

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 21/01/2015.

HERANÇA, MANUTENÇÃO E ORIGEM DOS DIFERENTES
TIPOS DE CROMOSSOMOS B EM *Prochilodus lineatus*
(CHARACIFORMES, PROCHILODONTIDAE) DO RIO
MOGI-GUAÇU

MANOLO PENITENTE

BOTUCATU - SP

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

HERANÇA, MANUTENÇÃO E ORIGEM DOS DIFERENTES
TIPOS DE CROMOSSOMOS B EM *Prochilodus lineatus*
(CHARACIFORMES, PROCHILODONTIDAE) DO RIO
MOGI-GUAÇU

MANOLO PENITENTE

ORIENTADOR: Prof. Dr. FÁBIO PORTO-FORESTI

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências de Botucatu, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Genética).

BOTUCATU - SP

2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECARIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Penitente, Manolo.

Herança, manutenção e origem dos diferentes tipos de cromossomos B em *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae) do rio Mogi-Guaçu / Manolo Penitente. - Botucatu, 2014

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

Orientador: Fábio Porto-Foresti

Capes: 20204000

1. Peixe - Genética. 2. Curimatã. 3. Polimorfismo (Genética). 4. Cromossomos - Polimorfismo.

Palavras-chave: Cromossomos supranumerários; Curimatã; Herança; Origem; Polimorfismo.

*“Lute com determinação, abrace a vida com paixão,
perca com classe e vença com ousadia, porque o
mundo pertence a quem se atreve e a vida é muito
bela para ser insignificante.”*

(Charles Chaplin)

Ao meu falecido irmão Murilo, por ter sempre me apoiado nas decisões e ter sido um grande companheiro em toda a sua vida.

A minha família – Miriam, Manoela, Valdelício, Wanda, sempre presentes em todas as etapas da minha vida e por sempre me apoiarem.

Ao falecido tio Jair, por ter sido uma ótima pessoa, a qual eu procuro sempre me espelhar.

A Amanda, pelo amor e companheirismo, sempre me apoiando e me dando forças para seguir em frente.

AGRADECIMENTOS

O meu agradecimento é dedicado às instituições e pessoas que contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho, em particular:

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio concedido.

À Faculdade de Ciências da Universidade Estadual Paulista, campus de Bauru e ao Departamento de Ciências Biológicas pelas condições oferecidas para a execução deste trabalho.

Ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, campus de Botucatu, ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Genética, à Seção de Pós-Graduação do IBB e ao Departamento de Morfologia, pelo apoio.

Ao Centro de Pesquisa e Gestão dos Recursos Pesqueiros Continentais/Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (CEPTA/ICMBio) pela grandiosa colaboração para a realização deste trabalho.

Ao Professor Fábio Porto-Foresti, pela grande oportunidade oferecida durante estes seis anos de Lagenpe. Obrigado pela atenciosa orientação, pelo apoio, incentivo e confiança durante minha formação.

Ao Professor Fausto Foresti, pelo incentivo, auxílio e valiosos ensinamentos que sempre serão de grande valia no meu caminho científico.

Ao Pesquisador José Augusto Senhorini pela disponibilidade, ajuda e ensinamentos durante a Iniciação Científica e Mestrado, pelo trabalho realizado junto ao CEPTA/ICMBio o qual foi de fundamental importância para a concretização desta dissertação.

Aos amigos e companheiros do Laboratório de Genética de Peixes (Lagenpe) da Unesp – Bauru: Aline, Andréa, Bruna, Caio, Diego, Façall, Fernanda, Flávio, Maíce,

Milena, Raquel, Rosângela, Sandro, Vinícius, Will por todos os momentos que passamos juntos e principalmente pela amizade que cultivamos ao longo destes anos.

Aos amigos do laboratório de Biologia e Genética de Peixes da Unesp – Botucatu, pela parceria e amizade.

Aos docentes e servidores do Departamento de Ciências Biológicas da Unesp de Bauru e do Departamento de Morfologia da Unesp de Botucatu, pela atenção.

Ao amigo Renato Devidé, pela amizade e principalmente por toda ajuda na parte experimental e nas inúmeras idas e vindas ao CEPTA/ICMBio.

Ao Dr. Diogo Hashimoto pela amizade e pela colaboração neste trabalho participando na banca de qualificação, enriquecendo-o com excelentes sugestões.

A Dra. Patrícia Scudeler pela amizade, participação da banca de qualificação e por auxiliar em uma das etapas fundamentais para a concretização deste trabalho, a microdissecção cromossômica.

Ao grande amigo Sandro Daniel, pela amizade conquistada desde o primeiro dia na graduação, pelas risadas, pela parceria e pela ajuda na realização deste trabalho.

A amiga Tatiana Voltolin, pela amizade, companheirismo e principalmente pelos sábios ensinamentos sobre os cromossomos B durante a Iniciação Científica e o Mestrado.

A minha mãe: Miriam, meus avós: Valdelício e Wanda, por todo amor e incentivo, onde quer que eu estivesse e em todas decisões que tomei. Obrigado por estarem sempre presentes e fazerem parte da minha vida.

A minha irmã Manoela e minhas sobrinhas - Ananda e Alana, pelo amor e por serem tão especiais para minha vida.

Ao meu falecido irmão Murilo, por todo amor e companheirismo em vida, por me apoiar sempre nas decisões, por ter sido uma pessoa de ótimo caráter e por me fazer ter forças de seguir adiante e nunca desistir de lutar.

A Amanda, por todo amor e dedicação durante mais de dez anos de namoro e por ser o alicerce da minha vida, sempre me apoiando e me dando forças nos momentos mais difíceis. Te amo!

