



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – RIO CLARO
Departamento de Biologia



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**ANÁLISE DA VARIABILIDADE CARIOTÍPICA E DO
COMPORTAMENTO DOS CROMOSSOMOS NA MEIOSE DE
ESCORPIÕES DO SUBGÊNERO *TITYUS* (*ARCHEOTITYUS*)
(BUTHIDAE)**

VIVIANE FAGUNDES DE MATTOS



Rio Claro, São Paulo, Brasil

Junho de 2017



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – RIO CLARO
Departamento de Biologia



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**ANÁLISE DA VARIABILIDADE CARIOTÍPICA E DO
COMPORTAMENTO DOS CROMOSSOMOS NA MEIOSE DE
ESCORPIÕES DO SUBGÊNERO *TITYUS* (*ARCHAEOTITYUS*)
(BUTHIDAE)**

VIVIANE FAGUNDES DE MATTOS

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Rio Claro, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

Orientadora: Profa. Dra. Marielle Cristina Schneider

Rio Claro, São Paulo, Brasil

Junho de 2017

591.15 Mattos, Viviane Fagundes de
M444a Análise da variabilidade cariotípica e do comportamento dos
 cromossomos na meiose de escorpiões do subgênero Tityus
 (Archaeotityus) (Buthidae) / Viviane Fagundes de Mattos. - Rio Claro,
 2017
 133 f. : il., figs., tabs., mapas

 Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de
 Biociências de Rio Claro
 Orientador: Marielle Cristina Schneider

 1. Genética animal. 2. Citogenética animal. 3. Cadeia cromossômica.
 4. Cromossomos holocêntricos. 5. Meiose aquiasmática. 6. Número
 diploide. 7. Rearranjo cromossômico. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Análise da variabilidade cariotípica e do comportamento dos cromossomos na meiose de escorpiões do subgênero *Tityus* (Archaeotityus) (Buthidae)

AUTORA: VIVIANE FAGUNDES DE MATTOS

ORIENTADORA: MARIELLE CRISTINA SCHNEIDER

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:

Marielle C. Schneider

Profa. Dra. MARIELLE CRISTINA SCHNEIDER
Departamento de Ciências Biológicas / Universidade Federal de São Paulo

Douglas de Araujo

Prof. Dr. DOUGLAS DE ARAUJO
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde / Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul

Vanessa Bellini Bardella

Profa. Dra. VANESSA BELLINI BARDELLA
Pós Doutorado do Departamento de Biologia / Instituto de Biociências de Rio Claro

Ana Moraes

Profa. Dra. ANA PAULA DE MORAES
Campus São José dos Campos / Universidade Federal de São Paulo

Simone Lilian Gruber

Profa. Dra. SIMONE LILIAN GRUBER
x / x

Rio Claro, 11 de julho de 2017

*Dedico este trabalho ao sentido maior da
minha vida, meus pais Anizia R. O.
Fagundes, Lourenço F. Mattos e meu
irmão Guilherme F. Mattos.*

AGRADECIMENTOS

Talvez escrever os agradecimentos seja um dos momentos mais difíceis da tese. Primeiro porque me faltam palavras para expressar tamanha gratidão a todas as pessoas que me acompanharam nesta jornada. Segundo, porque é como se passasse um filme pela minha cabeça, me fazendo lembrar todos os momentos vividos até agora, momentos por vezes alegres e divertidos, outros não tão agradáveis, compreendidos por angústias e incertezas. Todos estes momentos foram compartilhados com pessoas especiais com as quais tive a oportunidade de conviver ao longo desses quatro anos. Quatro anos intensos e carregados de emoções. Assim, com lágrimas nos olhos gostaria de agradecer de forma especial:

A Deus!

A minha orientadora, Profa. Dra. Marielle C. Schneider, pela paciência, ah e haja paciência! É fato que tivemos nossos desentendimentos durante o percurso, mas ela com ternura e um pouco de teimosia soube cumprir o seu papel como orientadora. E em alguns momentos até mais do que isso, como amiga. Cativa a todos com sua ternura e forma de ser, porque faz o seu trabalho com amor. Não é a toa que o Lab 23 é o laboratório mais invejado do Eldorado (UNIFESP, Diadema), o qual todos os alunos querem fazer parte. Ah, peço desculpa pelas minhas falhas! Obrigada por tudo!

A Prof. Dra. Doralice M. Cella (*in memoriam*) uma das maiores inspiradoras disso tudo. Se foi tão cedo, tivemos tão pouco tempo... Entretanto, seu exemplo pessoal e profissional, seu sorriso, ficará para sempre em minha memória.

Ao Prof. Dr. Douglas de Araujo pelo auxílio com as coletas de *Tityus paraguayensis* da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Adicionalmente, agradeço por me orientar com os primeiros passos na citogenética.

A Prof. Dra. Zaira da Rosa Guterres pela generosidade e conselhos sábios.

