição dos cromossomos microdissectados ao tubo de 0,2 ml, contendo 9,0 µl mix de DOP-PCR, estes foram aquecidos 95°C por 10 min e centrifugados brevemente. Em seguida, acrescentou-se 1,0 µl da enzima Termosequenase 4U/µl (Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit, USB). As amplificações foram realizadas num termociclador PTC-200TM Peltier Thermal Cycler (MJ Research, Inc.) de acordo com as seguintes condições:

	94°C --3min	
12 ciclos	{	94°C --1min e 30seg
		37°C --2min
		37°C --1min, subindo 0,2°C/seg até 72°C
		72°C --2min
30 ciclos	{	94°C --1min e 30 seg
		62°C --1min
		72°C --2min
		Manutenção a 4°C

Os produtos da reação de amplificação foram checados em gel de agarose a 1%;

3.2.8.3 Segunda PCR

A segunda amplificação foi preparada para um volume final de 50 µl num tubo de 0,2 ml, com os seguintes reagentes:

Água milli-Q autoclavada	30,0 µl
Tampão da enzima (10X)	5,0 µl
MgCl ₂ (50 mM)	1,5 µl
dNTP (2 mM cada)	5,0 µl
Primer DOP (10 µl)	5,0 µl
Taq (5U/µl)	0,5 µl
DNA (produto da primeira PCR)	3,0 µl

Posteriormente, a amplificação foi realizada de acordo com as seguintes condições:

	90°C --3min	
30 ciclos	{	90°C --1min e 30 seg
		56°C --1min e 30seg
		72°C --1min e 30seg
		Manutenção a 4°C

Os produtos da reação de amplificação foram checados em gel de agarose a 1%.

3.2.8.4 PCR de marcação

Na PCR de marcação foram utilizados os reagentes descritos abaixo para um volume final de 50 µl. As condições de amplificação foram as mesmas descritas para a segunda PCR.

Água milli-Q autoclavada	30,7 µl
Tampão da enzima (10X)	5,0 µl
MgCl ₂ (50 mM)	1,5 µl
dATP (2 mM)	1,0 µl
dCTP (2 mM)	1,0 µl
dGTP (2 mM)	1,0 µl
dTTP (2mM)	1,0 µl
Digoxigenina 11 dUTP (1 mM)	0,7 µl
Primer DOP (10 µl)	5,0 µl
Taq (5U/µl)	0,5 µl
DNA (produto da segunda PCR)	3,0 µl

Os produtos da reação de amplificação foram checados em gel de agarose a 1%.

3.2.9 Hibridação *in situ* fluorescente (FISH)

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

O procedimento adotado foi o seguinte: preparar as lâminas (pingar a suspensão celular em lâminas e deixar secar ao ar; colocar 100 µl de RNase 40 µg/ml sobre a lamínula; aderir a lâmina sobre essa lamínula e deixar em câmara úmida a 37° C por 1 hora e 30 minutos; a lâmina foi lavada duas vezes em 2xSSC durante 10 minutos cada para desidratá-las em série alcoólica 70%, 85% e 100% gelada durante 10 minutos cada; a lâmina foi

mergulhada em formamida 70% em 2xSSC por 3 minutos a 70° C; novamente foi desidratada em série alcoólica 70%, 85% e 100% a -20° C por 5 minutos cada; e secou ao ar).

Em seguida, foi preparada a solução de hibridação adicionando ao tubo contendo a sonda 30 µl de formamida (concentração final 50%); 12 µl de sulfato de dextrano 50% (concentração final 10%); 6 µl de 20xSSC (concentração final de 2XSSC); colocar no termociclador a 95° C por 10 minutos e passar imediatamente ao gelo). Proceder, então, à hibridação, colocando 60 µl de solução de hibridação sobre a lamínula; inverter a lâmina sobre a lamínula; e manteve as lâminas com o material voltado para baixo em câmara úmida (2xSSC) a 37° C *overnight*). Realizar, em seguida, as lavagens (lavar em 2xSSC em temperatura ambiente; lavar em formamida 50% por 15 minutos a 37° C; lavar em 2xSSC por 15 minutos a 37° C por uma vez; lavar em 2xSSC por 15 minutos à temperatura ambiente; e lavar em 4xSSC à temperatura ambiente).

A detecção da sonda foi feita, colocando-se sobre uma lamínula 0,1 µl de avidina-FITC 0,07% em 70 µl de tampão C (0,1M de bicarbonato de sódio, pH 8,5 e 0,15M de NaCl); a lâmina é invertida sobre essa lamínula e deixada por 1 hora em câmara úmida com 2xSSC a 37° C; em seguida a preparação é lavada em tampão de bloqueio (NaHCO₃ 1.26% / citrato de sódio 0,018% / Triton 0,0386% em água destilada pH 8,0 e leite em pó desnatado 1%) recém-preparado a 42° C; a preparação é lavada por 3 vezes por 5 minutos cada com agitação; a lâmina é escorrida e seca por baixo. Colocar sobre a lamínula 80µL de anti-avidina biotina-conjugada 2,5% (2 µl de anti-avidina estoque em 78 µl de tampão de bloqueio) e inverter a lâmina sobre a lamínula; deixar em câmara úmida com 2xSSC a 37° C por 30 minutos; lavar em tampão de bloqueio três vezes por 5 minutos cada com agitação; aplicar novamente o FITC e fazer as lavagens com o tampão de bloqueio, como descrito anteriormente; lavar em 4xSSC/Triton 0,2% duas vezes por 3 minutos cada com agitação; escorrer as lâminas e deixar secando ao ar; após isso as lâminas foram montadas com DAPI contendo *antifade* e observadas em microscópio de fluorescência (Olympus BX-61).

3.3 Estudos Cariotípicos

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.



Eigenmannia sp.

Resultados e Discussão

4 Resultados e Discussão

O gênero *Eigenmannia* caracteriza-se como um grupo de peixes que apresenta padrões morfológicos complexos, o que o torna um grupo de difícil identificação taxonômica (Campos-da-Paz, 1997). Os estudos citogenéticos realizados em representantes deste grupo revelam a existência de grande variabilidade cromossômica entre espécies e populações, com a ocorrência, inclusive, de espécies/citótipos com diferentes sistemas cromossômicos de determinação sexual (Henning *et al.*, 2010). Essa diversidade cariotípica pode ser atribuída ao isolamento reprodutivo dos representantes deste gênero, que poderiam se constituir em agrupamentos com baixa vagilidade e, portanto, com poucas possibilidades de compartilhamento de modificações estruturais particulares dos cromossomos (Moysés *et al.*, 2010).

No presente trabalho, os resultados obtidos são agrupados e discutidos em tópicos específicos, buscando-se encontrar e comparar um padrão de evolução cromossômica entre os diferentes marcadores utilizados.

4.1 Macroestrutura cariotípica

A análise citogenética das seis espécies/citótipos de *Eigenmannia* evidenciou a ocorrência de número diploide variável, de $2n=28$ cromossomos em *Eigenmannia* sp1 (Figura 2a), $2n=31/32$ em *Eigenmannia* sp2 (Figuras 3a e 4a), $2n=34$ em *Eigenmannia* cf. *trilineata* (Figura 5a), $2n=36$ em *Eigenmannia* sp (Figura 6a) e $2n=38$ em *Eigenmannia virescens*, além da ocorrência de sistema sexual XX-XY no citótipo de *E. virescens* do rio Ribeirão Claro (chamado de *E. virescens*-XY) (Figuras 7a e 8a) e ausência desse sistema no citótipo do rio Mogi-Guaçu (chamado apenas de *E. virescens*) (Figura 9a), bem como a ocorrência de sistema múltiplo do tipo $X_1X_1X_2X_2-X_1X_2Y$ em *Eigenmannia* sp2 do rio Araquá (Figuras 3a e 4a). Esta grande variabilidade cromossômica observada corrobora dados obtidos em estudos anteriormente realizados neste gênero (Almeida-Toledo *et al.*, 1985; Almeida-Toledo *et al.*, 1996) e aponta para a importância da citogenética como ferramenta taxonômica, pois este grupo é reconhecidamente confuso do ponto de vista taxonômico, principalmente pela falta de padrões e variações morfológicas.

O cariótipo de *Eigenmannia* sp1 é constituído por 14 cromossomos m/sm e 14 cromossomos st/a (Figura 2a). O cariótipo dos exemplares machos de *Eigenmannia* sp2 é

constituído por nove cromossomos m/sm e 22 cromossomos st/a (Figura 3a), enquanto os exemplares fêmeas possuem cariótipo com 8 cromossomos m/sm e 24 st/a (Figura 4a). *Eigenmannia* cf. *trilineata* apresentou cariótipo com 18 cromossomos m/sm e 16 cromossomos st/a (Figura 5a). *Eigenmannia* sp apresentou cariótipo com oito cromossomos m/sm e 28 cromossomos st/a (Figura 6a). Os dois citótipos de *Eigenmannia virescens* apresentaram cariótipo com 16 cromossomos m/sm e 22 cromossomos st/a (Figuras 7a, 8a e 9a). No entanto, entre estes dois citótipos foi observado um polimorfismo estrutural de tamanho no par cromossômico 9 dos exemplares machos coletados no rio Ribeirão Claro, relacionado ao sistema sexual XY existente (Figuras 8a e 9a). A aplicação da técnica FISH com sonda telomérica (TTAGGG)_n evidenciou sinais de hibridação em posição final de todos os cromossomos de todas as espécies/citótipos analisados, além de sítios intersticiais teloméricos no par metacêntrico número 2 de *Eigenmannia* sp1 (Figura 2e).

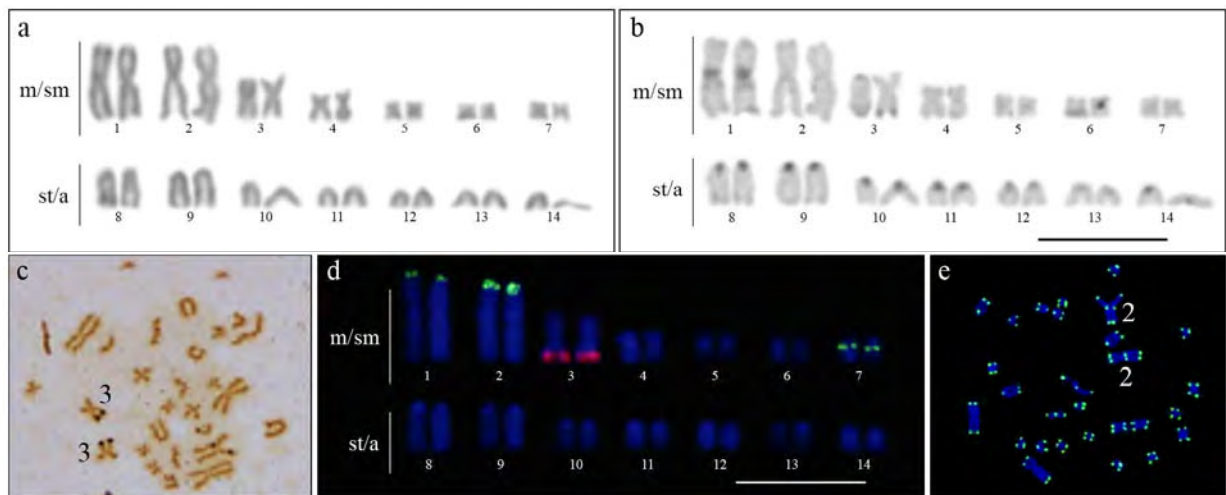


Figura 2. Cariótipos de *Eigenmannia* sp1 (exemplares machos e fêmeas) corados com Giemsa (a), após bandamento C (b) e após hibridação *in situ* com sonda para DNAr 18S (vermelho) e 5S (verde) (d). Em (c), metáfase evidenciado as RONS ativas em posição final do par 3 e em (e) hibridação *in situ* com sonda telomérica evidenciado sítios teloméricos intersticiais (ITS) no par 2.