Resumo

Prochilodus lineatus constitui-se em uma espécie de grande ocorrência na bacia superior do rio Paraná, envolvendo, sobretudo, os rios Grande, Pardo e Mogi-Guaçu. Citogeneticamente, essa espécie apresenta número diploide de 54 cromossomos dos tipos meta/submetacêntricos e apresenta um interessante sistema de microcromossomos B, que pode ocorrer variação interindividual de zero a nove supranumerários, além de apresentar polimorfismo, sendo encontrados diferentes morfotipos. *P. lineatus* pode ser considerada uma espécie modelo de peixe neotropical, sendo muito utilizada para estudos concernentes à origem, comportamento meiótico e evolução dos cromossomos B, devido à facilidade de captura, manejo, alta frequência de supranumerários e polimorfismo. Atualmente existem muitas especulações a respeito de sua função, origem e herança, o que torna a análise da estrutura do DNA deste tipo cromossômico, assim como o estudo do seu padrão de herança de extrema importância. Diante disto, o presente trabalho teve como objetivo estudar a origem, manutenção e herança das variantes de cromossomos B encontradas em *P. lineatus* do rio Mogi-Guaçu, a partir da análise da composição do DNA, frequência na população natural e padrão de transmissão destes elementos genômicos. Os resultados obtidos a partir da análise da herança destes supranumerários mostrou dinamismo entre as variantes de supranumerários para prevalecerem nos genomas hospedeiros, por meio do padrão de transmissão (k_B), onde o morfotipo B-metacêntrico apresentou k_B acima da taxa Mendeliana, indicando um possível mecanismo de acúmulo (*drive*), enquanto que os morfotipos B-acro e B-submetacêntrico apresentaram k_B abaixo da taxa Mendeliana, indicando estarem em estágio de extinção. Ao realizar a técnica de pintura cromossômica, utilizando as sondas B-específicas obtidas a partir da microdissecção de cada morfotipo, observou-se homologia entre as variantes de cromossomos B, indicando uma origem a partir de uma variante ancestral comum. No entanto, apenas a sonda do cromossomo B-submetacêntrico (B_{sm}) indicou sinais em vários centrômeros dos cromossomos do complemento padrão A, o que sugere que esta seja a variante mais primitiva, a qual teve uma origem intraespecífica a partir de fragmentos de regiões centroméricas e pericentroméricas dos cromossomos A.

Abstract

Prochilodus lineatus is a species of high incidence in the upper Paraná River basin, involving mainly the Grande, Pardo and Mogi-Guaçu Rivers. Cytogenetically, this species has a diploid number of 54 meta/submetacentric chromosomes and presents an interesting system of B microchromosomes, which can occur interindividual variation from zero up to nine supernumeraries, also it presents polymorphism and can be found in different morphotypes. *P. lineatus* can be considered a model species of neotropical fish, commonly used for studies concerning the origin, behavior and evolution of B chromosomes, due to ease of capture, handling, high frequency of supernumerary and polymorphism. Currently, there are only speculations about its function, origin and inheritance, which make the analysis of the DNA structure of this chromosomal type, as well as the study of the inheritance pattern, of the utmost importance. Faced with this, the present work aimed to study the origin, maintenance and inheritance of the B chromosomes variants found in *P. lineatus* from Mogi-Guaçu River, from DNA composition analysis, frequency in natural population and transmission pattern of these genomic elements. The results obtained from the inheritance analysis of these supernumerary showed a dynamism between supernumerary variants to prevail in the host genome through the transmission pattern (k_B), in which the B-metacentric morphotype presented k_B above Mendelian ratio, indicating a possible accumulation mechanism (drive), while the B-acro and B-submetacentric variants presented k_B below Mendelian ratio, indicating that they were in extinction stage. When performing the chromosome painting technique, using B-specific probes obtained from each microdissected morphotypes, it was observed a homology between the B chromosome variants, indicating a common ancient variant origin. However, only the B-submetacentric chromosome probe (B_{sm}) showed signals at various centromeres of the standard A chromosomes complement, suggesting that this is the earliest variant which had an intraspecific origin from fragments of the pericentromeric and centromeric regions of A chromosomes.

1 Introdução

1.1 Características gerais do gênero *Prochilodus*, com ênfase em *Prochilodus lineatus*

Dentro da ordem Characiformes destacam-se peixes da família Prochilodontidae, os quais são considerados um dos componentes mais importantes para o comércio e a pesca de subsistência em ambientes de águas continentais na América do Sul, com exceção do Chile, onde estas espécies não são encontradas (Lowe-McConnell, 1975; Goulding, 1981; Vari, 1983). Segundo dados do Ministério de Pesca e Aquicultura (2011), peixes desta família possuem a maior produção de pescado proveniente da pesca extrativa continental, com 28.643t no ano de 2010. Desta forma, pode-se afirmar que são elementos de importante participação na produção de pescado do Brasil.

A sistemática da família Prochilodontidae é um tanto complexa devido à extraordinária estabilidade dos caracteres morfológicos e merísticos adotados para a distinção das diferentes espécies (Mago-Leccia, 1972). Esta homogeneidade dos caracteres taxonômicos pode ser explicada devido ao fato destas espécies estarem amplamente distribuídas ao longo das bacias hidrográficas da América do Sul, talvez por sua capacidade de efetuar longas migrações com propósito reprodutivo, dispersando, desta maneira, populações em grandes áreas (Mago-Leccia, 1972).

Todos os Prochilodontidae são iliófagos, possuindo assim algumas adaptações anatômicas como boca em forma de ventosa para succionar o lodo do fundo dos rios e retirar os detritos orgânicos. Apresentam tolerância ao ambiente em que vivem, tais como mudança de pH, estratificação de temperatura elevada e baixas concentrações de oxigênio (Mago-Leccia, 1972). Além disso, a família Prochilodontidae compreende espécies de tamanho variável alcançando mais de 50 centímetros de comprimento (Britski et al., 1988). As populações dos Prochilodontidae se alimentam de detritos, algas e microrganismos associados (Bowen, 1983; Bowen e Bonetto, 1984), e constituem um elo importante para a transferência de energia e biomassa em teias alimentares ribeirinhas (Winemiller, 1996). O ciclo de vida dos Prochilodontidae incluem conspícuas migrações reprodutivas sazonais e de alimentação (Barbarino Duque et al., 1998).

Castro e Vari (2004) mostraram que a família Prochilodontidae compreende 21 espécies distribuídas em três gêneros: *Ichthyoelephas* (2 espécies), *Prochilodus* (13

espécies) e *Semaprochilodus* (6 espécies). Peixes do gênero *Prochilodus* são considerados os mais conspícuos, abundantes e dispersos entre os peixes Neotropicais habitantes dos rios sul americanos os quais fluem para o Oceano Atlântico. Eles são migradores detritívoros que abastecem a atividade pesqueira em muitas partes do continente (Welcome, 1979).