Aos meus colaboradores, Leonardo S. Carvalho e Marcos A. Carvalho, pelo auxílio em coletas e identificação taxonômica dos exemplares estudados.

Ao corpo docente do Departamento de Biologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Rio Claro.

Ao corpo docente do Lab 23 da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, Diadema.

A dona Edite Schneider pelas conversas, passeios e cervejinhas. Saudades!

A Amália T. L. Coelho pela amizade, companheirismo, e discussão crítica a cerca dos relatórios científicos iniciais. Pelo apoio nos momentos de crise e dúvidas.

Aos amigos do Lab 23 (UNIFESP, Diadema), Adriana C. A. Murcia, Crislaine V. Ubinski, Juliana F. Lima, Marcel F. Neves e Renata C. S. Costa, pela convivência do dia-a-dia, discussões pessoais e científicas, pelos cafés, pastéis e tapiocas além das nossas festinhas e danças no laboratório. Adicionalmente agradeço, pela amizade extra universidade a qual foi muito importante para a minha adaptação à Diadema, SP.

A Beatriz Raicoski que rapidamente entrou para a família Lab 23, agradeço pela sinceridade e pelas terapias de boteco.

Aos amigos do Lab 22 (UNIFESP, Diadema), Myrcea A. S. Tilger, Raquel F. Silva e Renan B. Gaiardo, agradeço pelos almoços, conversas descontraídas, cafés e principalmente por me apresentarem aos Selvagens a Procura de Lei. Vai Selvagens!

Aos amigos do Lab 15 (UNIFESP, Diadema), Daniela H. Maggio, Dylan J. P. Pérez, Juliete O. Costa e Vítor F. Oliveira, agradeço pela amizade, discussões científicas, pelos cafés e festinhas.

Aos meus amigos do laboratório de citogenética (UNESP, Rio Claro), Allison K. Anjos, Tatiana G. Pinheiro, Rafael S. Borba e Simone L. Gruber, agradeço por todo apoio, amizade e risos.

As minhas amigas biólogas Crislaine X. Silva e Genandrea K. Cruz, por ouvirem as minhas lamentações e darem palavras de apoio, e claro, dar aquele sermão quando necessário.

Ao meu amigo Fábio H. Fernandes, por sempre dizer as palavras certas no momento certo, agradeço por me acompanhar nesta etapa dando palavras de apoio e esperança, enfim, por ser uma pessoa tão serena.

Aos meus amigos de república estudantil, Thais B. Silva, Denis A. Ribeiro e Thiago A. Martins agradeço pela amizade, companhia, discussões, pelos risos, por todo amor. A meu ver o término da república tornou a nossa amizade mais forte. Amo vocês demais!

A dona Terezinha Bernardi e seu Roberto C. Galácio por me receberem por cerca de um ano em sua pensão estudantil. Obrigada pela acolhida!

A minha amiga, *roommate*, Gislaine S. Martins, a melhor fonoaudióloga do Brasil! Hahaha! Agradeço pela amizade, pela cumplicidade, pelo seu riso e energia contagiante, por me ajudar a ser forte quando estou longe do meu porto seguro (família).

A minha amiga e professora de inglês, Elsie C. B. Cruz agradeço por todo amor, pelas palavras de amizade, de esperança, pela sua alegria e caráter inestimável. Obrigada por me acolher como parte da sua família, ah, inclui-se toda a família Cruz neste trecho. Família linda e abençoada! Amo vocês!

Ao meu terapeuta João Burnier que tem me acompanhado nesses últimos oito meses. Agradeço por ajudar a me encontrar com o meu eu interior na busca do autoconhecimento. Agradeço por me ajudar a respirar quando parecia que o ar ia acabar. Enfim, sem palavras para agradecer, afinal, sabe né, não sou de falar muito, isso ainda é um processo, hahaha. Obrigada!

A família Heleodoro, Cristina R. S. Heleodoro, Agnaldo J. H. Arruda, João R. S. Heleodoro e Agnaldo J. H. Arruja Jr, por literalmente me adotarem, muito obrigada pela amizade família!

Aos meus pais, Anizia R. de O. Fagundes, Lourenço F. Mattos, ao meu irmão, Guilherme F. Mattos e a minha tia, Maria N. Souza, agradeço todo o amor, carinho, compreensão (às vezes não tão compreensivos com minha ausência), exemplos de honestidade e união. Amo vocês mais que tudo!

A CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – e a FAPESP – Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo – pelo apoio financeiro (Processo 2013/11840-0), referente à bolsa de pós-graduação.

Ao IBAMA – Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis – e ao ICMBIO – Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBIO) (40014-2 40014-3, 40014-4) – pela autorização de coleta dos exemplares estudados neste trabalho.

Agradeço imensamente a todas as pessoas que estiveram comigo ao longo desses quatro anos de estrada. Se por ventura esqueci-me de mencionar alguém, não fique triste e nem pense que sou mal agradecida, mas é que neste momento a memória já não vai tão bem.

Obrigada!