As variações quanto a morfologia cromossômica entre os representantes de *Eigenmannia* analisados são significativas e apontam para um padrão de diferenciação que possivelmente culminou com a diminuição acentuada do número diploide em *Eigenmannia* sp1 e *Eigenmannia* sp2. Ainda, a formação do par metacêntrico número 2 de *Eigenmannia* sp1 deve ter ocorrido em um evento de fusão recente, tendo em vista os ITS ainda visíveis (Figura 2e). A estrutura cariotípica das amostras analisadas que pertencem a bacia do rio Paraná possui um padrão bem estabelecido de organização cariotípica, principalmente em

relação ao número de cromossomos metacêntricos/submetacêntricos, quando comparados aos cromossomos subtelocêntricos/acrocêntricos, pois espécies/citótipos com menor número diploide possuem mais cromossomos com dois braços e as espécies/citótipos com maior número diploide possuem mais cromossomos acrocêntricos. No entanto, os representantes de *E. cf. trilineata* da bacia Amazônica, que possuem $2n=34$ cromossomos, apresentam mais cromossomos metacêntricos do que *Eigenmannia* sp1 ($2n=28$) e *Eigenmannia* sp2 ($2n=31/32$) e menos cromossomos acrocêntricos do que *Eigenmannia* sp ($2n=36$) e os citótipos de *E. virescens* ($2n=38$) (Figura 12).

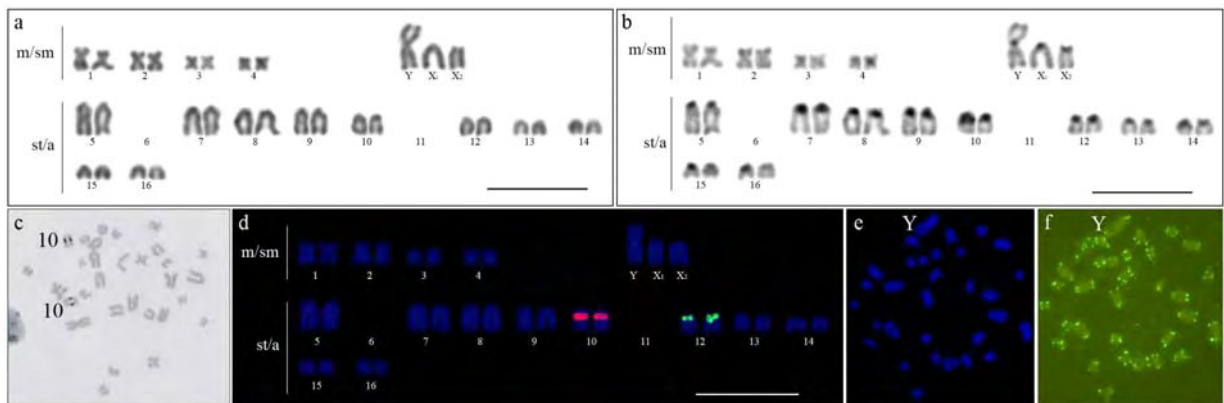


Figura 3. Cariótipos de exemplar macho de *Eigenmannia* sp2 corados com Giemsa (a), após bandamento C (b) e após hibridação *in situ* com sonda para DNAr 18S (vermelho) e 5S (verde) (d). Em (c), metáfase evidenciado as RONS ativas em posição intestinal do par 10. Em (e), metáfase corada com DAPI e após hibridação *in situ* com sonda telomérica (f). Não são observados sítios teloméricos intersticiais no cromossomo sexual Y.

A análise cuidadosa do cariótipo de *E. cf. trilineata* (presente estudo) e de *E. virescens* da bacia Amazônica (Silva *et al.*, 2009) em comparação aos cariótipos dos demais representantes de *Eigenmannia* da bacia do rio Paraná, permite apontar que os representantes de *Eigenmannia* destas bacias seguiram caminhos evolutivos independentes. De qualquer forma, a diferenciação cariotípica destas amostras de *Eigenmannia* está diretamente relacionada a estruturação das populações dos representantes deste gênero que, ao formarem pequenas populações isoladas e com pouca movimentação, facilitarão a fixação de alterações cromossômicas (Silva *et al.*, 2009).

A heterocromatina constitutiva, evidenciada pelo bandamento C, foi localizada preferencialmente em regiões centroméricas dos cromossomos dos representantes de *Eigenmannia* sp1, *Eigenmannia* sp2 e *E. cf. trilineata* (Figuras 2b, 3b, 4b e 5b). Em *Eigenmannia* sp e nos dois citótipos de *E. virescens*, além de regiões heterocromáticas em

posição centromérica, também foram visualizados blocos heterocromáticos em posição terminal de alguns cromossomos (Figuras 6b, 7b, 8b e 9b).

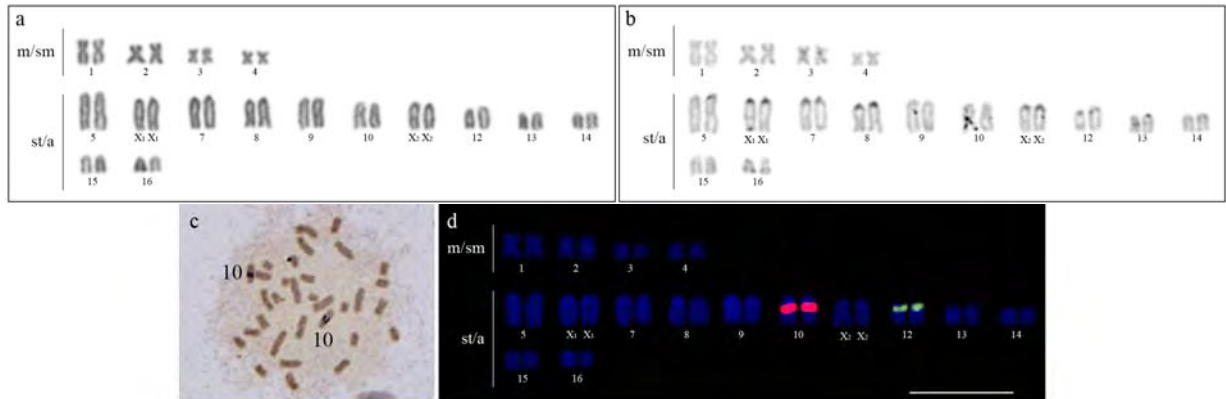


Figura 4. Cariótipos de exemplar fêmea de *Eigenmannia* sp2 corados com Giemsa (a), após bandamento C (b) e após hibridação *in situ* com sonda para DNAr 18S (vermelho) e 5S (verde) (d). Em (c), metáfase evidenciado as RONS ativas em posição intersticial do par 10.

A distribuição da heterocromatina constitutiva entre os representantes de *Eigenmannia* analisados é similar aos padrões observados para a maioria dos peixes Neotropias (Galetti Jr. e Martins, 2004), sendo que os cariótipos possuem pequena quantidade dessa porção cromatínica, com aumento gradativo de heterocromatina no cariótipo em relação ao número diploide. As divergências quanto à distribuição da heterocromatina são observadas apenas no citótipo de *E. virescens*-XY, relacionado ao par sexual, possivelmente devido a amplificação de seqüências repetitivas nestes cromossomos (Almeida-Toledo *et al.*, 2002).

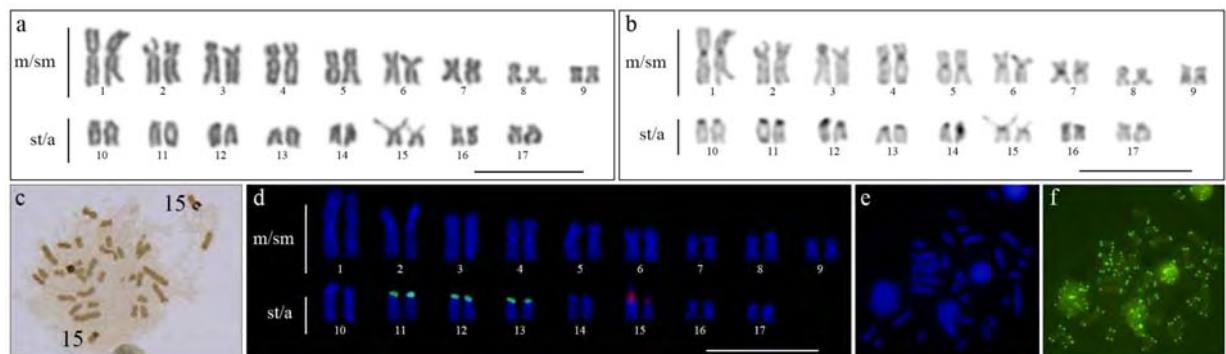


Figura 5. Cariótipos de *E. cf. trilineata* corados com Giemsa (a), após bandamento C (b) e após hibridação *in situ* com sonda para DNAr 18S (vermelho) e 5S (verde) (d). Em (c), metáfase evidenciado as RONS ativas em posição final do par 15. Em (e), metáfase corada com DAPI e após hibridação *in situ* com sonda telomérica (f). Não são observados sítios teloméricos intersticiais.

4.2 Regiões Organizadoras de Nucléolo

A localização das regiões organizadoras de nucléolo ativas, pela impregnação dos cromossomos com nitrato de Prata, revelou que este marcador é conservado, pois todas as espécies/citótipos de *Eigenmannia* analisadas possuem RONS simples. Em *Eigenmannia* sp1 as RONS foram visualizadas em posição terminal dos braços longos do par metacêntrico número 3 (Figura 2c), em *Eigenmannia* sp2 em posição intersticial do par acrocêntrico número 10 (Figura 3c e 4c), em *Eigenmannia* sp as RONS foram localizadas em posição terminal do par subtelo/acrocêntrico número 12 (Figura 6c) e em *E. cf. trilineata* e nos dois citótipos de *E. virescens* as RONS foram localizadas em posição terminal do par subtelo/acrocêntrico número 15 (Figuras 5c, 6c, 7c, 8c e 9c).

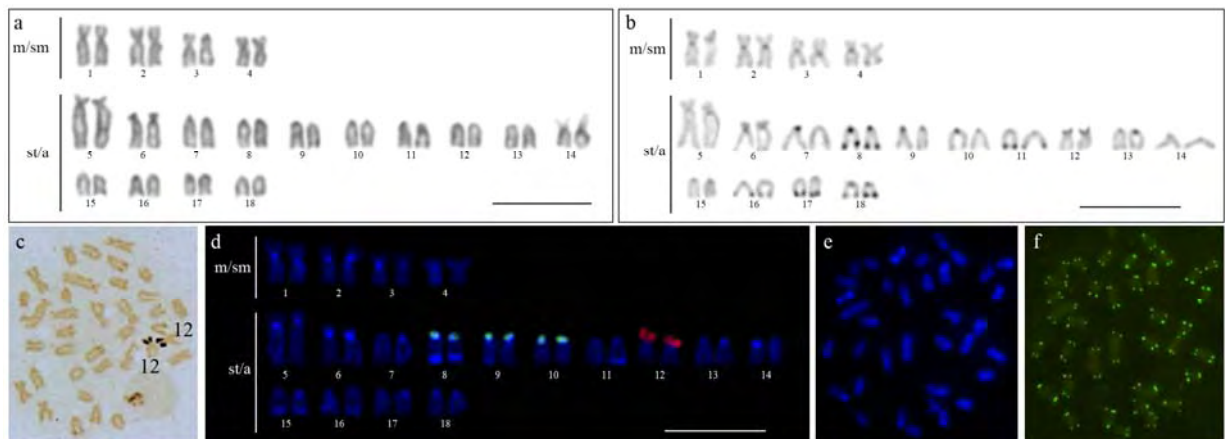


Figura 6. Cariótipos de *Eigenmannia* sp corados com Giemsa (a), após bandamento C (b) e após hibridação *in situ* com sonda para DNAr 18S (vermelho) e 5S (verde) (d). Em (c), metáfase evidenciado as RONS ativas em posição terminal do par 12. Em (e), metáfase corada com DAPI e após hibridação *in situ* com sonda telomérica (f). Não são observados sítios teloméricos intersticiais.