O curimatá, *Prochilodus lineatus* (Valenciennes 1836), é considerado um peixe migrador por excelência e grandes cardumes realizam extensas migrações nos rios da bacia do Paraná, na época da piracema. Padrões migratórios em *P. lineatus* foram descritos na maior parte da bacia do rio Paraná com base em experimentos envolvendo a marcação e recaptura, biotelemetria, uso de *tags* de registo de dados e análise de tecidos rígidos, tais como os otólitos (Bayley, 1973; Lucas et al., 2001; Godinho e Kynard, 2006; Peixer e Petrere Júnior, 2009). Uma revisão dos dados de marcação e recaptura nesta espécie (Sverlij et al., 1993) sugere que possam ocorrer extensas migrações reprodutivas, sendo documentado exemplares recapturados em 1000 km de distância da localidade de marcação. Rotas migratórias mais curtas parecem ser mais prováveis, como indicado pela maioria das recapturas estarem contidas entre 50 e 500 km de distância a partir do local de marcação (Espinach Ros et al., 1990).

Prochilodus lineatus é a espécie de peixe mais abundante na bacia rio Paraná em termos de biomassa absoluta (Sverlij et al., 1993). São peixes de grande importância econômica devido à adaptação à criação e reprodução em cativeiro, o que torna esta espécie visada a programas de piscicultura. Diante disto, pesquisas relacionadas à reprodução induzida, manejo e técnicas de cultivo, alimentação e crescimento, têm sido realizadas nas últimas décadas.

É frequentemente encontrada na bacia do alto Paraná, envolvendo os rios Grande, Pardo e Mogi-Guaçu (Godoy, 1975). Embora sua ocorrência seja mais intensa durante a migração reprodutiva (outubro a março), exemplares desta espécie podem ser capturados praticamente o ano todo na Cachoeira de Emas, município de Pirassununga, São Paulo (Godoy, 1975).

1.2 Estudos citogenéticos no gênero *Prochilodus*

Estudos em ictiologia revelam um interesse crescente pela citogenética de peixes, devido à problemática taxonômica e filogenética que tem motivado grande parte das pesquisas da área neste grupo. Os primeiros estudos sobre a citogenética dos peixes

do gênero *Prochilodus* realizados por Pauls e Bertollo (1983, 1990) sugeriram a existência de uma homogeneidade dos caracteres cariotípicos básicos. Vários trabalhos na literatura mostraram que exemplares de *Prochilodus* analisados citogeneticamente continham um número diploide de 54 cromossomos dos tipos meta e submetacêntricos, com número fundamental igual a 108 (Pauls e Bertollo, 1983, 1990; Oliveira et al., 1997; Cavallaro et al., 2000; Jesus e Moreira-Filho, 2003; Artoni et al., 2006, Voltolin et al., 2009, 2013a). Diante disso, pode-se afirmar que a família Prochilodontidae parece apresentar uma evolução cromossômica predominantemente conservada (Pauls e Bertollo, 1990).

Alguns trabalhos descritos na literatura para o gênero *Prochilodus* relatam que a técnica de detecção da Região Organizadora de Nucléolo (NOR) por meio da impregnação por nitrato de prata, evidenciaram as Ag-NORs na região intersticial do braço longo de um par cromossômico metacêntrico de tamanho médio (Pauls e Bertollo, 1990; Maistro et al., 2000; Jesus e Moreira-Filho, 2003; Artoni et al., 2006; Vicari et al., 2006; Voltolin et al., 2013a). A Ag-NOR simples localizada intersticialmente é uma condição bastante comum encontrada nesse grupo, como nas espécies *Prochilodus brevis*, *Prochilodus argenteus*, *Prochilodus nigricans*, *Prochilodus costatus* (Pauls e Bertollo, 1990) e *Prochilodus mariae* (Oliveira et al., 2003).

Análises do bandamento C realizadas em preparações cromossômicas de indivíduos destas espécies evidenciaram a presença de heterocromatina constitutiva nas regiões pericentroméricas dos cromossomos A, no entanto, os cromossomos B dos indivíduos portadores apresentaram-se totalmente heterocromáticos (Pauls e Bertollo, 1990; Cavallaro et al., 2000; Jesus e Moreira-Filho, 2003; Voltolin et al., 2013a), embora tenha sido descrito a presença de blocos eucromáticos nos cromossomos supranumerários de exemplares de *P. lineatus* na bacia do rio Tibagi, Paraná (Artoni et al., 2006).

Uma interessante característica de algumas espécies do gênero *Prochilodus* é a abundante presença de microcromossomos B, que foram primeiramente descritos em *P. lineatus* por Pauls e Bertollo (1983).

1.3 Os cromossomos B

1.3.1 Aspectos Gerais

Os cromossomos B, também conhecidos como cromossomos supranumerários, são elementos extras presentes no genoma de várias espécies de diferentes grupos. Nas plantas, foram descritas a ocorrência de cromossomos B em 979 espécies de angiospermas, representando 8% das monocotiledôneas e 3% das dicotiledôneas (Levin et al., 2005). No reino animal os cromossomos B foram descritos em diversas espécies, com maior ocorrência em artrópodes, além de várias espécies de fungos (Mills e McCluskey, 1990; Miao et al., 1991 a, b; Tzeng et al., 1992; Gêiser et al., 1996; Leclair et al., 1996).

Uma possível definição para os cromossomos B, segundo Camacho et al., (2000), é que estes seriam cromossomos adicionais, dispensáveis, que estão presentes em alguns indivíduos de determinadas espécies e que provavelmente teriam surgido dos cromossomos A, porém não seguindo seu caminho evolutivo. A composição, função e especialmente a origem dos cromossomos B ainda são bastante controversas.