*Nada é mais real
Que aprender maneira simples de viver
Tudo é tão normal
Se a gente não se cansa nunca de aprender
Sempre olhar como se fosse à primeira vez
Se espantar como criança a perguntar por quês?
Vamos flutuar em um balão
Que sobrevoa o amanhecer
Vamos navegar
Entre os navios no horizonte a se perder
Nos lembrar
Que tudo tem sua razão de ser
E afinal eu quero apenas estar com você
Sombras no céu já vem
O anoitecer também com seus milhões de estrelas
Que iluminarão mais uma vez
Com a palidez da sua luz
A imensidão que a gente vê
(Maneira Simples – Almir Sater)*

*Do alto da arrogância qualquer homem
Se imagina muito mais do que consegue ser
É que vendo lá de cima, ilusão que lhe domina*

*Diz que pode muito antes de querer
Querer não é questão, não justifica o fim*

*Pra quê complicação, é simples assim
Focado no seu mundo qualquer homem*

*Imagina muito menos do que pode ver
No escuro do seu quarto ignoro o céu lá fora*

E fica claro que ele não quer perceber

Viver é uma questão de início, meio e fim

Pra quê a solidão, é simples assim

É, eu ando em busca dessa tal simplicidade

É, não deve ser tão complicado assim

É, se eu acredito, é minha verdade

É simples assim

E a vida continua surpreendentemente bela

Mesmo quando nada nos sorri

E a gente ainda insiste em ter alguma confiança

Num futuro que ainda está por vir

Viver é uma paixão do início, meio ao fim

Pra quê complicação, é simples assim

Eu vivo essa paixão do início, meio ao fim

Pra quê a solidão, é simples assim

(Simples Assim – Lenine e Dudu Falcão)

*Hello darkness, my old friend
I've come to talk with you again
Because a vision softly creeping
Left its seeds while I was sleeping
And the vision that was planted in my
brain
Still remains within the sound of silence
In restless dreams I walked alone
Narrow streets of cobblestone
'Neath the halo of a street lamp
I turned my collar to the cold and damp
When my eyes were stabbed
By the flash of a neon light
That split the night
And touched the sound of silence
And in the naked light I saw
Ten thousand people, maybe more
People talking without speaking
People hearing without listening*

*People writing songs
That voices never share
And no one dare
Disturb the sound of silence
Fools, said I, you do not know
Silence like a cancer grows
Hear my words that I might teach you
Take my arms that I might reach to you
But my words like silent raindrops fell
And echoed in the wells of silence
And the people bowed and prayed
To the neon God they made
And the sign flashed out it's warning
In the words that it was forming
And the sign said
The words of the prophets
Are written on the subway walls
And tenement halls
And whispered in the sound of silence
(The sound of silence - Simon e Garfunkel)*

RESUMO

O subgênero *Tityus* (*Archaeotityus*) compreende escorpiões sedentários que vivem na serapilheira. Neste trabalho, seis espécies brasileiras de *Archaeotityus* (*Tityus clathratus*, *Tityus maranhensis*, *Tityus mattogrossensis*, *Tityus paraguayensis*, *Tityus pusillus* e *Tityus silvestris*) foram caracterizadas quanto ao número diploide e haploide, comportamento dos cromossomos durante a meiose, localização das regiões organizadoras nucleolares (NORs), sequências de DNA repetitivo, tais como de heterocromatina constitutiva, rDNA 28S e telomérica (TTAGG)_n e marcadores epigenéticos (H3K9ac, H4K5ac, H3S10f, H3K4m2, H3K9m2, H3K9m3). Todas as espécies analisadas apresentaram cromossomos holocêntricos, meiose sináptica e aquiasmática e presença de cadeias cromossômicas na meiose I. Variação intraespecífica de número diploide e a presença de associações multivalentes formadas por um número variável de elementos foi visualizado dentro e entre as populações das cinco espécies. Metáfases espermatogoniais mostram: 2n=16, 2n=17 e 2n=18 em *T. paraguayensis*; 2n=16 e 2n=24 em *T. silvestris*; 2n=20 em *T. maranhensis*; 2n=19 e 2n=20 em *T. clathratus*, *T. mattogrossensis* e *T. pusillus*. Núcleos pós-paquitênicos revelaram uma alta variabilidade no número de bivalentes e/ou elementos envolvidos em associações multivalentes, dando destaque para *T. clathratus*, o qual mostrou 11 configurações meióticas distintas, e *T. pusillus* que exibiu células poliploides. Metáfases II indicaram que todos os cromossomos possuem disjunção regular e segregação balanceada. Metáfases mitóticas submetidas à impregnação por íon prata exibiram regiões organizadoras nucleolares localizadas na região terminal/subterminal de um par de cromossomos em todas as espécies. A heterocromatina constitutiva foi localizada na região terminal de um par de cromossomos. O emprego da técnica de FISH com sonda de rDNA 28S em células meióticas revelou cístrons ribossomais na região terminal de um bivalente em *T. clathratus*, *T. maranhensis*, *T. mattogrossensis*, *T. paraguayensis* e