A aplicação da técnica FISH usando sonda para o DNAr 18S confirmou os resultados obtidos com a impregnação pelo nitrato de Prata (Figuras 2d, 3d, 4d, 5d, 6d, 7d e 8d – vermelho e Figura 12). Os resultados combinados destas duas metodologias revelam o caráter conservado destas sequências ribossômicas neste grupo de peixes, pois em todas as amostras, somente um cromossomo é portador de DNAr. No entanto, polimorfismos de tamanho destas regiões foram observados em todas as amostras analisadas e podem ser resultado de diferenças no número de cópias dos genes ribossomais.

Em *Eigenmannia* sp, nos citótipos de *E. virescens* e até em *E. cf. trilineata* da bacia Amazônica, as RONS foram localizadas em um pequeno cromossomo subteloentríco/acrocêntrico. As diferenças de classificação e posição deste cromossomo no cariótipo são mínimas e possivelmente as RONS estão localizadas em um mesmo cromossomo em todas estas amostras. Por outro lado, as amostras analisadas com menor número cromossômico possuem especificidades quanto a localização dessas regiões. Em *Eigenmannia* sp1 o DNAr está localizado em posição final do par metacêntrico 3 (Figura 2c, d), indicando que o par portador de sequências ribossomais está envolvido com os rearranjos que modificaram a composição cariotípica destas amostras. *Eigenmannia* sp2, por sua vez, é a única espécie analisada que possui RONS localizadas em posição cromossômica intersticial (Figura 3c,d e 4c,d), indicando também que o par 10 desta espécie possa ter sua origem relacionada a eventos de fusão envolvendo cromossomos ancestrais portadores de sequências ribossomais. De qualquer maneira, estes resultados apontam que as RONS são marcadores conservados em Gymnotiformes, tendo em vista os mesmos padrões observados no gênero *Gymnotus* (Scacchetti., 2011).

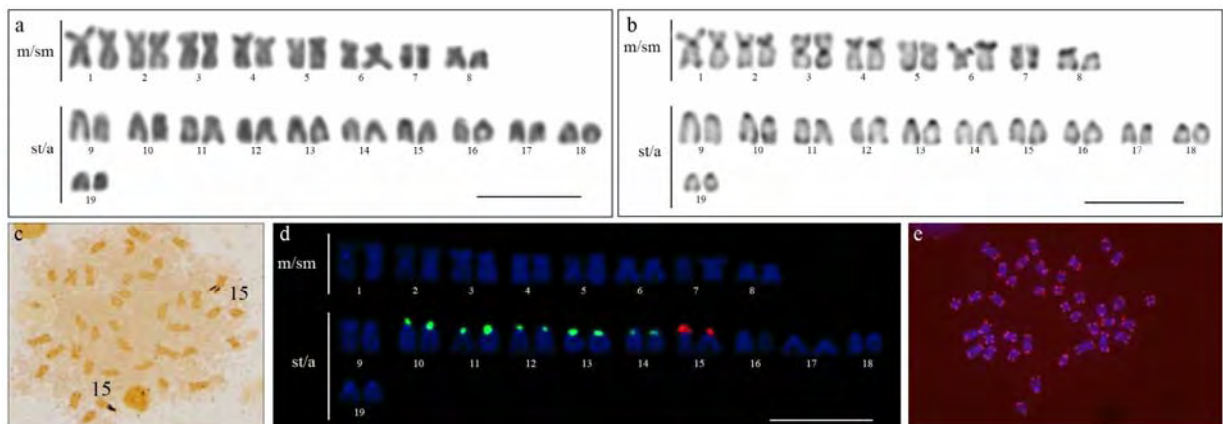


Figura 7. Cariótipos de *E. virescens* corados com Giemsa (a), após bandamento C (b) e após hibridação *in situ* com sonda para DNAr 18S (vermelho) e 5S (verde) (d). Em (c), metáfase evidenciado as RONS ativas em posição terminal do par 15. Em (e), metáfase após hibridação *in situ* com sonda telomérica. Não são observados sítios teloméricos intersticiais.

4.3 DNAr 5S

O DNAr 5S junto ao seu NTS tem sido investigado em várias espécies de peixes teleósteos e tem se caracterizado como um bom marcador cromossômico, de valor considerável para a compreensão da dinâmica evolutiva dessa família multigênica (Martins e Wasko, 2004). A variabilidade em relação à posição no cariótipo entre distintas populações (Vicari *et al.*, 2008), a ligação com outros genes (Drouin e Moniz de Sá, 1995) e a possível associação com elementos transponíveis (Cioffi *et al.*, 2010) tornam esse gene um objeto de estudos evolutivos interessante.

Diversas análises moleculares evidenciaram a existência de variantes de DNAr 5S entre espécies de plantas (Nedi *et al.*, 2002), fungos (Amici e Rollo, 1991) e animais (Alves-Costa *et al.*, 2006; Pinhal *et al.*, 2011). Martins e Galetti Jr. (2001) sugerem que a organização do DNAr 5S em duas classes distintas seria uma regra geral em peixes teleósteos, sendo que, as diferenças entre as variantes seriam decorrentes de diferenças nos NTS, enquanto a região transcrita do gene seria conservada.

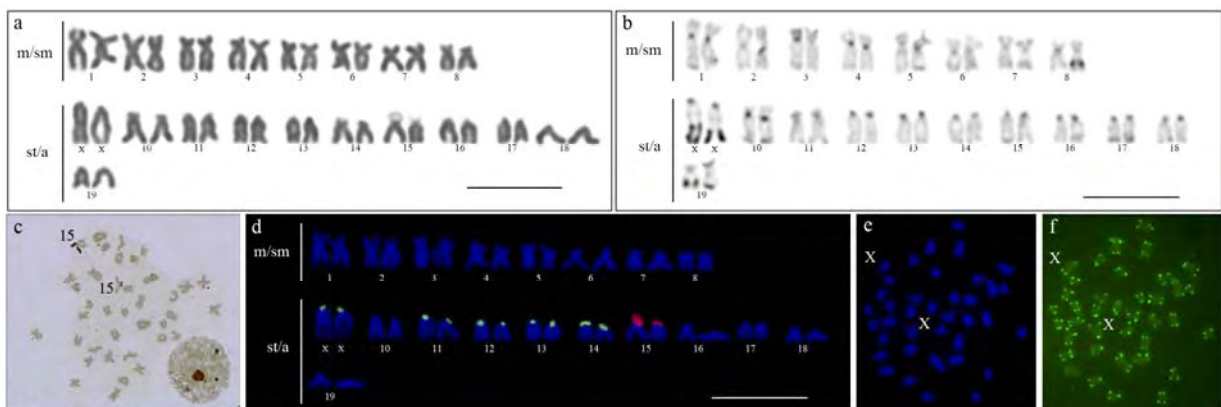


Figura 8. Cariótipos de exemplar fêmea de *E. virescens-XY* corados com Giemsa (a), após bandamento C (b) e após hibridação *in situ* com sonda para DNAr 18S (vermelho) e 5S (verde) (d). Em (c), metáfase evidenciado as RONS ativas em posição terminal do par 15. Em (e), metáfase corada com DAPI e após hibridação *in situ* com sonda telomérica (f). Não são observados sítios teloméricos intersticiais.

A análise dos produtos de amplificação (PCR) do DNAr 5S nas espécies/citótipos de *Eigenmannia* em gel de agarose revelou a presença de dois fragmentos genômicos, sendo um menor composto por cerca de 450 pares de bases e outro maior com aproximadamente 650 pares de bases, evidenciando a ocorrência de classes distintas de DNAr 5S. Neste sentido,

inicialmente, a sonda utilizada para a localização do DNAr 5S nos cromossomos de *Eigenmannia* foi obtida a partir do DNA genômico de *Characidium cf. zebra*. No entanto, os fragmentos amplificados de DNAr 5S a partir do DNA genômico de *Eigenmannia* mostraram-se semelhantes aos fragmentos de DNAr 5S amplificados a partir do DNA genômico de *Gymnotus* (Scacchetti, 2011). Considerando a existência de sondas específicas para cada fragmento amplificado de DNAr 5S de *Gymnotus* no banco de sondas do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes da UNESP de Botucatu, estas sondas também foram testadas nos cromossomos de *Eigenmannia*.

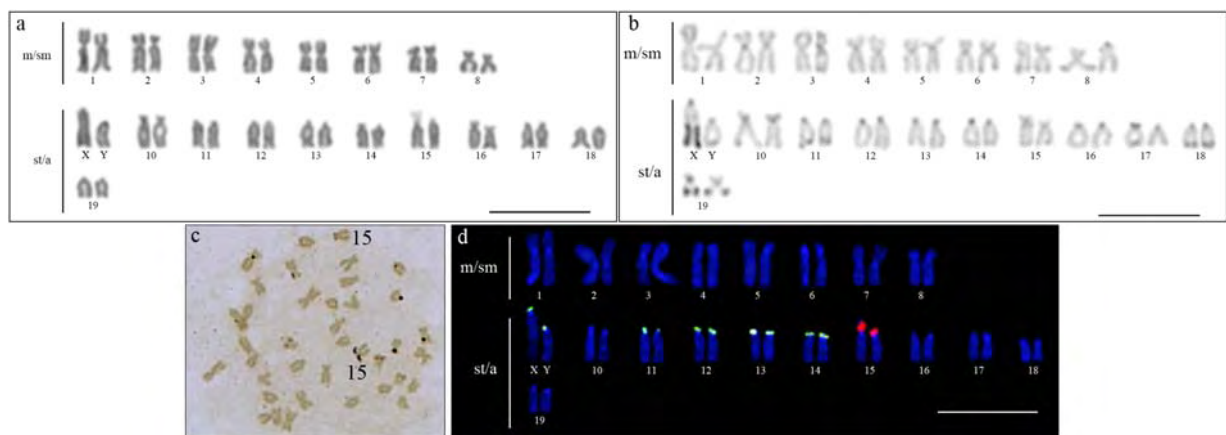


Figura 9. Cariótipos de exemplar macho *E. virescens*-XY corados com Giemsa (a), após bandamento C (b) e após hibridação *in situ* com sonda para DNAr 18S (vermelho) e 5S (verde) (d). Em (c), metáfase evidenciado as RONS ativas em posição terminal do par 15.

A análise inicial com sonda obtida a partir do DNA de *Characidium* revelou que *Eigenmannia* sp1 possui DNAr 5S em posição terminal dos braços curtos dos pares metacêntricos 1 e 2 e em posição intersticial do par metacêntrico 7 (Figura 2d, verde). *Eigenmannia* sp2 possui DNAr 5S em apenas um par cromossômico, em posição centromérica do par acrocêntrico 12 (Figura 3d e 4d, verde). *Eigenmannia cf. trilineata* possui DNAr 5S em posição centromérica dos pares acrocêntricos 11, 12 e 13 (Figura 5d, verde). *Eigenmannia* sp. possui DNAr 5S em posição centromérica dos pares acrocêntricos 8, 9 e 10 (Figura 6d, verde). *Eigenmannia virescens* possui DNAr 5S em posição centromérica dos pares acrocêntricos 10, 11, 12, 13 e 14 (Figura 9d, verde). *Eigenmannia virescens*-XY possui DNAr 5S em posição centromérica do par sexual XY e em posição centromérica dos pares acrocêntricos 11, 12, 13 e 14 (Figuras 7d e 8d, verde).