Em uma revisão recente sobre os cromossomos B, Houben et al. (2013) fizeram um estudo detalhado sobre as características destes elementos genômicos: são cromossomos adicionais ao conjunto normal de cromossomos. Apresentam herança não-Mendeliana e têm sido amplamente relatados em milhares de animais, plantas, fungos e outras espécies, mas ainda permanecem como um mistério evolutivo desde a sua primeira descoberta a mais de um século atrás. São encontrados em alguns indivíduos dentro de uma população e podem variar em número tanto inter quanto intra-individualmente. Diferentes tipos morfológicos de cromossomos B podem existir dentro de uma única espécie. Em algumas espécies a sua presença pode até mesmo ultrapassar o número dos cromossomos A. Inicialmente, os cromossomos B foram considerados como não-funcionais e sem quaisquer genes essenciais, pois eles são dispensáveis para crescimento normal e maioria dos Bs não conferem qualquer vantagem sobre os organismos que os contém, podendo ser pensados como parasitas ou elementos egoístas que persistem nas populações, fazendo uso da maquinaria celular necessária para a herança e a manutenção deste tipo cromossômico. Quando presentes em número reduzido, os supranumerários geralmente têm pouco ou nenhum impacto sobre os portadores. No entanto, aumento do número dos cromossomos B podem causar

diferenças fenotípicas e reduzir a fertilidade em alguns casos (Bougourd e Jones, 1997; Camacho et al., 2000; Jones e Houben, 2003; Camacho, 2005).

Os supranumerários têm despertado grande interesse na comunidade científica devido apresentarem, aparentemente, uma natureza dispensável e ainda persistirem em populações sem serem eliminados pela seleção natural (Carvalho et al., 2008). Apesar da ampla distribuição taxonômica dos cromossomos B, o conhecimento da origem, composição, regulação e mecanismos de acúmulo destes cromossomos foram limitados até muito recentemente. Devido aos avanços tecnológicos em sequenciamento e análise do genoma (Novak et al., 2010; Mayer et al. 2011), o conhecimento da biologia dos cromossomos B melhorou significativamente nos últimos anos.

1.3.2 Hipóteses sobre a origem dos cromossomos B

Existem muitas teorias sobre a suposta origem dos cromossomos B. Duas hipóteses gerais têm sido propostas para elucidar tal origem. Na primeira, hipótese de origem intraespecífica (Camacho et al., 2000; Teruel et al., 2009), os cromossomos B surgiram do complemento padrão A, porém seguiram um caminho evolutivo independente. Uma evidência que favorece esta hipótese foi obtida por Keyl e Hägele (1971) quando demonstraram que os padrões de bandamentos nos cromossomos B do mosquito *Chironomus plumosus* eram similares a encontrada próxima ao centrômero do quarto par cromossômico autossômico.

No entanto, variáveis da teoria intraespecífica obtiveram um enorme embasamento nos estudos de cromossomos B em peixes. Mestriner et al. (2000), Jesus et al. (2003) e Artoni et al. (2006) sugeriram a origem dos cromossomos B por isocromossomos. Mestriner et al. (2000) ao estudarem a espécie *Astyanax scabripinnis* detectaram por meio da sonda As51 a presença de sequências repetitivas em ambos os braços do cromossomo B, de modo semelhante ao par 24 do conjunto cromossômico (A) mostrando, desta forma, argumentos favoráveis da origem do cromossomo B em um processo de formação de um isocromossomo.

Uma segunda hipótese, da origem interespecífica (Schartl et al., 1995; Camacho et al., 2000; Perfectti e Werren, 2001), os cromossomos B surgiram a partir de acasalamentos interespecíficos entre espécies relacionadas pelo processo de hibridização. A origem do cromossomo B como decorrência de processo de hibridização foi comprovada por Perfectti e Werren (2001) ao observarem a presença de

cromossomos supranumerários em uma linhagem de vespas do gênero *Nasonia* obtida a partir do cruzamento entre duas espécies diferentes, *Nasonia vitripennis* e *Nasonia giraulti*.

Os cromossomos sexuais também têm sido previamente propostos como ancestrais dos cromossomos B (Yoshida et al., 2011). Entretanto, diferentes hipóteses sobre a origem dos cromossomos B têm surgido, em decorrência do conhecimento da estrutura molecular dos fragmentos livres de DNA de origem não cromossômica, comumente encontrados nos núcleos das células. A hipótese de que os segmentos genômicos supranumerários tenham surgido a partir destes fragmentos, num modelo de desenvolvimento independente, não pode ser descartada (Foresti, 1998). Diante disso, pode-se afirmar que os cromossomos supranumerários parecem não apresentar um modelo de origem único, mas ao contrário, podem ter se originado, de modo independente, por vários caminhos evolutivos (Jesus et al., 2003).

1.3.3 Aspectos morfológicos, funcionais e estruturais dos cromossomos B

Uma nomenclatura sobre a morfologia dos cromossomos B que vem persistindo ao longo do tempo, foi proposta por Volobujev (1981), onde os cromossomos B podem ser classificados em três categorias de acordo com seu tamanho em relação aos cromossomos A. O *primeiro grupo* consiste de cromossomos B cujo tamanho é menor do que os menores cromossomos do complemento normal A, o *segundo grupo* consiste de cromossomos B equivalentes em tamanho ao dos menores cromossomos do complemento padrão A e no *terceiro grupo*, os cromossomos supranumerários podem ser maiores que os maiores cromossomos do complemento A.

Na maioria das espécies portadoras de cromossomos B, a transmissão mitótica durante o crescimento e desenvolvimento é normal, por isso todas as células têm o mesmo número de Bs dentro do indivíduo (Houben et al., 2013). No entanto, há algumas exceções em que os supranumerários mostram instabilidade mitótica e, portanto, eles estão presentes em número variável, às vezes em tecidos específicos e/ou órgãos (Houben et al., 2013). Por exemplo, na grama *Aegilops speltoides* e *Aegilops mutica*, os cromossomos B são encontrados na parte aérea, mas não nas raízes (Mendelson e Zohary, 1972; Ohta, 1996). Em gafanhotos, a ocorrência da variação dos Bs foi observada especificamente entre os folículos dos testículos (Nur, 1969).

Polimorfismo dos cromossomos B são frequentes e esperados entre as populações devido à natureza não essencial deste tipo cromossômico. Entretanto, além dos polimorfismos numéricos, há vários casos de polimorfismos estruturais dos supranumerários, onde já foram relatados em plantas, por exemplo, *Brachycome dichromosomatica* (Houben et al., 1999), *Scilla autumnalis* (Parker et al., 1991), *Allium schoenoprasum* (Bougourd e Parker, 1979) e *Aegilops speltoides* (Belyayev e Raskina, 2013), e em animais, incluindo os gafanhotos *Eyprepocnemis plorans* (Bakkali et al., 1999).