T. pusillus e em dois cromossomos envolvidos em uma associação multivalente em *T. silvestris*. Cromossomos submetidos à FISH com sonda (TTAGG)_n exibiram sinais teloméricos típicos na maioria dos elementos e/ou pelo menos uma extremidade cromossômica. Levando-se em conta todos os dados obtidos com a investigação de células mitóticas e meióticas, foi possível determinar a variabilidade intraespecífica e intrapopulacional de número diploide das espécies pertencentes à *Archaeotityus*, a qual ocorreu como consequência de rearranjos cromossômicos do tipo fissão/fusão e translocação recíproca. Desta forma, indivíduos que apresentaram mesmo número diploide diferiram quanto à organização dos cromossomos nas associações multivalentes. As seis populações amostradas de *T. mattogrossensis* revelaram características cromossômicas semelhantes, mas mostraram diferenças quanto aos cromossomos envolvidos na associação quadrivalente, o que pode ser indício do baixo fluxo gênico entre as populações. Em escorpiões, o estudo de modificações epigenéticas nas histonas H4K5ac, H3K9ac, H3K9me2, H3K9me3 e H3S10f está sendo realizado pela primeira vez neste trabalho. Os resultados revelaram que todos os cromossomos aparecem igualmente fosforilados durante as fases da meiose e que a extremidade dos cromossomos é hipertrimelitada. Esta última modificação parece estar relacionada à segregação dos cromossomos na meiose, os quais apesar de serem holocêntricos, possuem atividade cinética apenas nas regiões terminais dos cromossomos.

Palavras-chave: Cadeia cromossômica. Cromossomos holocêntricos. Meiose aquiasmática. Número diploide. Rearranjo cromossômico.

ABSTRACT

The subgenus *Tityus* (*Archaeotityus*) comprises sedentary scorpions that live in the upper layers of the leaf litter. In this work, six Brazilian *Archaeotityus* species (*Tityus clathratus*, *Tityus maranhensis*, *Tityus mattogrossensis*, *Tityus paraguayensis*, *Tityus pusillus* and *Tityus silvestris*) were examined regarding to the diploid/haploid number, chromosome behavior during meiosis, repetitive DNA sequences (constitutive heterochromatin, 28S rDNA and telomeric (TTAGG)_n), and epigenetic marks (H3K9ac, H4K5ac, H3S10f, H3K4m2, H3K9m2, H3K9m3). All analyzed species showed holocentric chromosomes, synapctic and achiasmatic meiosis, and chromosome chains in meiosis I. Intraespecific variation of diploid number and the presence of multivalent associations formed by a variable number of elements were visualized within and among populations of five species. Spermatogonial metaphase cells exhibited: 2n=16, 2n=17 and 2n=18 in *T. paraguayensis*; 2n=16 and 2n=24 in *T. silvestris*; 2n=20 in *T. maranhensis*, 2n=19 and 2n=20 in *T. clathratus*, *T. mattogrossensis* and *T. pusillus*. In postpachytene nuclei, a high variability in the number of bivalents and/or chromosomes involved in multivalent associations was verified. The most extreme variability occurred in *T. clathratus*, which showed 11 distinct chromosome configurations in meiosis, and *T. pusillus*, which exhibited polyploid cells. Metaphase II cells indicated that all chromosomes possess regular disjunction and balanced segregation. In all species, mitotic metaphase cells submitted to silver impregnation revealed two nucleolar organizer regions localized on terminal/subterminal chromosome sites. The constitutive heterochromatin was localized in the terminal region of the one chromosome pair. Meiotic cells submitted to FISH with 28S rDNA probe showed ribosomal cistrons in the terminal region of one bivalent-like element in *T. clathratus*, *T. maranhensis*, *T. mattogrossensis*, *T. paraguayensis* and *T. pusillus*, and in two chromosomes involved in a multivalent association in *T. silvestris*. FISH with (TTAGG)_n probe exhibited typical

telomeric signals in most chromosomes or at least in one chromosome ends. Taking into account all results obtained through the investigation of mitotic and meiotic cells, we determine the intraspecific and intrapopulation variability in species of *Archaeotityus*, which occurred due to fission/fusion and reciprocal translocation rearrangements. Thus, individuals with the same diploid number differed regarding to chromosomal structure organization, giving rise to distinct multivalent associations observed in meiotic cells. The six populations investigated of *T. mattogrossensis* revealed similar chromosome features, but showed differences related to the number of chromosomes involved in a quadrivalent association. This data may be an indicative of low gene flow among the populations. In scorpions, the study about epigenetic modifications is been accomplished for the first time here. The results revealed that all chromosomes were homogeneously phosphorylated during meiosis and with terminal regions hypertrimethylated. This later histone modification seems to be related to chromosome segregation during meiosis, and have function in anchorage of spindle microtubules.