A realização de hibridação fluorescente *in situ* utilizando as sondas específicas das classes I e II do DNAr 5S de *Gymnotus* em amostras de *Eigenmannia* confirmou os resultados

obtidos com a sonda de *Characidium* e revelou que estas classes estão localizadas nos mesmos cromossomos (Figura 11).

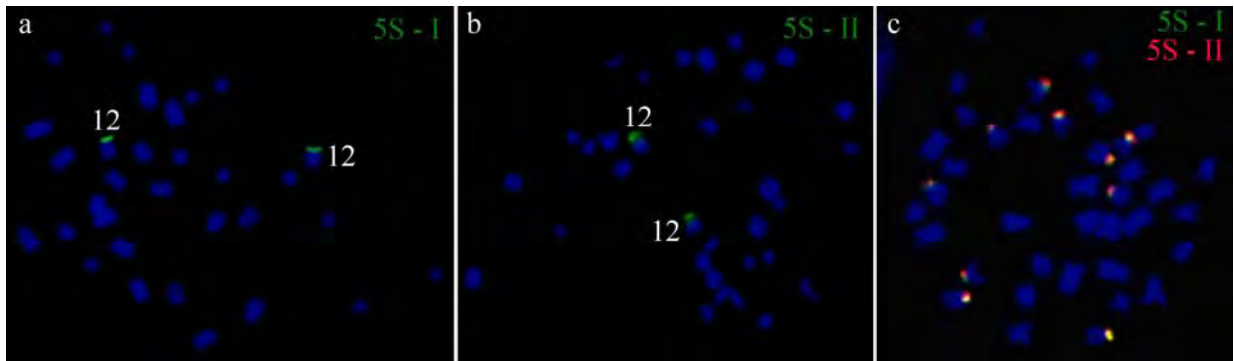


Figura 11. Em a e b, metáfases de *Eigenmannia* sp2 após hibridação *in situ* com sondas para as classes I (a) e classe II (b) do DNAr 5S de exemplares de *Gymnotus*. Em c, metáfase de *E. virescens* após hibridação *in situ* com sondas para a classe I (verde) e para a classe II (vermelho) do DNAr de *Gymnotus*.

A ocorrência de sítios de DNAr 5S dispersos tem sido detectadas em diversas espécies de peixes (Moran *et al.*, 1996; Fujiwara, *et al.*, 1998; Martins e Galetti Jr., 1999). O DNAr 5S normalmente se localiza em cromossomos distintos do DNAr 18S em eucariotos superiores (Martins e Galetti, 1999). Essa condição se deve possivelmente porque em *loci* cromossômicos distintos essas sequências poderiam evoluir independentemente e também porque esses DNA ribossomais possuem dinâmicas funcionais diferentes e acabam por requerer distanciamento físico (Martins e Galetti, 2000).

A não conservação do padrão de distribuição desses sítios ribossômicos entre essas espécies poderia estar associada à perda ou ganho desses genes entre diferentes espécies e/ou populações. Ainda, considerando que os sinais de hibridação com a sonda de DNAr 5S estão diretamente relacionados aos blocos de heterocromatina centromérica, é possível supor que alguns desses sinais nos citótipos de *E. virescens*, *Eigenmannia* sp e em *E. cf. trilineata* correspondam a pseudogenes, que apresentariam uma sequência muito semelhante a do RNAr 5S, mas que estariam inativos, como sugerido ocorrer em *Centropyge aurantonotus* (Affonso e Galetti Jr., 2005). No entanto, a presença de sinais de hibridação nos maiores cromossomos metacêntricos de *Eigenmannia* sp1 e nos cromossomos sexuais de *E. virescens*-XY (Figura 12) poderiam indicar que estas sequências estão realmente ativas e que desempenham um significativo papel no processo de evolução cariotípica deste grupo. Em *Eigenmannia* sp2, a presença de apenas um cromossomo portador desta sequência ribossômica pode estar

associada aos rearranjos cromossômicos ocorridos, que podem ter levado à perda de unidades repetidas deste gene.

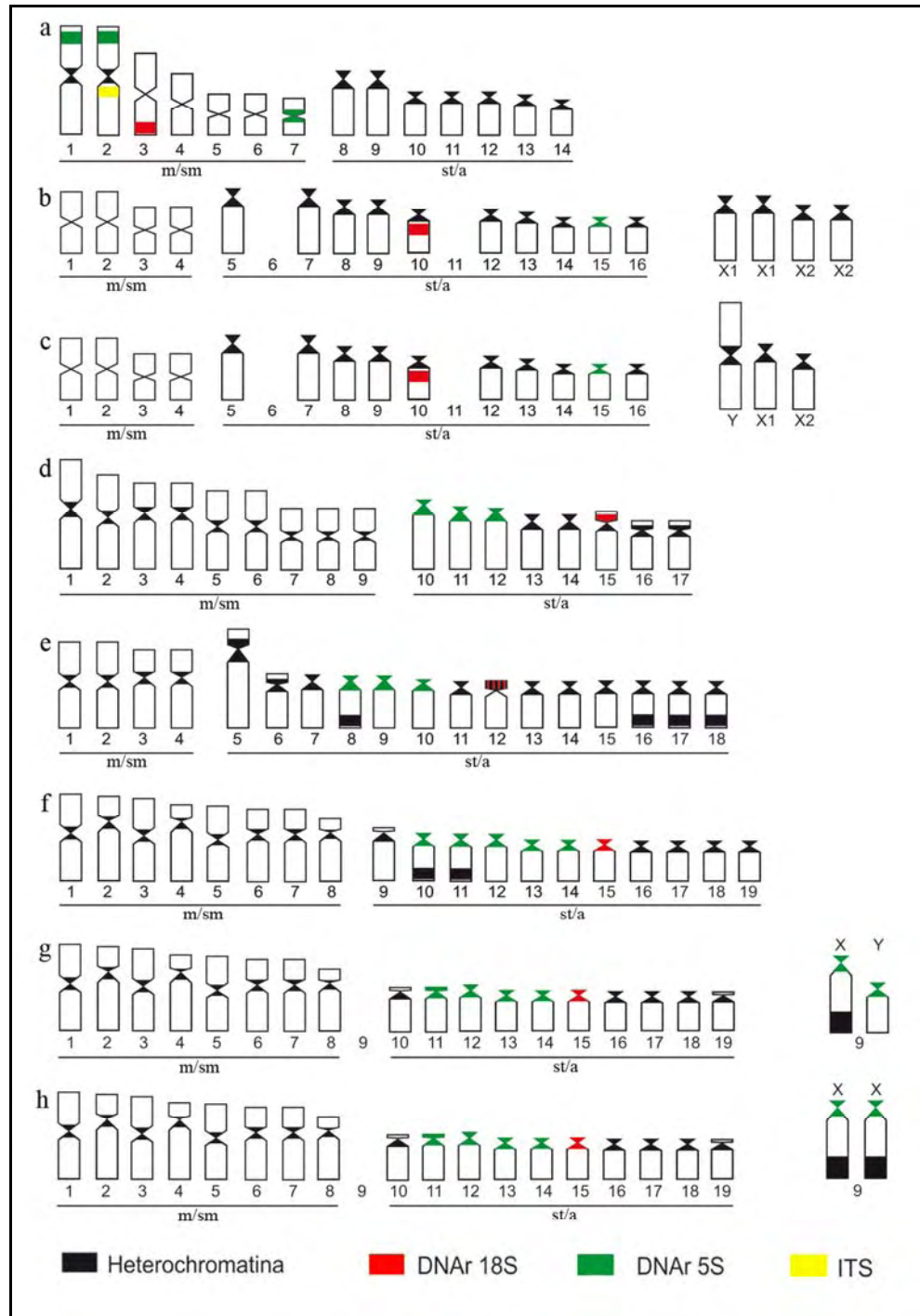


Figura 12: Idiograma mostrando os padrões de hibridação descritos neste trabalho. Em a, *Eigenmannia* sp1, em b, *Eigenmannia* sp2 fêmea, em c, *Eigenmannia* sp2 macho, em d, *E. cf.*

trilineata, em e, *Eigenmannia* sp, em f, *E. virescens*, em g, *E. virescens*-XY macho e em h, *E. virescens*-XY fêmea.

4.4 Elementos Retrotransponíveis – Rex 1 e Rex 3

O genoma eucarioto é composto por uma fração considerável de DNA repetitivo (Charlesworth *et al.*, 1994), no qual estão incluídos os elementos transponíveis, que englobam os transposons e retrotransposons (Sumner, 2003). Considerando que o mapeamento do DNA repetitivo nos cromossomos dos peixes pode fornecer informações significativas acerca da sua organização e dinâmica evolutiva, foram amplificados os elementos retrotransponíveis Rex 1 e Rex 3 a partir do DNA de amostras de todas as espécies/citótipos de *Eigenmannia* analisados. Para se determinar a localização cromossômica destes elementos transponíveis foram realizados experimentos de hibridação *in situ* fluorescente em todas as espécies/citótipos usando sondas produzidas a partir do DNA de *Eigenmannia* sp2 e *E. virescens*-XY.

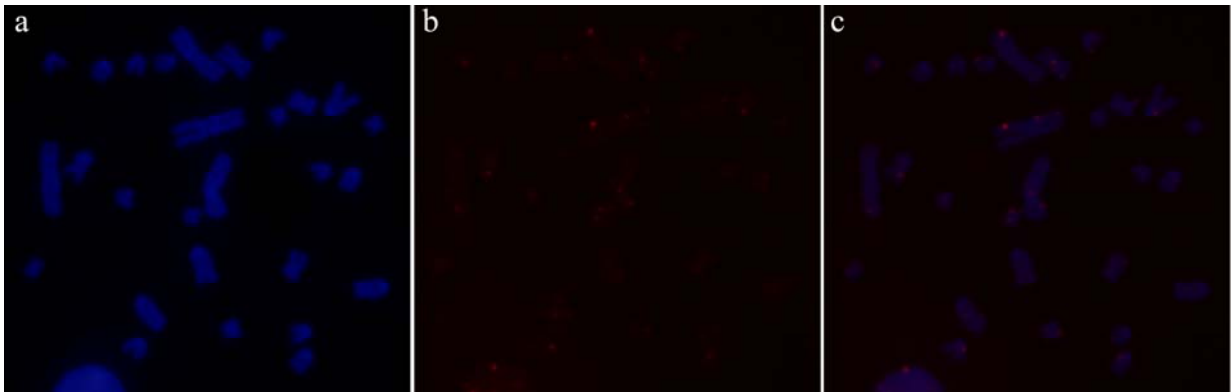


Figura 13. Metáfases de *Eigenmannia* sp1 evidenciando o padrão de hibridação com a sonda do elemento retrotransponível Rex 3.