Com relação a estudos envolvendo a frequência de diferentes tipos de cromossomos B, podemos citar Borisov et al. (2012), que ao estudarem a frequência dos supranumerários no camundongo *Apodemus peninsulae* de cinco populações na Mongólia, relataram uma estabilidade ao longo de 30 anos. Os cromossomos B desta espécie se dividem em quatro morfotipos, podendo ser encontrados nas formas: médio biarmado, pequeno biarmado, pequeno acrocêntrico e em forma de ponto. Além disso, estes autores puderam caracterizar cada população de acordo com as frequências das variantes de B em cinco localidades diferentes.

A maioria do genoma dos eucariotos não codificam proteínas e são compostos pelos chamados DNA "não-codificantes". Por que a evolução manteve grandes quantidades de DNA "inútil" permaneceu um mistério por muitos anos. Entretanto, os resultados obtidos no projeto ENCODE indicam que a maioria do DNA presumido "inútil" é funcional e está envolvido em complexas redes reguladoras (Houben et al., 2013). Além disso, a transcrição generalizada a partir de DNAs não codificantes atuam potencialmente como um reservatório para a criação de novas moléculas funcionais (Pennisi, 2012). Os cromossomos B representam um extraordinário exemplo de DNA adicional, aparentemente inerte, pois não contêm informações genéticas consideradas vitais para a sobrevivência dos organismos portadores. São considerados cromossomos dispensáveis e podem ocasionar um impacto neutro ou levemente negativo (Puertas, 2002; Jones e Houben, 2003), em sua maioria são altamente heterocromáticos, refletindo uma natureza pobre em genes ativos (Han et al., 2007).

Entretanto, quando ativos, podem afetar características quantitativas para os indivíduos portadores, especialmente associadas com o vigor, sobrevivência, fecundidade e fertilidade (Camacho et al., 2000). Estes efeitos são frequentemente deletérios, embora existam alguns exemplos de cromossomos B com efeitos benéficos quando presentes em pequeno número (Jones e Rees, 1982).

Alguns efeitos dos cromossomos B parecem ser atribuídos diretamente ao produto de seus genes, como no caso de genes que controlam a resistência para ferrugem nos cromossomos B de *Avena sativa* (Dherawattana e Sadanaga, 1973) e genes que conferem a resistência a antibióticos em cromossomos B do fungo *Nectria haematococca*, favorecendo esta patogenicidade (Miao et al., 1991a). Estes exemplos indicam que nem todos os cromossomos B são geneticamente inativos. Entretanto, mais informações tornam-se necessárias para alicerçar a opinião mais aceita de que a maioria dos cromossomos B não apresenta um grande número de genes ativos (Camacho et al., 2000). Apesar do aumento das informações disponíveis sobre a morfologia, herança, estrutura e outros aspectos dos cromossomos B, a exata origem e significância funcional destes elementos genômicos ainda permanece desconhecida.

1.3.4 Manutenção dos cromossomos B nas populações portadoras

Dois modelos são propostos para explicar a manutenção dos B em populações naturais: o modelo heterótico e o modelo parasítico. De acordo com o modelo heterótico, proposto por White (1973), os cromossomos B seriam mantidos graças às vantagens adaptativas que conferem aos seus portadores quando se encontram em números baixos. Já o modelo parasítico, é discutido por vários autores (Östergren, 1945; Nur, 1966 a, b; Nur, 1977; Jones, 1985; Shaw e Hewitt, 1990), que consideram que os cromossomos B permanecem nas populações em razão de seus próprios meios de acúmulo. Nesta segunda hipótese, esses cromossomos se apresentariam como elementos parasitas, uma vez que sua presença não traria vantagem aos seus portadores.

A dinâmica evolutiva dos cromossomos B parasitas parece ser caracterizada por rápidas invasões em virtude do acúmulo, seguida pela neutralização por meio da evolução de genes supressores presentes nos cromossomos A, os quais eliminam os efeitos do acúmulo de B (Camacho et al., 1997). No modelo proposto por estes autores, o acúmulo de cromossomos B pode proporcionar um marcante aumento da frequência, em uma determinada população, em apenas 10 gerações.

O acúmulo dos cromossomos B nas populações portadoras depende de duas importantes propriedades, definidas como o efeito no genoma hospedeiro e seu padrão de transmissão (Camacho et al., 2000). Vários efeitos são teoricamente possíveis diante da interação destas duas propriedades. Diante disso, pode-se inferir que a origem dos cromossomos B relaciona-se aos mecanismos de acumulação, juntamente com a sua

proliferação, e somente pode ser explicada em termos de efeitos benéficos proporcionados à população hospedeira. Estas são as formas pelas quais estes cromossomos podem aumentar sua frequência e estabelecer polimorfismos na população natural.

O comportamento meiótico irregular pode auxiliar na fixação dos cromossomos B. Entretanto, se o padrão de transmissão estiver abaixo da expectativa mendeliana, estes são destinados à extinção por meio de forças ao acaso (Camacho et al., 2000). Segundo Zurita et al. (1998) e Camacho et al. (2000), o ciclo de vida dos cromossomos B nas populações portadoras compreende em três fases: invasão, neutralização e extinção. Na fase neutra os supranumerários devem sofrer grandes mutações em suas sequências de DNA para, novamente, reiniciar seu ciclo, caso contrário estarão destinados à extinção, conseqüentemente, desaparecendo da população (Figura 1).

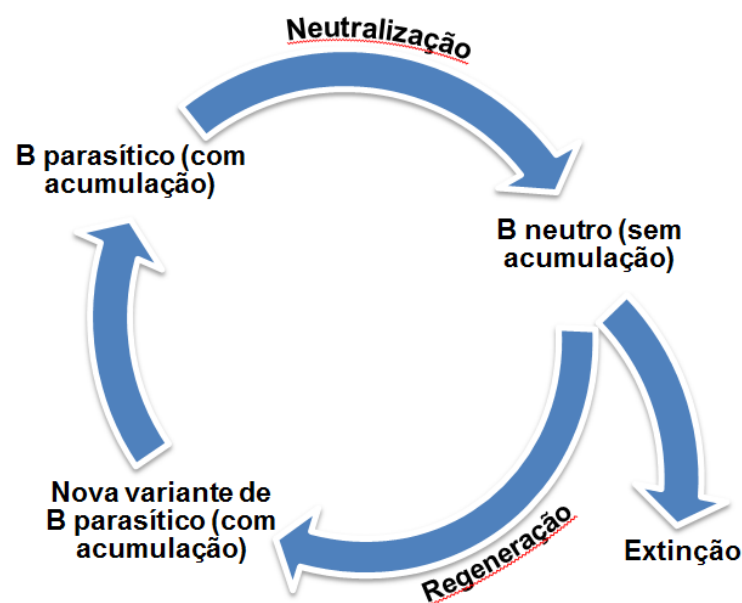


Figura 1. Ciclo evolutivo dos cromossomos B parasíticos, proposto por Camacho et al. (2000).