Keywords: Achiasmate meiosis. Chromosome chain. Chromosomal rearrangement. Diploid number. Holocentric chromosome.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Considerações gerais sobre a ordem Scorpiones.....	17
1.2. Estudos citogenéticos em Scorpiones.....	22
1.3. Cromossomos holocêntricos, meiose sináptica e aquiasmática e rearranjos cromossômicos.....	25
2. OBJETIVOS	30
3. MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1. MATERIAL.....	31
3.2. MÉTODOS.....	33
3.2.1. Obtenção das preparações cromossômicas.....	33
3.2.2. Coloração convencional com Giemsa.....	33
3.2.3. Técnica de impregnação das regiões organizadoras de nucléolo pelo nitrato de prata (Ag-RON).....	34
3.2.4. Técnica de obtenção das bandas C.....	34
3.2.5. Colorações associadas.....	34
3.2.6. Extração do DNA.....	35
3.2.7. Obtenção e marcação das sondas de rDNA 28S e (TTAGG) <i>n</i>	35
3.2.7.1. Sonda de rDNA 28S.....	35
3.2.7.2. Sonda telomérica (TTAGG) <i>n</i>	37
3.2.8. Hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH).....	37
3.2.9. Técnica de imunocitogenética.....	39
3.2.10. Análises cromossômicas.....	40
3.2.11. Medições cromossômicas.....	40
4. RESULTADOS	41
Capítulo I	42
High variability of multivalent associations in holocentric chromosomes of <i>Tityus</i> (<i>Archaeotityus</i>) scorpions (Scorpiones: Buthidae)	
Introduction.....	43
Material and Methods.....	46
Results.....	49
Discussion.....	65
Acknowledgements.....	72
References.....	72
Capítulo II	82
Modificações epigenéticas em cromossomos holocêntricos de <i>Tityus paraguayensis</i> (Scorpiones: Buthidae)	
Introdução.....	83
Material e Métodos.....	85
Resultados.....	86
Discussão.....	91
Agradecimentos.....	94
Referências.....	95

Capítulo III	100
Citogenética populacional de <i>Tityus mattogrossensis</i> (Scorpiones: Buthidae)	
Introdução.....	101
Material e Métodos.....	103
Resultados.....	106
Discussão.....	113
Agradecimentos.....	116
Referências.....	116
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	123
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	125

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações gerais sobre a ordem Scorpiones

A ordem Scorpiones, pertencente à classe Arachnida, possui aproximadamente 2,329 espécies descritas taxonomicamente, agrupadas em 163 gêneros e 18 famílias, o que corresponde a menos de 2% de todos os aracnídeos conhecidos. Provavelmente, esta diversidade esteja subestimada e cerca de 2/3 do total de Scorpiones existentes ainda não foram descritos (Prendini e Wheller 2005, Brasil e Ministério da Saúde 2009, Porto e Brazil 2010a, Rein 2017).

Os escorpiões são artrópodes quelicerados que surgiram há cerca de 400 milhões de anos atrás, no período Siluriano (Candido 1999, Prendini 2006). Inicialmente, os escorpiões ocupavam o ambiente marinho, sendo que os primeiros registros destes aracnídeos no ambiente terrestre datam de 325 a 350 milhões de anos atrás, no Período Carbonífero (Porto e Brazil 2010a). Os representantes da ordem Scorpiones possuem ampla distribuição geográfica, ocorrendo em todos os continentes, com exceção da Antártida. Entretanto, são mais abundantes e diversificados em regiões tropicais e subtropicais, habitando a maioria dos ecossistemas terrestres tais como, desertos, savanas e florestas (Lourenço 2002, Lourenço e Eicksted 2009, Porto e Brazil 2010a). Algumas espécies podem ocupar ambientes extremos, como cavernas com completa ausência de luz, tal como relatado para *Rhopalurus lacrau* e *Throglorhopalurus translucidus*, ambos endêmicos de cavernas da Chapada Diamantina, Bahia, Brasil (Lourenço et al. 2004, Gallão e Bichuette 2016). Adicionalmente, algumas espécies também se tornaram bem adaptadas a ambientes urbanos, um exemplo disso é o escorpião partenogenético *Tityus serrulatus* que tem se tornado abundante em várias cidades brasileiras (Cruz 1994, Prendini 2006). Desta forma, os escorpiões podem ser considerados ecologicamente generalistas, uma vez que ocupam os mais diversos ambientes (Lourenço e Eicksted 2009).