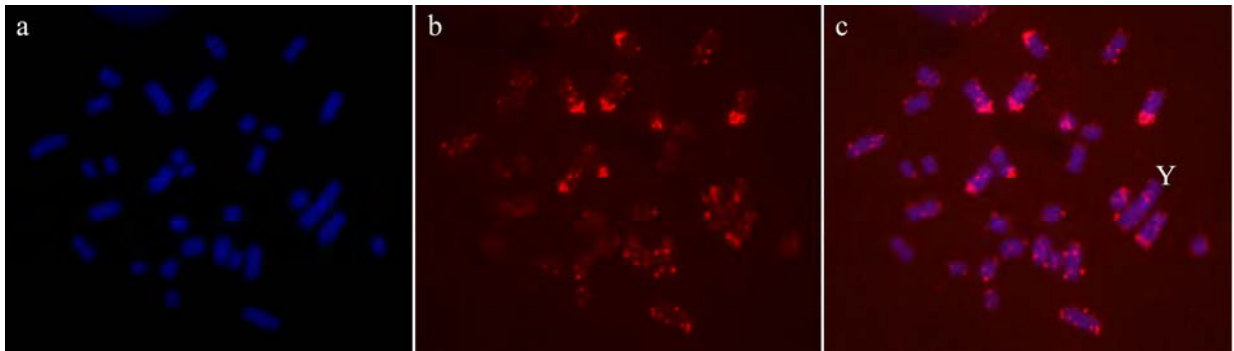


Figura 14. Metáfases de *Eigenmannia* sp2 evidenciando o padrão de hibridação com a sonda do elemento retrotransponível Rex 3.

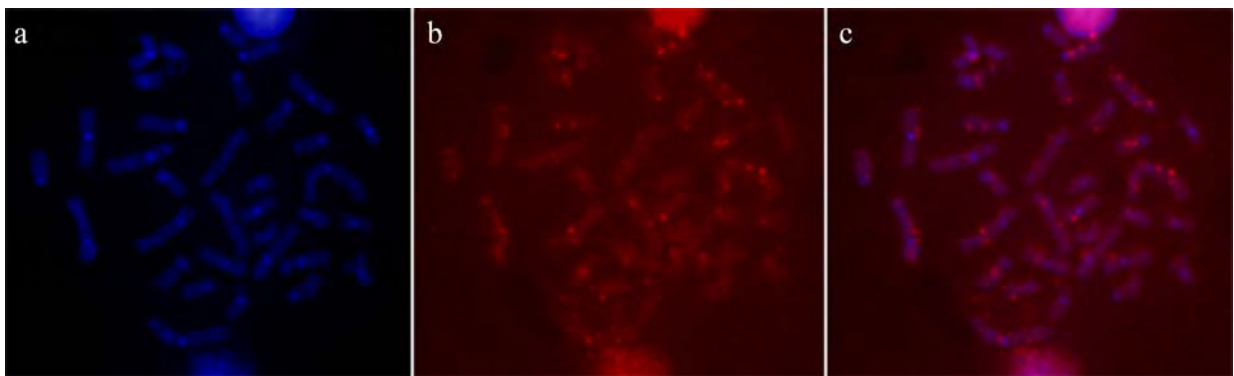


Figura 15. Metáfases de *E. cf. trilineata* evidenciando o padrão de hibridação com a sonda do elemento retrotransponível Rex 3.

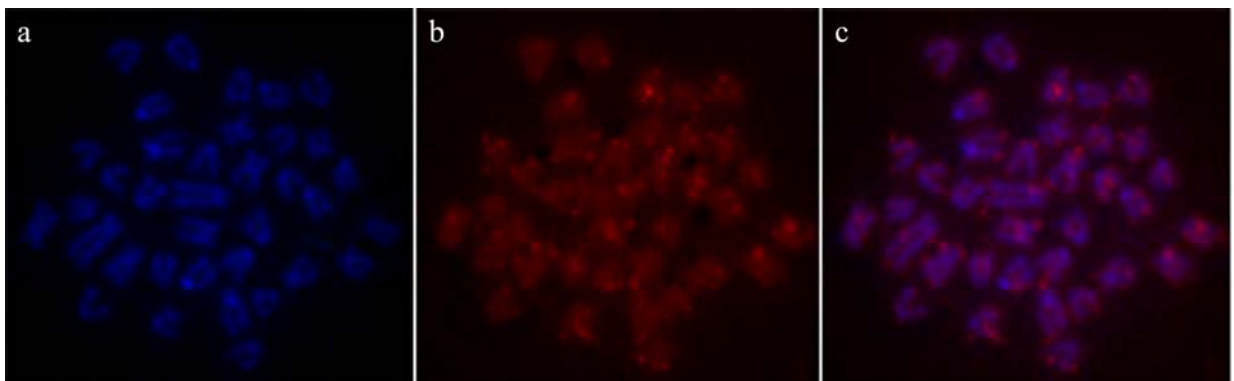


Figura 16. Metáfases de *Eigenmannia* sp evidenciando o padrão de hibridação com a sonda do elemento retrotransponível Rex 3.

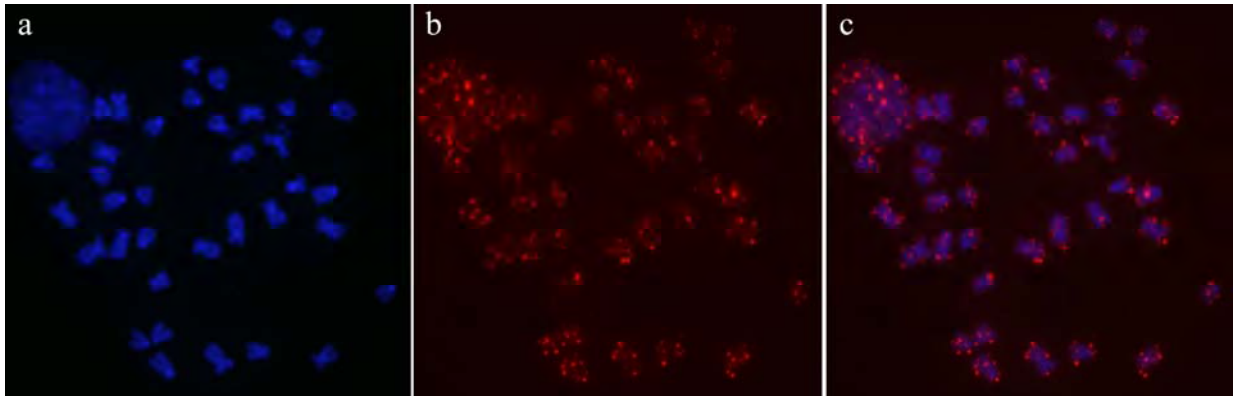


Figura 17. Metáfases de *E. virescens* evidenciando o padrão de hibridação com a sonda do elemento retrotransponível Rex 3.

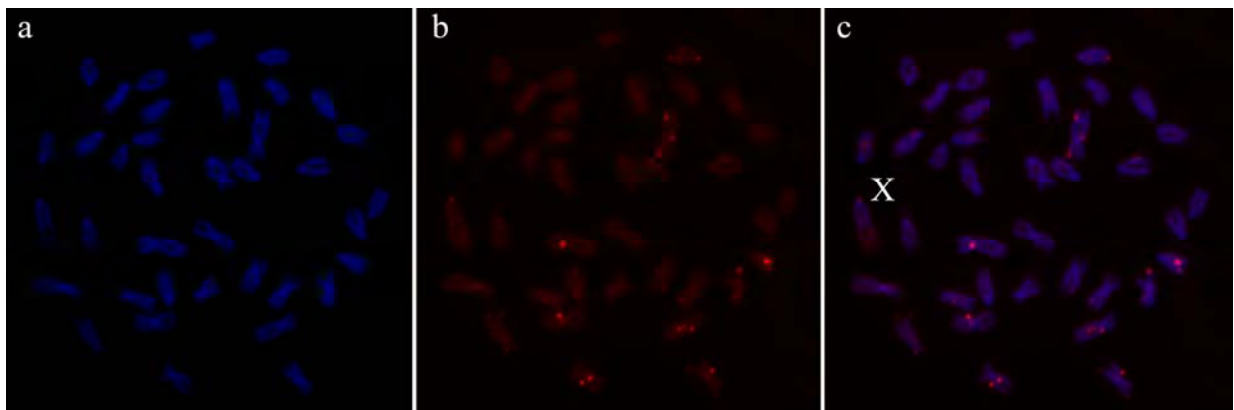


Figura 18. Metáfases de *E. virescens*-XY evidenciando o padrão de hibridação com a sonda do elemento retrotransponível Rex 3.

Para todas as espécies analisadas, tanto o elemento retrotransponível Rex 1 quanto Rex 3 apresentaram um padrão de dispersão similar, sendo que os dois elementos retrotransponíveis estão organizados em pequenos *clusters* e dispersos em todos os cromossomos das espécies (Rex 3 – Figuras 13, 14, 15, 16 e 17 e Rex 1 – Figuras 18, 19, 20, 21). No entanto, *Eigenmannia* sp2 apresentou um acúmulo acentuado do elemento Rex 3 em regiões centroméricas ricas em heterocromatina (Figura 14). A presença de elementos transponíveis na heterocromatina é uma característica comum em eucariotos multicelulares (Hua-Van *et al.*, 2005) e esta condição pode estar relacionada com a sua importância na estrutura e organização de regiões heterocromáticas, como o centrômero (Dimitri *et al.*, 1999; Dawe, 2003). No entanto, de forma geral, os elementos retrotransponíveis Rex 1 e Rex 3 estão distribuídos homogeneamente em regiões eucromáticas e heterocromáticas dos cromossomos de todas as espécies/citótipos de *Eigenmannia* analisados, corroborando a ideia de que estes

elementos tendem a se acumular de forma semelhante nos cromossomos de um mesmo grupo de peixes (Valente *et al.*, 2010). Através da observação de resultados semelhantes, Ferreira *et al.* (2010) sugerem que ambas as sequências estariam evoluindo em conjunto ou através de um mesmo mecanismo.

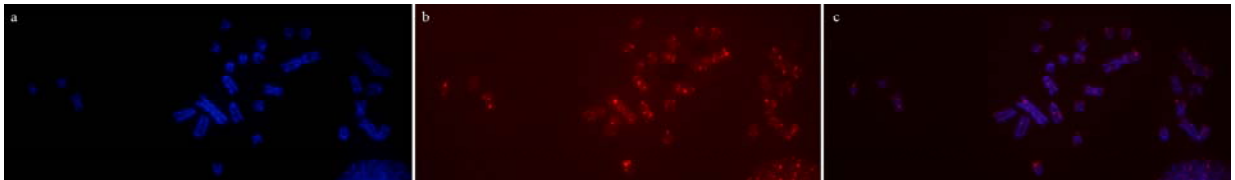


Figura 19. Metáfases de *Eigenmannia* sp1 evidenciando o padrão de hibridação com a sonda do elemento retrotransponível Rex 1.

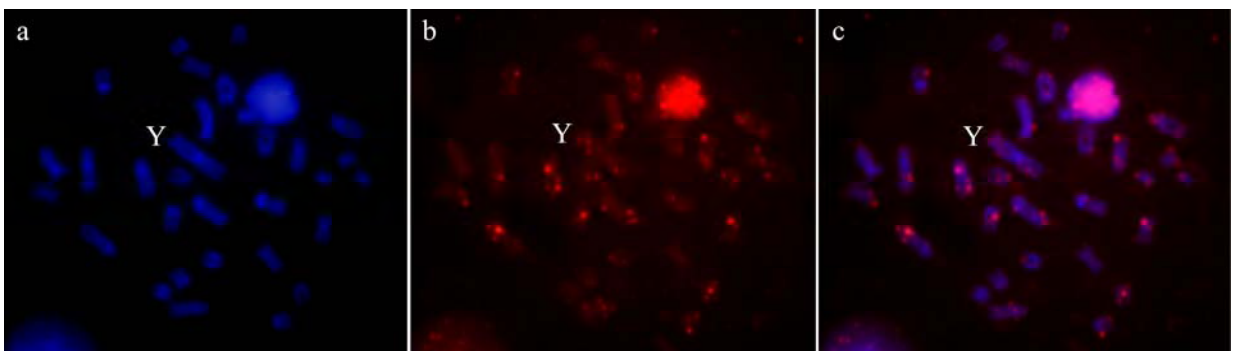


Figura 20. Metáfases de *Eigenmannia* sp2 evidenciando o padrão de hibridação com a sonda do elemento retrotransponível Rex 1.