Um exemplo clássico do surgimento de novas variantes de cromossomos B foi registrado na população de gafanhoto *Eyprepocnemis plorans*, onde os cromossomos B desta espécie são considerados bastante mutáveis (Camacho et al., 1997; Cabrero et al. 2013). Diferentes tipos de supranumerários foram descritos em ocasião da translocação entre os cromossomos A e B (Henriques-Gil et al., 1984; Henriques-Gil e Arana, 1990) e a frequente geração de uma nova variante de B (López-León et al., 1994) indica que o polimorfismo é muito dinâmico nas populações portadoras. Cada variante de

cromossomo B apresenta um acúmulo de sua frequência, aumentando a média do número de B por indivíduo (Camacho et al., 1997).

1.3.5 Herança dos cromossomos B

O controle genético e padrão de transmissão dos cromossomos B têm sido demonstrados em algumas espécies de animais como no gafanhoto *Myrmeleotettix maculatus* (Shaw e Hewitt, 1985; Shaw et al., 1985), no bicho da farinha *Pseudococcus affinis*, (Nur e Brett, 1987, 1988), no gafanhoto *Eyprepocnemis plorans* (Herrera et al., 1996) e em algumas plantas como, *Hypochoeris maculata* (Parker et al., 1982); *Aegilops speltoides* (Cebriá et al., 1994) e *Allium schoenoprasum* (Bougourd e Plowman, 1996).

Entretanto, estudos concernentes à herança dos cromossomos supranumerários em espécies de peixes portadores ainda são escassos. Este processo já foi identificado em peixes como uma demonstração da herança paternal ginogenética na espécie *Poecilia formosa* (Schartl et al., 1995). Posteriormente, Oliveira et al. (1997) e Voltolin et al. (2010c) realizaram estudos sobre o mecanismo de herança dos cromossomos B em *P. lineatus* e verificaram que o padrão de transmissão destes cromossomos foi consistente com a expectativa do comportamento regular meiótico dos cromossomos B em ambos os sexos, demonstrando uma taxa de transmissão Mendeliana (0,5). Penitente et al. (2013) observaram um padrão de transmissão diferente para cada variante de cromossomo B encontrado em *P. lineatus*, sendo que os tipos B-metacêntrico e B-submetacêntrico apresentaram taxa Mendeliana e o tipo B-acrocêntrico com padrão de transmissão negativo, indicando uma possível extinção deste morfotipo da população natural do rio Mogi-Guaçu.

Araújo et al. (2002) ao estudarem a transmissão dos tipos de cromossomos B presentes em populações de *Trypoxylon albitarse*, puderam constatar que o tipo metacêntrico estava prevalecendo sobre o tipo acrocêntrico, devido ao tipo metacêntrico ter uma maior eficiência de transmissão em relação ao tipo acrocêntrico.

Estudos envolvendo o processo de herança quanto à frequência dos supranumerários têm sido realizados em diversos organismos portadores, no entanto, pouco se sabe sobre a herança e segregação meiótica dos diferentes tipos de cromossomos B nos indivíduos portadores, principalmente em peixes.

1.3.6 Cromossomos B em peixes

Uma das primeiras descrições de supranumerários com características pertinentes aos cromossomos B em peixes da região Neotropical refere-se aos cromossomos adicionais encontrados em *Prochilodus lineatus*, por Pauls e Bertollo (1983). Entretanto, muitas outras espécies de peixes de diferentes gêneros e ordens têm apresentado cromossomos supranumerários em seus cariótipos (Moreira-Filho et al., 2001; Carvalho et al., 2008; Hashimoto et al., 2008; Pansonato-Alves et al., 2011; Mendes et al., 2012). Uma recente revisão de cromossomos B em peixes neotropicais (Penitente et al., in prep.) relatou a ocorrência em 56 espécies, sendo os Characiformes e Siluriformes as ordens mais representativas.

A ocorrência de cromossomos B entre os indivíduos de uma população pode ser esporádica, ou ser comumente encontrada para muitas espécies, podendo mostrar uma alta variação na frequência, tanto intra quanto interindividualmente. É possível encontrar também variações em relação à morfologia, tamanho e número desses supranumerários (Pauls e Bertollo, 1983, 1990; Oliveira et al., 1997; Venere et al., 1999; Cavallaro et al., 2000; Fernandes e Martins-Santos, 2005; Artoni et al., 2006, Penitente et al., 2013).

Com relação ao tamanho, os cromossomos supranumerários encontrados em peixes exibem uma notável variação, ou seja, existe a ocorrência de macrocromossomos como nas espécies do gênero *Astyanax* (Maistro et al., 1992; Salvador e Moreira-Filho, 1992; Vicente et al., 1996; Moreira-Filho et al., 2001; Ferro et al., 2003; Hashimoto et al., 2008); cromossomos supranumerários de tamanho médio, como em *Rhamdia* (Fenocchio e Bertollo, 1990; Fenocchio et al., 2000) ou microcromossomos, como em *Prochilodus* (Pauls e Bertollo, 1983, 1990; Venere et al., 1999; Cavallaro et al., 2000; Oliveira et al., 2003; Penitente et al., 2013; Voltolin et al., 2013a, b).

Os cromossomos B também podem variar em número nas espécies de peixes portadoras. A espécie *Moenkhausia sanctaefilomenae* apresenta uma grande variação intra e interindividual de zero a oito microcromossomos B (Foresti et al., 1989; Hashimoto et al., 2012). Oliveira e Foresti (1993) também descreveram a ocorrência de até dois microcromossomos metacêntricos adicionais em *Steindachnerina insculpta* (Curimatidae).