A família Buthidae é a mais numerosa e amplamente distribuída da ordem Scorpiones, com aproximadamente 900 espécies e 90 gêneros (Porto et al. 2010). Embora ainda não exista uma proposta filogenética completa para as famílias de escorpiões, com base em características morfológicas, embriológicas e toxicológicas, Buthidae pode ser considerada filogeneticamente basal dentro da ordem, sendo grupo-irmão de todas as outras 17 famílias existentes (Fet et al. 2000, 2003, Prendini e Wheeler 2005). A única análise filogenética proposta para esta família é parcial e foi realizada com apenas 17 gêneros, 13 dos quais exclusivos da fauna Paleártica (Fet et al. 2003). Tal estudo subdividiu os butídeos em dois grupos monofiléticos, “Velho Mundo” e “Novo Mundo”. Este resultado foi recentemente corroborado por Sharma et al. (2015) que recuperaram o monofiletismo de Buthidae e mostraram que as espécies no Novo Mundo formam um subclado irmão das espécies do Velho Mundo.

No Brasil, há registros de 130 espécies de escorpião que ocorrem em todas as regiões e biomas, pertencentes às famílias Bothriuridae, Buthidae, Chactidae e Liochelidae, com maior riqueza no norte e no nordeste do país (Porto et al. 2010). Buthidae é a família mais especiosa na fauna brasileira, sendo representada por 82 espécies agrupadas em oito gêneros: *Ananteris*, *Isometrus*, *Microtityus*, *Physoctonus*, *Rhopalurus*, *Tityus*, *Throglophopalurus* e *Zabius* (Porto et al. 2010). Apesar de todos os escorpiões serem considerados animais peçonhentos, Buthidae é o único grupo que apresenta grande importância médica, devido ao fato do veneno de muitas espécies apresentarem toxicidade para os mamíferos (Soleglad e Fet 2003). No Brasil, os principais relatos de acidentes envolvendo escorpiões estão relacionados às espécies do gênero *Tityus*, tais como *Tityus bahiensis*, *Tityus obscurus*, *Tityus stigmurus* e *Tityus serrulatus*, sendo esta última responsável pelos casos mais severos (Candido 1999, Porto e Brazil 2010b, Albuquerque et al. 2013, Bucarechi et al. 2014). As taxas de escorpionismo têm aumentado gradativamente nos últimos anos, o que pode ser

consequência da expansão dessas espécies para ambientes urbanos (Bucarechi et al. 2014).

O gênero *Tityus*, que possui cerca de 210 espécies descritas, é o grupo mais especioso da fauna brasileira (54 espécies), seguido do gênero *Ananteris* (17 espécies) e *Rhopalurus* (seis espécies) (Porto et al. 2010). *Tityus* é caracterizado por apresentar espécies com tamanho entre 25 mm a 110 mm de comprimento, com coloração variada, que vai desde o amarelo até o negro, podendo ter manchas negras ou granulação bem marcada. O dimorfismo sexual é evidente em muitas espécies, uma vez que, apresentam diferenças morfométricas nos pedipalpos, no metassoma e nos pentes (Almeida 2010). Adicionalmente, devido a sua ampla distribuição, grande número de espécies descritas e ausência de características morfológicas que permitam diferenciar as espécies do gênero, *Tityus* pode ser considerado um grupo bastante complexo, o que torna o seu estudo bastante interessante (Riquelme et al. 2015). *Tityus* foi agrupado em cinco subgêneros com base em caracteres morfológicos e/ou de distribuição geográfica: *Tityus (Archaeotityus)* (\pm 28 spp), *Tityus (Atreus)* (\pm 75 spp), *Tityus (Brazilotityus)* (\pm 3 spp), *Tityus (Caribetityus)* (\pm 10 spp) e *Tityus (Tityus)* (\pm 69 spp). As demais espécies do gênero (\pm 27 spp) e/ou as recentemente descritas não foram classificadas nestes subgêneros (Lourenço 2006, 2012, Almeida 2010, Porto et al. 2010).

O subgênero *Tityus (Archaeotityus)* compreende escorpiões com tamanho de 18 mm a 40 mm, altamente pigmentados, com moderada granulação no corpo e nos pedipalpos, sobre um fundo que varia do amarelo claro ao avermelhado. *Tityus (Archaeotityus)* inclui espécies anteriormente reunidas no grupo “*Tityus clathratus*” e “*Tityus columbianus*”, sendo reconhecido pela sua pigmentação variegada e estrutura do telson e tubérculo subaculear fortemente romboides. Este subgênero encontra-se distribuído por toda a América do Sul, Panamá e Costa Rica (Lourenço 1984, 1992, 2006, Almeida 2010). No Brasil, são registradas sete espécies de *T. (Archaeotityus)* –

Tityus bastosi, *Tityus clathratus*, *Tityus maranhensis*, *Tityus mattogrossensis*, *Tityus paraguayensis*, *Tityus pusillus* e *Tityus silvestris* – cada qual distribuída em localidades bem específicas das regiões centro-oeste, norte, nordeste e sudoeste (Almeida 2010). Os representantes brasileiros de *T. (Archaeotityus)* estão mostrados na **Figura 1**. Adicionalmente, *T. (Archaeotityus)* apresenta espécies morfológicamente muito semelhantes, podendo apresentar variações intraespecíficas, o que requer uma análise taxonômica muito minuciosa. Deste modo, *Archaeotityus* pode ser considerado uma “*ochlopecies*”, termo este designado a espécies polimórficas cujas variações embora parcialmente correlacionadas com a ecologia e geografia são de um padrão tão complexo que não pode ser satisfatoriamente acomodado dentro de uma classificação taxonômica formal (Cronk 1998).