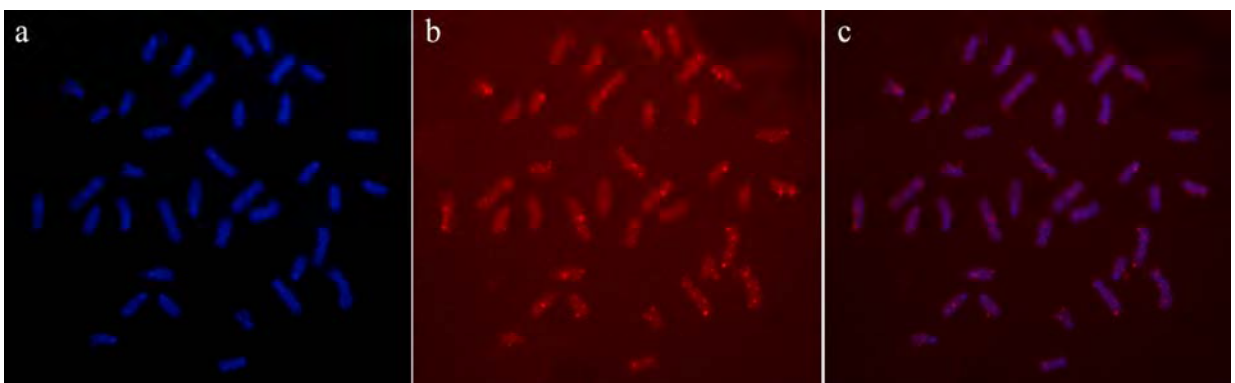


Figura 21. Metáfases de *E. virescens* evidenciando o padrão de hibridação com a sonda do elemento retrotransponível Rex 1.

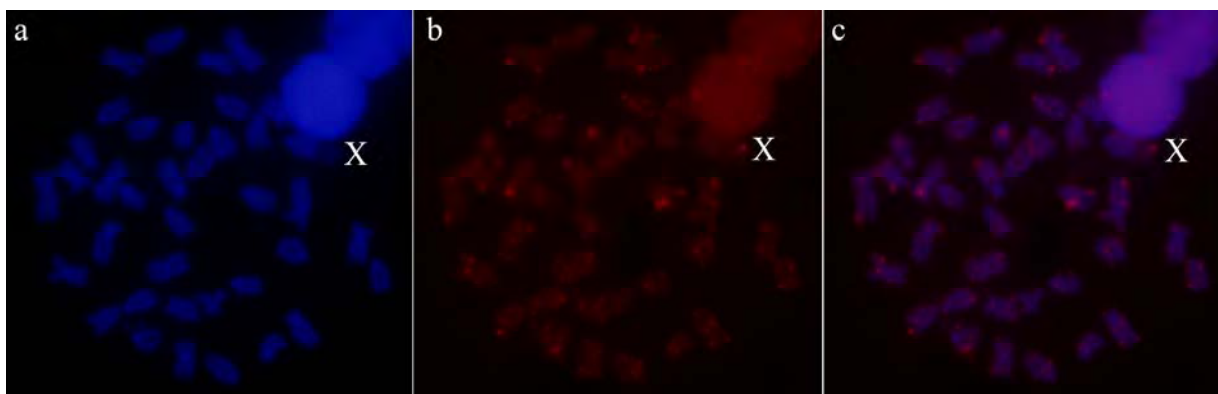


Figura 22. Metáfases de *E. virescens* evidenciando o padrão de hibridação com a sonda do elemento retrotransponível Rex 1.

4.5 Pintura Cromossômica – Sonda Y

Muitos vertebrados têm a determinação genética do sexo baseada em cromossomos sexuais, diferenciados ou não. Estes sistemas representam os sistemas genéticos mais diversificados e com maior rapidez de evolução em toda a biologia (Namekawa e Lee, 2009). Os sistemas sexuais mais conhecidos são o sistema XX-XY (heterogametia masculina) dos mamíferos e o sistema ZZ-ZW (heterogametia feminina) das aves. Quando diferenciados, estes cromossomos sexuais são cromossomos altamente heteromórficos, sendo o X e Z caracterizados por possuírem geralmente maior tamanho e maior quantidade de genes e o Y e o W por serem de tamanho menor, altamente heterocromáticos e possuírem apenas um pequeno número de genes (Takehana *et al.*, 2008). No entanto, Nanda *et al.* (1999), relataram a inexistência de qualquer homologia entre os cromossomos humanos XY e os cromossomos ZW de galinhas, sugerindo diferentes origens evolutivas para os cromossomos sexuais em mamíferos e aves.

Dentre os vertebrados, os peixes representam o maior e mais diversificado grupo de organismos, com cerca de 28.000 espécies reconhecidas (Nelson, 2006). Esta diversidade também se aplica a seu processo de reprodução, com a ocorrência de diferentes mecanismos, incluindo gonocorismo, hermafroditismo e unissexualidade (Breder e Rosen, 1966; Price, 1984). No entanto, a determinação sexual poligênica, com cromossomos indiferenciados, parece ser um mecanismo comum para a maioria das espécies (Ohno, 1974). Apesar disso, existem várias espécies de peixes com sistemas cromossômicos de diferenciação sexual (Schartl, 2004), desde sistemas simples dos tipos XX-XY e ZZ-ZW, até raros casos de sistemas sexuais altamente diferenciados, com cromossomos sexuais múltiplos (Bertollo e Cavallaro, 1992).

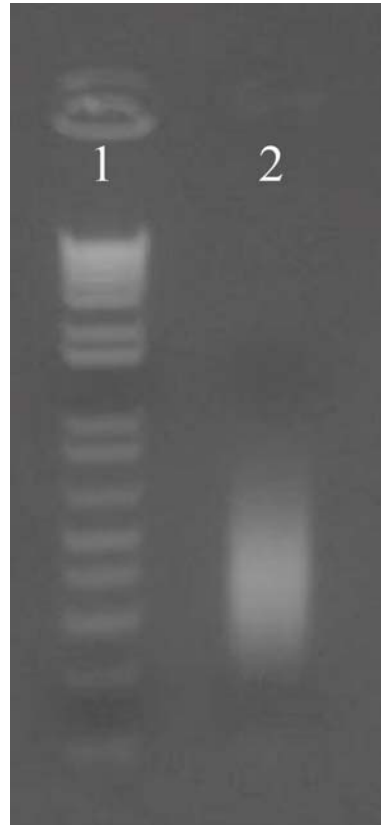


Figura 23: Amplificação do DNA microdissecado (cromossomo Y) por DOP-PCR.

A aplicação da técnica de hibridação fluorescente *in situ* com sondas para cromossomos específicos (pintura cromossômica), obtidas por microdissecção, tem se mostrado uma ferramenta importante para estudos de citogenética de peixes, oferecendo informações sobre a homologia dos cromossomos sexuais em espécies estreitamente relacionadas, como nos gêneros *Triphorteus* (Diniz *et al.*, 2008) e em algumas espécies de *Eigenmannia* (Henning *et al.*, 2008a).

A amplificação do cromossomo Y por DOP-PCR resultou em fragmentos de DNA com tamanhos que variam de 200 e 600pb (Figura 23). A hibridação *in situ* dessa sonda em preparações de cromossomos metafásicos de *Eigenmannia* sp2 resultou em completa marcação no cromossomo Y e de dois cromossomos autossômicos, possivelmente um dos homólogos do par 6 e um dos homólogos do par 11 (Figura 24), confirmando resultados obtidos por Henning *et al.*, (2010), além de hibridações menos específicas em regiões heterocromáticas. A utilização desta sonda em experimentos de hibridação em todas as espécies/citótipos analisados, bem como a produção de novas sondas a partir do cromossomo X de *E. virescens* e até mesmo do cromossomo W de *E. virescens* com sistema sexual ZZ-ZW (Silva *et al.*, 2009) trarão significativos esclarecimentos sobre a dinâmica evolutiva dos cromossomos sexuais em peixes Neotropicais.

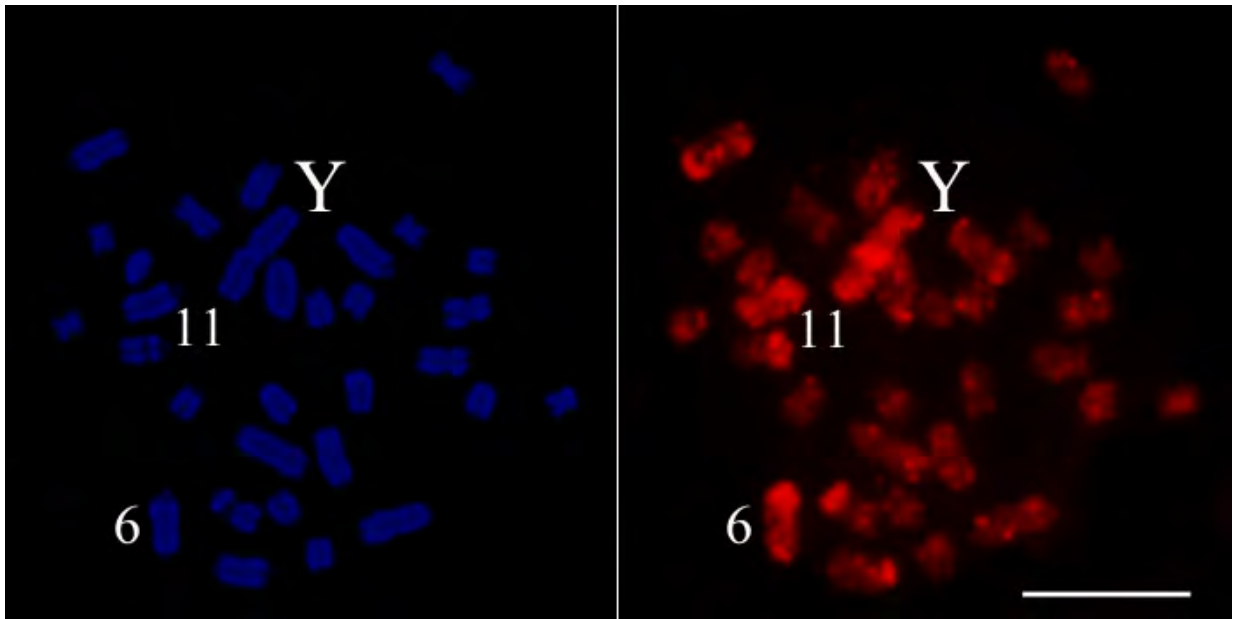


Figura 24: Metáfases de exemplares macho de *Eigenmannia* sp2 após a hibridação *in situ* com a sonda Y.



Eigenmannia virences

Considerações Finais

5 Considerações finais

Os estudos citogenéticos desenvolvidos em diferentes espécies/citótipos do gênero *Eigenmannia* trouxeram significativas informações relacionadas à evolução cromossômica neste gênero. Os representantes deste grupo de peixes apresentaram número diplóide altamente diversificado entre as espécies e populações analisadas, com constituição cariotípica estruturada com base em cromossomos de todos os tipos relatados, metacêntricos, submetacêntricos, subtelo-cêntricos e acrocêntricos.