Em espécies do gênero *Astyanax*, também foram encontradas diversas variações quanto ao número e morfologia dos cromossomos supranumerários, os quais têm sido

estudados intensamente nos últimos anos, desde as investigações iniciais de Salvador e Moreira-Filho (1992) e Maistro et al. (1992) em *Astyanax scabripinnis*, até estudos mais recentes sobre a composição do DNA e estrutura destes elementos extras na espécie *Astyanax bockmanni*, utilizando técnicas de microdissecção e pintura cromossômica (Daniel et al., 2012; Silva et al., 2013).

1.3.7 Estrutura dos cromossomos B em peixes

Pouco se sabe sobre a composição molecular do DNA satélite presente especificamente nos cromossomos supranumerários de peixes (Jesus et al., 2003). Com o advento da técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) juntamente com a microdissecção, várias sondas cromossômicas vêm sendo produzidas com o intuito de proporcionar um melhor entendimento sobre questões evolutivas, filogenéticas e estruturais, entre outras, no estudo de peixes neotropicais.

Mestriner et al. (2000), ao estudarem a composição do DNA dos cromossomos B de *Astyanax scabripinnis*, por meio da utilização da sonda As51 obtida por enzima de restrição, detectaram homologia entre o cromossomo B e o par 24 do conjunto cromossômico A, sugerindo uma origem intraespecífica do cromossomo B por isocromossomo.

Maistro et al. (2000) usando a enzima de restrição *Bam*HI, observaram a existência de diferentes classes de DNA altamente repetitivas nos genoma de *Prochilodus lineatus* e também mostraram que a composição dos cromossomos B é diferente daquela do seu conjunto autossômico. Isto indica que a existência de diferentes composições de DNA entre eles poderia mostrar que a origem dos cromossomos B em *P. lineatus* não seria um evento recente, apresentando um tempo suficiente para a acumulação de algumas modificações na sua estrutura durante seu processo evolutivo (Maistro et al., 2000).

Jesus et al. (2003) também estudaram a estrutura e origem dos microcromossomos B de exemplares de *P. lineatus* provenientes do rio Mogi-Guaçu, Pirassununga, SP, utilizando a enzima de restrição *Hind*III. Após a técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com o emprego das sondas SATH1 e SATH2 obtidas pela digestão enzimática, demonstraram que o DNA satélite SATH1 é compartilhado entre os cromossomos A e B desta espécie, embora nem todos os segmentos heterocromáticos dos cromossomos B sejam compostos por DNA SATH1,

indicando que outras famílias de DNA repetitivo possam estar presentes nestes cromossomos.

A microdissecção cromossômica é considerada uma excelente ferramenta no estudo da estrutura e composição cromossômica e, recentemente, tem sido empregada no estudo da origem dos cromossomos supranumerários em peixes. Dentre diversos trabalhos pode-se destacar os estudos realizados por Voltolin et al. (2010a, 2013b). Estes autores isolaram o cromossomo B de um indivíduo portador de apenas um supranumerário e, por meio da técnica de hibridação *in situ* fluorescente, observaram marcações apenas nos cromossomos B de *P. lineatus* em diferentes frequências e com diferentes graus de homologia. Diante disso, puderam concluir que a suposta origem do cromossomo B nesta espécie poderia estar associada a uma origem interespecífica. Entretanto, os autores não descartam a hipótese de uma possível origem intraespecífica, onde os supranumerários não apresentam mais homologia com os cromossomos A devido ao excesso de mutação que estes elementos extras podem ter sofrido ao longo dos anos, conforme já mencionado por Maistro et al. (2000).

Portanto, um estudo pormenorizado sobre os três diferentes tipos de cromossomos B já descritos para *Prochilodus lineatus* por meio da construção e utilização de sondas específicas no estudo da origem dos supranumerários para esta espécie torna-se de extrema importância.

1.3.8 Cromossomos B em *Prochilodus*, com ênfase em *Prochilodus lineatus*

Vários estudos (Pauls e Bertollo, 1990; Oliveira et al., 1997; Cavallaro et al., 2000; Jesus et al., 2003, Voltolin et al., 2010a, 2013a, 2013b) têm mostrado que a espécie *Prochilodus lineatus* é um dos modelos de peixe Neotropical mais utilizado para estudos concernentes a origem, comportamento e evolução dos cromossomos B. Apesar da alta diversidade quanto à morfologia, frequência e distribuição dos DNA satélites, são sempre heterocromáticos e menores em relação aos cromossomos do complemento padrão A (Jesus et al., 2003; Artoni et al., 2006).

Em *P. lineatus*, os cromossomos B apresentam um tamanho reduzido, podendo ser classificados como microcromossomos (Pauls e Bertollo, 1983, 1990; Venere et al., 1999; Cavallaro et al., 2000; Oliveira et al., 2003). Entre os exemplares capturados em diferentes localidades, foi constatada uma variação modal de cromossomos

supranumerários; contudo, em todas as populações analisadas, o número desses cromossomos está contido entre os valores de zero a nove (Voltolin et al., 2011).

Em outro estudo realizado com exemplares do rio Mogi-Guaçu, foi demonstrado que esse número não é estável, sendo observada uma variação para números maiores ao longo do tempo, a partir das primeiras observações realizadas naquele ambiente (Pauls e Bertollo, 1983). No entanto, vários autores (Cavallaro et al., 2000; Oliveira et al., 1997; Voltolin et al., 2010b) detectaram uma estabilidade mitótica na frequência de cromossomos B na população natural de *P. lineatus* do rio Mogi-Guaçu onde foi constatado um número modal de 2 a 3 supranumerários.

Microcromossomos B também foram identificados na espécie *Prochilodus brevis* (= *Prochilodus cearensis*) por Pauls e Bertollo (1990). Além de apresentar todas as características dos cromossomos B de *P. lineatus*, a espécie *P. brevis* apresentou uma variação de até dois microcromossomos B. Venere et al. (1999) descreveram a ocorrência de cromossomos B na espécie *Prochilodus nigricans* coletados no rio Araguaia, sendo que um entre três exemplares analisados apresentou dois cromossomos B, os quais foram considerados totalmente heterocromáticos após o bandamento C. Estudos realizados por Oliveira et al. (2003) identificaram a presença de até três cromossomos supranumerários na espécie *Prochilodus mariae* provenientes da bacia do rio Orinoco, na Venezuela.