Um estudo ecológico realizado com *T. (Archaeotityus) pusillus* revelou que esses animais são sedentários e que habitam preferencialmente as camadas superiores da serapilheira, podendo coexistir com outras espécies de escorpiões. Neste caso, cada espécie ocupa micro habitats específicos, o que reduz a possibilidade de contato e subsequente conflito entre os indivíduos, além de diminuir a pressão de predação e partilha de recursos espaciais (Lira et al. 2013, Lira e DeSouza 2014). Conforme experiência pessoal em atividades de campo, o mesmo comportamento pode ser observado para as demais espécies de *T. (Archaeotityus)* estudadas neste trabalho, uma vez que todos os indivíduos (**Tabela 1**) foram coletados em serapilheira e, em alguns casos, ocorrendo junto com outras espécies, geralmente pertencentes ao gênero *Ananteris*.



Fig. 1 – Representantes de *Tityus* (*Archaeotityus*) brasileiros. **A.** *Tityus clathratus*. **B.** *Tityus maranhensis*. **C.** *Tityus mattogrossensis*. **D.** *Tityus paraguayensis*. **E.** *Tityus pusillus*. **F.** *Tityus silvestris*. Fotos: D. Loebmann (**E**), D. Araújo (**D**), L. S. Carvalho (**B**), M. Cozijn (**A, F**), T. J. Porto (**C**).

1.2. Estudos citogenéticos em Scorpiones

As espécies de Scorpiones apresentam características cromossômicas bem peculiares, tais como: 1) cromossomos monocêntricos ou holocêntricos, sendo que tal diversidade dentro de um mesmo grupo tem sido raramente registrada para outros táxons; 2) meiose sináptica e aquiasmática, constituindo um tipo particular de meiose, que suscita questionamentos sobre os mecanismos responsáveis pela variabilidade em escorpiões, uma vez que não ocorre recombinação por *crossing over*; 3) altos índices de rearranjos cromossômicos originados por translocações ou fissões/fusões, os quais estão relacionados à grande variabilidade inter/intraespecífica de número diploide e de associações multivalentes na meiose I (Schneider et al. 2009a, Mattos et al. 2013, Schneider et al. 2015).

Citogeneticamente, somente 120 espécies de escorpiões pertencentes a 11 famílias foram caracterizadas (ver Schneider et al. 2017). Este número corresponde a menos de 5% de todas as espécies conhecidas taxonomicamente. O número diploide em escorpiões é extremamente variável, $2n=5$ a $2n=175$ (ver Schneider et al. 2017). Adicionalmente, Buthidae é a família mais amplamente estudada sob o ponto de vista citogenético e concentra mais de 50% das informações cromossômicas já conhecidas para Scorpiones. Os estudos citogenéticos em butídeos foram realizados em 70 espécies pertencentes a 25 gêneros distintos (ver Schneider et al. 2017). Entre os 25 gêneros já investigados citogeneticamente, sete pertencem ao clado “Velho Mundo” (*Androctonus*, *Buthacus*, *Buthus*, *Compsobuthus*, *Hottentotta*, *Leiurus* e *Mesobuthus*) e três ao clado “Novo Mundo” (*Centruroides*, *Lychas* e *Rhopalurus*), os outros 15 gêneros não foram incluídos nas análises filogenéticas (Fet et al. 2003). As informações cromossômicas parecem confirmar a monofilia de Buthidae, levando-se em conta que esta é a única família dentro de Scorpiones que possui cromossomos holocêntricos. O número diploide nos butídeos varia de $2n=5$ a $2n=56$, sendo o $2n=24$ o mais

frequentemente encontrado (ver Schneider et al. 2017). Os números encontrados são considerados relativamente baixo quando comparado aos números diploides encontradoa para as demais famílias, tais como $2n=28-50$ em Bothriuridae, $2n=50$ em Chactidae, $2n=\pm 84$ em Euscorpiidae, $2n=52-120$ em Scorpionidae, $2n=29-175$ em Urodacidae. Além disso, quando classificados, os cromossomos das espécies destas famílias foram do tipo monocêntricos (ver Schneider et al. 2017).