A análise citogenética convencional (Giemsa, RONS e bandamento C), além de evidenciar a grande diversidade cariotípica, relacionada às variações do número diplóide, permitiu identificar variações também na microestrutura dos cromossomos, além de confirmar a existência de polimorfismo relacionado a um sistema múltiplo de determinação cromossômica sexual, observado em representantes de *Eigenmannia* sp2. A caracterização citogenética evidenciou para esta espécie/citótipo um número diplóide de $2n=31$ cromossomos nos machos e $2n=32$ cromossomos nas fêmeas, que foi identificado como um sistema de cromossomos sexuais múltiplos do tipo $X_1X_1X_2X_2-X_1X_2Y$. Portanto, as diferenças de números diplóides e de morfologia dos cromossomos encontradas sugerem a ocorrência de rearranjos estruturais e numéricos na diferenciação cariotípica desta espécie, onde o cromossomo Y teve sua origem aparentemente a partir da fusão entre os cromossomos autossomos dos pares 6 e 11 (Almeida Toledo *et al.*, 2000). Por outro lado, enquanto *E. virescens* (amostra do Ribeirão Claro, bacia hidrográfica do Rio Tietê) apresentou número diplóide de $2n=38$ cromossomos, com a presença de sistema de diferenciação sexual simples do tipo XX-XY, já *Eigenmannia* sp1 ($2n=28$), *Eigenmannia* sp ($2n=36$), *E. cf. trilineata* ($2n=34$), *E. cf. limbata* ($2n=38$) e *E. virescens* ($2n=38$) (bacia hidrográfica do Rio Mogi-Guaçu), não foi observado polimorfismo cromossômico relacionado ao sexo.

A técnica de bandamento C vem se mostrando muito útil nos estudos citogenéticos de peixes como um importante marcador cromossômico, revelando diferenças na distribuição de segmentos de heterocromatina que permitem a caracterização de gêneros, espécies e populações (Mantovani *et al.*, 2000). Quando submetidas ao tratamento para detecção da heterocromatina constitutiva, as espécies analisadas revelaram blocos heterocromáticos localizados em posição centromérica e pericentromérica na maioria dos cromossomos, corroborando com dados já descritos por outros autores (Fernandes-Matioli *et al.*, 1998; Silva & Margarido, 2005; Margarido *et al.*, 2007). Em *E. virescens* foram caracterizados

cromossomos sexuais diferenciados pela presença marcante de segmentos de heterocromatina, além de grandes blocos heterocromáticos em um par de cromossomos acrocêntricos.

A técnica da reação com nitrato de Prata para detecção das regiões organizadoras de nucléolo, que se apresenta também como um importante marcador citogenético, tem sido muito utilizada em peixes, podendo ser considerada como uma ferramenta de grande auxílio nos estudos citotaxonômicos das espécies (Galetti Jr., 1998). As análises realizadas revelaram que tanto pela impregnação com o nitrato de Prata, quanto pela hibridação *in situ* com a sonda de DNAr 18S, foi detectada a presença de RONS simples nas seis espécies/citótipos analisadas de *Eigenmannia*, evidenciando marcação em um único par cromossômico. Os dados apresentados apontam que RONS localizadas em apenas um par cromossômico constituem uma característica marcante do gênero *Eigenmannia* e as variações observadas quanto a localização cromossômica deste DNAr podem estar relacionadas a rearranjos estruturais ocorridos durante o processo de diferenciação dos representantes deste grupo de peixes.

O mapeamento cromossômico dos genes de DNAr em representantes do gênero *Eigenmannia* evidenciou que os segmentos gênicos do DNAr 5S normalmente se localizam em cromossomos distintos daqueles do DNAr 18S em eucariotos superiores (Martins e Galetti, 1999). Essa condição se deve possivelmente pelo fato de que, estando localizadas em *loci* cromossômicos separados e distintos, estas sequências poderiam evoluir de modo independente e também por possuírem dinâmicas funcionais diferentes, estes DNA ribossomais requerem distanciamento físico para melhor exercerem sua função fisiológica (Martins e Galetti, 2000). O padrão de dispersão encontrado na distribuição destes sítios ribossômicos entre as espécies poderia estar associado possivelmente à perda ou ganho desses genes entre diferentes espécies e/ou populações durante o processo de diferenciação. Por outro lado, considerando que os sinais de hibridação da sonda de DNAr 5S estão diretamente relacionados às regiões dos blocos de heterocromatina centromérica, é possível supor que alguns desses sinais poderiam corresponder a pseudogenes nas espécies *E. virescens* e *E. cf. trilineata*, pelo fato destes segmentos apresentarem uma sequência muito semelhante a do RNAr 5S; contudo, estes estariam inativos, como foi sugerido ocorrer em *Centropyge aurantonotus* (Affonso e Galetti Jr., 2005).

A aplicação da técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) utilizando sonda para o DNAr 18S confirmou os resultados obtidos com a impregnação pelo nitrato de Prata. Os resultados combinados destas duas metodologias evidenciaram serem as sequências

ribossômicas neste grupo de peixes bastante conservadas. Em todas as amostras analisadas foi observado apenas um par de cromossomos portador de sítios de DNAr. Entretanto, a presença de polimorfismo de tamanho nestas regiões foi evidenciada em todas as espécies/citótipos estudadas, conforme descrito ocorrer comumente em peixes (Foresti *et al.*, 1981), podendo ser resultado de diferenças no número de cópias dos genes ribossomais.

A localização cromossômica dos elementos retrotransponíveis Rex 1 e Rex 3 foi realizada nas seis espécies/citótipos de *Eigenmannia*, com experimentos de hibridação *in situ* fluorescente utilizando sondas obtidas a partir do DNA de *Eigenmannia* sp2 e *Eigenmannia virescens*-XY. Os resultados obtidos revelaram um padrão de distribuição disperso destes elementos em todos os cromossomos, geralmente organizados em pequenos *clusters* de modo similar ao verificado ocorrer em outros estudos. Sendo a presença de elementos transponíveis na heterocromatina uma característica comum em eucariotos multicelulares (Hua-Van *et al.*, 2005), esta condição poderia estar relacionada com a sua importância na estrutura e organização da heterocromatina, como aquela encontrada na região do centrômero (Dimitri *et al.*, 1999; Dawe, 2003). Considera-se que as informações obtidas nas análises realizadas nas espécies/citótipos do gênero *Eigenmannia* certamente constituem avanços significativos acerca para a compreensão da organização e dinâmica evolutiva destes elementos genômicos.

A aplicação da técnica de hibridação fluorescente *in situ* com sondas obtidas de cromossomos específicos (pintura cromossômica), foi realizada a partir da microdissecção cromossômica, que vêm se mostrando uma ferramenta valiosa para os estudos de citogenética de peixes, oferecendo informações sobre a homologia dos cromossomos sexuais em espécies estreitamente relacionadas, como visto no gênero *Triphorteus* (Diniz *et al.*, 2008) e em algumas espécies de *Eigenmannia* (Henning *et al.*, 2008a). A sonda do cromossomo Y de *Eigenmannia* sp2 foi obtida a partir da aplicação da técnica de amplificação DOP-PCR, que resultou na obtenção de fragmentos de DNA com tamanhos que variam de 200 e 600pb, permitindo uma marcação completa do cromossomo Y. As marcações foram identificadas também em dois cromossomos autossômicos, possivelmente um dos homólogos do par 6 e um dos homólogos do par 11, corroborando com dados anteriormente estudados por Henning *et al.*, 2010, que encontrou hibridação menos específicas em regiões heterocromáticas de outros cromossomos. A aplicação da técnica de microdissecção para obtenção de sondas cromossômicas ou de segmentos cromossômicos específicos, embora ainda no seu início de utilização em peixes, já se apresenta como uma ferramenta de grande aplicação para a compreensão da estrutura cromossômica e das modificações ocorridas nos cromossomos durante o processo de diversificação das espécies.

As características citogenéticas dos representantes das espécies/citótípos do gênero *Eigenmannia* detectadas ou confirmadas no presente estudo, como a alta diversidade na macro e microestrutura cariotípica, bem como a ocorrência de polimorfismos cromossômicos ligados ao sexo, fazem deste grupo de peixes um bom modelo de estudos genéticos, colaborando com informações sobre a dinâmica evolutiva das espécies deste grupo de peixes.



Eigenmannia cf. trilineata

Referências

6 Referências

- Amici A, Rollo F. (1991) The nucleotide sequence of the 5S ribosomal RNA gene of *Pyenophora graminea*. *Nucleic Acids Research*, 19:5073.
- Affonso PRAM, Galetti Jr. PM. (2005) Chromosomal diversification of reef fishes from genus *Centropyge* (Perciformes, Pomacanthidae). *Genetica*, 123: 227-233.
- Albert JS. (2001) Species diversity and phylogenetic systematics of American knifefishes (Gymnotiformes – Teleostei). Misc. Publ, Museum of Zoology, University of Michigan.
- Almeida-Toledo LF, Foresti F, Toledo-Filho S. (1985) Spontaneous triploidy and NOR activity in *Eigenmannia* sp. (Pisces, Sternopygidae) from the Amazon basin. *Genetica*, 66: 85-88.
- Almeida-Toledo LF, Stocker AJ, Foresti F, Toledo-Filho SA. (1996) Fluorescence *in situ* hybridization with rDNA probes on chromosomes of two nucleolus organizer region phenotypes of a species of *Eigenmannia* (Pisces, Gymnotoidei, Sternopygidae). *Chromosome Research*, 4: 301-305.
- Almeida-Toledo LF. (1998) Cytogenetic markers in neotropical freshwater fishes. in: Malabarba R, Reis RE, Vari RP, Lucena ZM, Lucena, CAS. *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Porto Alegre, Edipurcs. 583-588.
- Almeida-Toledo LF. (2000) Da coloração convencional aos marcadores moleculares: o modelo *Eigenmannia*. Resumos do VIII Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes, Manaus (AM). 101.
- Almeida-Toledo LF, Foresti F, Daniel MFZ, Toledo-Filho SA. (2000a) Sex chromosome evolution in fish: the formation of the neo-Y chromosome in *Eigenmannia* (Gymnotiformes). *Chromosoma*, 109:197-200.
- 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. (2001) Morfologicamente diferenciados sex cromossomos em neotropical freshwater fish. *Genética*, 76767.111: 1-3.
- Almeida-Toledo LF, Osouf-Costaz C, Foresti F, Bonillo C, Porto-Foresti F, Silva DMFZ. (2002). Conservation of the 5S-bearing chromosome pair and co-localization with major rDNA clusters in five species of *Astyanax* (Pisces, Characidae). *Cytogenetic and Genome Research*, 97: 229–223.

- Albert JS, Crampton WGR. (2003) Seven new species of the Neotropical electric fish *Gymnotus* (Teleostei, Gymnotiformes) with a redescription of *G. carapo* (Linnaeus). *Zootaxa*, 287, 1–54.
- 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.
- Alves AL, Oliveira C, Nirchio M, Granado A, Foresti F. (2006) Karyotypic relationships among the tribes of *Hypostominae* (Siluriformes: Loricariidae) with description of XO sex chromosome system in a neotropical fish species. *Genetica*, 128:1-9.
- Andreatta AA, Almeida-Toledo LF, Oliveira C, Toledo-Filho SA. (1993) Chromosome studies in *Hypoptopomatinae* (Pisces, Siluriformes, Loricariidae): II. ZZ/ZW sex chromosome system, B chromosomes, and constitutive heterochromatin differentiation in *Microlepidogaster leucofrenatus*. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 63:215-220.
- Artioni RF, Falcão JN, Moreira-Filho O, Bertollo LAC. (2001) An uncommon condition for a sex chromosome system in Characidae fish. Distribution and differentiation of ZZ/ZW system in *Triporthesus*. *Chromosome Research*, 9: 449-456.
- Artioni RF, Bertollo LAC. (2002) Evolutionary aspects of the ZZ/ZW sex chromosome system in the Characidae fish, genus *Triporthesus*. 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 microcloning 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 *Triporthesus guentheri*. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 60: 60-63.
- Bertollo LAC, Fontes MS, Fenocchio AS, Gang J. (1997) The X1X2Y sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus*. I G- C and chromosome replication banding. *Chromosome Research*, 5:493-499.
- Bertollo LAC, Mestriner CA. (1998) The X1X2Y sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus* II Meiotic analysis. *Chromosome Research*, 6:141-147.
- Breder CM, Rosen DE. (1966) *Modes of Reproduction in Fishes*. Garden City. NY: Natural History Press.