Na literatura existem muitos estudos que descrevem a variação da frequência dos microcromossomos B em *Prochilodus*, no entanto, Artoni et al. (2006) e Penitente et al. (2013), ao estudarem exemplares de *P. lineatus* provenientes do rio Mogi-Guaçu evidenciaram a presença de três tipos de microcromossomos supranumerários, podendo ser classificados como B-metacêntrico, B-submetacêntrico e B-acrocêntricos, sendo o tipo metacêntrico o mais frequente. Além disso, estes microcromossomos B se diferem em tamanho, sendo o tipo B-submetacêntrico o maior, B-metacêntrico o de tamanho médio e o morfotipo B-acrocêntrico o menor dentre as variantes.

Considerando que a função, herança e efeito da presença dos cromossomos B nos animais e plantas ainda são controversos, estudos envolvendo levantamentos populacionais sobre a frequência das três variantes de microcromossomos B encontrados em populações naturais de *P. lineatus*, bem como a realização de cruzamentos controlados e análise de sua estrutura cromossômica por meio da construção e utilização de sondas B-específicas tornam-se necessários para complementar as informações já disponíveis e contribuir para um melhor entendimento dos cromossomos B desta espécie.

1.4 Objetivos

A ocorrência de cromossomos supranumerários em *Prochilodus lineatus* torna esses animais um alvo de interesse no desenvolvimento de diversos estudos citogenéticos. Diante disso, os objetivos deste trabalho visaram à realização de análises quanto à herança, estrutura e possível origem destes elementos genômicos. Portanto, o presente trabalho teve como objetivos:

- 1) Realizar cruzamentos dirigidos entre exemplares de *P. lineatus*, para um melhor entendimento sobre o controle e padrão de transmissão dos supranumerários nesta espécie;
- 2) analisar o número e tipo de cromossomos B dos indivíduos da geração F₁ resultantes dos cruzamentos dirigidos, no intuito de determinar o mecanismo de herança das variantes de cromossomos supranumerários nesta espécie;
- 3) realizar um levantamento das frequências dos morfotipos de cromossomos B na população natural de *P. lineatus* do rio Mogi-Guaçu;
- 4) obter sondas B-específicas de cada variante de supranumerário, por meio da técnica de microdissecção cromossômica em exemplares de *P. lineatus*;
- 5) utilizar as sondas B-específicas por meio da técnica de hibridação *in situ*, com o intuito de buscar homologias entre os supranumerários e os cromossomos A, estabelecendo, desta forma, relações sobre a origem e evolução dos cromossomos B nesta espécie;
- 6) contribuir com informações sobre a origem, manutenção e herança dos cromossomos supranumerários em *P. lineatus* e, de modo mais amplo, nos peixes.

4 Considerações finais

Muitos trabalhos envolvendo cromossomos B foram realizados, tentando elucidar sua origem, função e manutenção nas espécies portadoras. Estes elementos genômicos intrigam os pesquisadores por que aparentemente apresentam material genético dispensável, porém ainda persistem em diversos grupos de animais. Além disso, apresentam mecanismos de acúmulo e caminhos evolutivos distintos dos cromossomos do complemento padrão A. Nos últimos anos houve um aumento significativo em estudos envolvendo os cromossomos B, mas ainda muito pouco se sabe sobre eles, principalmente pelo fato de que o número de características comuns a todos eles é limitada.

Os peixes têm se destacado em estudos envolvendo cromossomos supranumerários, devido a descobertas de espécies portadoras e a grande variabilidade, seja morfológica ou numérica, destes elementos nas espécies portadoras. No entanto, muitos estudos tem buscado atribuir uma função, investigar a estrutura, origem e transmissão desses elementos, mas o conhecimento sobre o DNA que compõe a estrutura molecular e estrutural dos cromossomos B em peixes ainda pode ser considerado bastante restrito.

No presente trabalho, os dados obtidos a partir da análise da frequência e do padrão de transmissão destes supranumerários, obtidos a partir de cruzamentos controlados, indicam que estes cromossomos B estão sujeitos à seleção para permanecerem no genoma desta espécie, de modo parasítico, utilizando-se de mecanismos de acúmulo e o padrão de transmissão para se fixarem na população ao longo de gerações. Além disso, foi possível observar que a variante B-metacêntrica se encontra mais frequente na população natural e o padrão de transmissão mostrou-se mais eficiente com relação as demais variantes, ou seja, acima da taxa Mendeliana ($k_B=0.500$). Já os tipos B-acro e B-submetacêntrico se encontram com menor frequência, sendo o tipo B-acro com rara incidência na população e ambos com padrão de transmissão abaixo da taxa Mendeliana.

Estes resultados indicam uma possível extinção das variantes B-acrocêntrica e B-submetacêntrica da população do rio Mogi-Guaçu ao longo das gerações. No entanto, podemos observar que os microcromossomos B em *P. lineatus* são bastante mutáveis, podendo levar a ocorrência de mutações na estrutura destes tipos supranumerários para que possam surgir como uma nova variante na população, mesmo sem ocorrer

alterações morfológicas visíveis e reiniciar o ciclo evolutivo, aumentar desta forma o padrão de transmissão e permitir novamente a ocorrência de mecanismos de acúmulo para que perpetuem na população do rio Mogi-Guaçu.

Além disso, a realização de estudos envolvendo microdissecção cromossômica, hibridação *in situ* fluorescente e obtenção do padrão de transmissão dos cromossomos B forneceram informações sobre a manutenção e uma possível origem para os cromossomos supranumerários na espécie *Prochilodus lineatus*, a qual é uma das pioneiras no estudo destes elementos extras em peixes neotropicais.

Os resultados obtidos pela pintura cromossômica, utilizando as sondas obtidas a partir das três variantes de cromossomos B microdissecados de *P. lineatus* apontaram uma variante de B- ancestral comum entre elas, devido apresentarem homologia nas sequências de DNA. Além disso, a sonda B_{sm} mostrou sinais em centrômeros de vários cromossomos do complemento padrão A, o que pode indicar uma origem intraespecífica a partir de uma possível amplificação ou quebra de regiões pericentroméricas ou centroméricas dos cromossomos A.