- 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.
- Campos-da-Paz, R. (1997) Sistemática e taxonomia dos peixes elétricos das bacias dos rios Paraguai, Paraná e São Francisco, com notas sobre espécies presentes em rios costeiros do leste do Brasil (Teleostei: Ostariophysi: Gymnotiformes). Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo USP, São Paulo, 336p.
- Centofante L, Bertollo LAC, Moreira Filho O. (2001). Comparative cytogenetics among sympatric species of *Characidium* (Pisces, Characiformes). Diversity analysis with the description of a ZW sex chromosome system and natural triploidy. *Caryologia*, 54: 253-260.
- 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 *Characidim* 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.
- 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.
- 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.
- 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

- Diniz D, Laudicina A, Cioffi MB, Bertollo LAC. (2008). Microdissection and whole chromosome painting. Improving sex chromosome analysis in *Triportheus* (Teleostei, Characiformes). *Cytogenetic and Genome Research*, 122: 163-168.
- 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.
- Fagundes V, Christoff AU, Scalzi-Martin J, Hozier J, Moreira-Filho CA, Yonenaga-Yassuda, Y. (2000) XY translocation revealed by chromosome microdissection and FISH in fertile XY females in the Brazilian rodent *Akodon montensis*. *Cytogenetic and Cell Genetics*, 88: 124-129.
- Feldberg E, Bertollo LAC, Almeida-Toledo LF, Foresti F, Moreira-Filho O, Santos AF. (1987) Biological aspects of amazonian fishes. IX. Cytogenetic studies in two species of the genus *Semaprochilodus* (Pisces, Prochilodontidae). *Genome*, 20: 1-4.
- Ferreira DC, Oliveira C, Foresti F. (2010) Chromosome mapping of retrotransposable elements Rex1 and Rex3 in three fish species in the subfamily Hypoptopomatinae (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). *Cytogenetic and Genome Research*, 133: 64-70.
- Fink SV, Fink WL. (1981) Interrelations of the Osthariophysan fishes (Teleostei). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 72:297-353.
- Foresti F, Toledo FS, Almeida-Toledo LF. (1981) Polymorphic nature of the nucleolus organizer regions in fishes. *Cytogenetics Cell Genetics*, 31: 134-141.
- Fujiwara A, et al. (1998) Chromosomal localization and heterochromatin association of ribosomal RNA gene loci and silver-stained nucleolar organizer regions in salmonid Fishes. *Chromosome Research*, 6: 463-471.
- Galetti Jr, PM, Foresti F. (1986) Evolution of the ZZ/ZW system in *Leporinus* (Pisces, Anostomidae) *Cytogenetics and Cell Genetics*, 43:43-46.
- 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.
- Griffiths AJF, Gelbart WM, Miller JH, Lewontin RC. (2001) *Genética Moderna*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 589p.
- Henning F. (2007) Evolução de cromossomos sexuais no gênero *Eigenmannia* (Teleostei: Gymnotiformes). Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, 61p.

- 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.
- Henning F, Moysés CB, Calcagnotto D, Almeida-Toledo LF. (2010) Independent fusions and recent origins of sex chromosomes in the evolution and diversification of the glass knife fishes (*Eigenmannia*). *Heredity*, 105: 10-24,
- Holmquist GP, Dancis B. (1979) Telomere replication, Kinetochores organizers, and satellite DNA evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 76: 4566-4570.
- 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
- Jesus CM, Moreira-Filho O. (2000) Karyotypes of three species of Parodon (Teleostei, Parodontidae). *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, 11: 75-80.
- 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.
- 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.
- Li YC, Cheng YM, Hsieh LJ, Ryder OAF, Liao SJ, Hsiao KM, Tsai FJ, Tsai CH, Lin CC. (2005) Karyotypic evolution of a novel cervid satellite DNA family isolated by microdissection from the Indian muntjac Y chromosome. *Chromosoma*, 114: 28-38.
- 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.
- Mago & Leccia F. (1994) Electric fishes of the continental waters of America. *Biblioteca de la Academia de Ciencias Físicas, Matemáticas y Naturales*, Caracas, 29:1-206.

- Maistro EL, Mata EP, Oliveira C, Foresti F. (1998) Unusual occurrence of a ZZ/ZW sex-chromosome system and supernumerary chromosomes in *Characidium cf. fasciatum* (Pisces, Characiformes, Characidiinae). *Genetica*, 104: 1-7.
- 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.
- Martins C, Galetti Jr. PM. (1999) Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). *Chromosome Research*, 7: 363-367.
- Martins C, Galetti Jr. PM. (2000) Conservative distribution of 5S rDNA loci in *Schizodon* (Pisces, Anostomidae) chromosomes. *Chromosome Research*, 8: 353-355.
- Martins C, Galetti Jr. PM. (2001) Organization of 5S rDNA in species of the fish *Leporinus*: two different genomic localizations are characterized by distinct nontranscribed spacers. *Genome*, 44: 903-910.
- 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, 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.
- 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.
- Moran P, Martinez JL, Garcia-Vasquez E, Pendas AM. (1996) Sex chromosome linkage of 5S rDNA in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Cytogenetics and Cell Genetics*, 75: 145-150.
- 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.
- Moysés CB. (2005) Diversidade genética estrutura populacional e análises filogenéticas no gênero *Eigenmannia* (Pisces: Gymnotiformes). Tese de Doutorado Universidade de São Paulo.

- Moysés CB, Daniel Silva MFZ, Lopes CE, Almeida-Toledo LF, (2010) Cytotype-specific profiles and karyotypes in the Neotropical genus *Eigenmannia* (Teleostei: Gymnotiformes). *Genetica* ('s-Gravenhage), 138: 179-189.
- Mühlmann-Diaz MC, Christian AT, Bedford JS. (1995) Chromosom microdissection. Tenth International Congress of Radiation Research. Wiirzburg, Germany.
- Nanda I, Shan Z, Schartl M, *et al.* (1999) 300 million years of conserved synteny between chicken Z and human chromosome 9. *Nature Genetics*, 21: 258-259.
- Namekawa SH, Lee JT. (2009) XY and ZW Is meiotic sex chromosome inactivation the rule in evolution? *PLoS Genetics*. 5: e1000493.
- Nedi MS, Rajagopal J, Chauhan N, Cronn R, Lakshmikumaran M. (2002) Length and sequence heterogeneity in 5S rDNA of *Populus deltoids*. *Genome*, 45: 1181-1188.
- Nelson JS. (2006) *Fishes of the world*. 4 th, ed., John Wiley & Sons, Inc., Honbobren, New Jersey, 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, Withyachumnarnunkul B, Leardkamolkarn V, Fuchareon S. (2002) Application of micro-FISH for characterization od structural human chromosome abnormalities. *Science Asia*, 28: 1-9.
- Ohno S. (1974) Sex chromosome and sex determining mechanisms. In. *Animal cytogenetics*. Berlin: Gebruder Burntrager, 4: 46-63.
- 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, Almeida-Toledo LF, Foresti F. (2006) Karyotypic Evolution in Neotropical Fishes (Pisano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F, Kaapoor BG. eds) *Fish Citogenetics*. USA. Science Publisher. 111-152.
- Pansonato-Alves JC, Paiva LRS, Oliveira C, Foresti F. (2010) Interspecific chromosomal divergences in the genus *Characidium* (Teleostei: Characiformes: Crenuchidae). *Neotropical Ichthyology*, 8: 77-86.

- 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.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 83: 2934-2938.
- Price DJ. (1984) Genetics of sex determination in fishes: A brief review. 7789p. In: *Fish Reproduction: Strategies and Tactics*. Potts GW, Wootton RJ. eds. London. Academic Press.
- Reis RE, Kullander SO, Ferraris C. (2003) Check List of freshwater Fishes of South and Central America. Porto Alegre: Edipucrs, 742 p.
- Robertson WMRB. (1916) Chromosomes studies. I. Taxonomic relationships shown in the chromosomes of Tettigidae and Acrididae, Locustidae and Grillidae: chromosomes and variations. *Journal of Morphology*, 27: 179-331.
- Rosa R, Bellafronte E, Moreira-Filho O, Margarido VP. (2006). Constitutive heterochromatin, 5S and 18S rDNA genes in *Apareiodon* sp. (Characiformes, Parodontidae) with a ZZ/ZW sex chromosome system. *Genetica*, 128: 159-166.
- Scacchetti PC. (2011) Mapeamento físico dos genes ribossômicos 18 e 5S nos cromossomos de espécies simpátricas do gênero *Gymnotus* (Teleostei, Gymnotiformes, Gymnotidae). Dissertação de mestrado. Universidade Estadual Paulista. Campus Botucatu-SP, 78p.
- 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, Lucena CAS, eds). EDIPUCRS, Porto Alegre, Brasil.
- Schartl M. (2004) Sex chromosome evolution in non-mammalian vertebrates. *Current Opinion in Genetics e Development*, 14: 634-641.
- Senger G, Ludecke HJ, Horsthemke B, Claussen U. (1990) Microdissection of banded human chromosomes. *Human Genetics*, 84: 507-511.

- Silva DS, Milhomem SSR, Pieczarka JC, Nagamachi CY. (2009) Cytogenetic studies in *Eigenmannia virescens* (Sternopygidae, Gymnotiformes) and new inferences on the origin of sex chromosomes in the *Eigenmannia* genus. *BMC Genetics*, 10: 74-82
- Sumner AT. (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research*, 75: 304-306.
- Sumner, A. T. (2003) *Chromosomes: organization and function*. London: Blackwell Publishing company.
- 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.
- Takehana Y, Hamaguchi S, Sakaizumi M. (2008) Different origins of ZZ/ZW sex chromosomes in closely related medaka fishes, *Oryzias javanicus* and *O. hubbsi*. *Chromosome Research*, 16: 801–811.
- Telenius H, Carter NP, Bebb CE, Nordenskjöld M, Ponder BA, Tunnacliffe A. (1992) Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics*, 13: 718-25.
- Valente GT, Mazzuchelli J, Ferreira IA, Poletto AB, Fantinatti BEA, Martins C. (2010) Cytogenetic mapping of the retroelements Rex1, Rex3 and Rex6 among Cichlid fish: New insights on the chromosomal distribution of transposable elements. *Cytogenetic and Genome Research*, 133: 34-42.
- Vicari MR, Moreira-Filho O, Artoni RF, Bertollo LAC. (2006) ZZ/ZW sex chromosome system in an undescribed species of the genus *Apareiodon* (Characiformes, Parodontidae). *Cytogenetic and Genome Research*, 114: 163-168.
- Vicari MR, Artoni RF, Moreira-Filho O, Bertollo LAC. (2008) Diversification of a ZZ/ZW sex chromosome system in *Characidium* fish (Crenuchidae, Characiformes). *Genetica*, 134: 311-317.
- 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.
- Zakian VA. (1997) Life and cancer without telomerase. *Cell*, 91:1-3.