Cerca de 1/3 dos representantes examinados exibiram variação intraespecífica (intra e/ou interpopulacional) no número cromossômico, o que pode envolver apenas um ou dois elementos, como em *Ananteris balzanii* ($2n=12, 14$), *Isometrus maculatus* ($2n=12, 14$) e *Lychas marmoreus* ($2n=12, 14, 15$), ou diversos elementos, como em *Tityus bahiensis* ($2n=5, 6, 7, 9, 10, 12, 16, 17, 18, 19$), *Buthus occitanus* ($2n=22, 44, 56$) e *Uroplectes carinatus* ($2n=20, 48$) (Carnoy 1885, Piza 1947a, b, 1949, 1950a, b, 1955, Makino 1956, Guénin 1961, Newlands e Martindale 1980, Shanahan 1989, Shanahan e Hayman 1990, Schneider et al. 2009a, Mattos et al. 2013). Estudos realizados em escorpiões sugerem que os rearranjos cromossômicos foram originados por translocações recíprocas ou por fissões/fusões. Na maioria dos casos, esses rearranjos deram origem a complexas associações multivalentes na meiose I (Schneider et al. 2009a, Mattos et al. 2013, Almeida et al. 2017).

Três espécies do subgênero *Archaeotityus* (*T. maranhensis*, *T. mattogrossensis* e *T. paraguayensis*), três *Atreus* (*Tityus magnimanus*, *Tityus metuendus* e *Tityus ythieri*) e nove de *Tityus* (*T. bahiensis*, *Tityus confluens*, *Tityus costatus*, *Tityus fasciolatus*, *Tityus martinpaechi*, *Tityus neglectus*, *T. serrulatus*, *T. stigmurus* e *T. trivittatus*) foram examinadas sob o ponto de vista citogenético (Piza 1947a, 1952, Kovarik et al. 2009, Schneider et al. 2009a, b, Schneider e Cella 2010, Mattos et al. 2013). Apesar do pequeno número de representantes analisados, os subgêneros *Archaeotityus* e *Atreus* apresentam número cromossômico entre $2n=15$ a $2n=20$, enquanto que nos escorpiões

do subgênero *Tityus* uma maior variabilidade cariotípica foi observada ($2n=5$ a $2n=27$), com predominância de números diploides mais baixos do que aqueles observados nos outros subgêneros (ver Schneider et al. 2017). Espécies de todos os subgêneros analisados apresentaram cadeias cromossômicas, as quais podem envolver até todos os elementos do cariótipo (Schneider et al. 2009a, Mattos et al. 2013). As três espécies de *Archaeotityus* investigadas exibiram cadeias cromossômicas, envolvendo de quatro a oito cromossomos (Piza 1947a, Mattos et al. 2013). Adicionalmente, *T. (Archaeotityus) paraguayensis* apresentou células poliploides na meiose I, cuja ocorrência foi comprovada através de medições cromossômicas. No entanto, essa característica particular não foi encontrada em fases posteriores do ciclo celular (Mattos et al. 2013).

Até o presente momento, a presença de cromossomos sexuais morfologicamente diferenciados não tinha sido observada em escorpiões (ver Schneider et al. 2017). Recentemente, Adilardi et al. (2016) e Lima (2017) sugeriram a presença de cromossomos sexuais em *T. confluens* e *T. serrulatus*, respectivamente. *Tityus confluens* apresentou machos heterogaméticos e fêmeas homogaméticas para o gene ribossomal 28S, e situação inversa foi observada em *T. serrulatus* sendo, portanto o sistema cromossômico sexual destas espécies determinado como XY/XX e ZW/ZZ, respectivamente (Adilardi et al. 2016, Lima 2017).

A maioria dos estudos cromossômicos em Scorpiones foi realizada apenas em microscopia de luz, com técnicas de coloração convencional dos cromossomos. Esse tipo de análise é importante para estabelecer os números diploides e haploides de cromossomos, o comportamento dos cromossomos durante a meiose, principalmente quanto à associação e segregação e verificar a ocorrência de variações cromossômicas intra/interespecíficas e/ou interindividuais. No entanto, o emprego de metodologias para identificar regiões cromossômicas específicas, como heterocromatina constitutiva, regiões organizadoras do nucléolo, cístrons ribossomais e sequências repetitivas, como

aquelas presentes nos telômeros, além de possibilitar uma melhor caracterização cromossômica das espécies, pode fornecer dados que permitam esclarecer os mecanismos responsáveis pelas variações cromossômicas. Desta forma, estudos citogenéticos moleculares tem se mostrado útil para identificar rearranjos cromossômicos não perceptíveis em células meióticas examinadas somente com técnicas de citogenética clássica. Mattos et al. (2014) verificaram que indivíduos de *T. confluens* portadores das mesmas configurações cromossômicas durante a prófase I (cinco bivalentes mais uma associação trivalente) diferiram quanto a localização dos cístrons ribossomais, ou seja, em alguns espécimes o rDNA 45S estava localizado em elementos envolvidos nas associações multivalentes, enquanto em outros, estes sítios ocorriam em elementos totalmente sinapsados semelhante a bivalentes. Adicionalmente, a análises moleculares podem revelar a presença de sistemas cromossômicos sexuais diferenciados, tal como descrito acima.

1.3. Cromossomos holocêntricos, meiose sináptica e aquiasmática e rearranjos cromossômicos

Os cromossomos holocêntricos são caracterizados pela ausência de uma constrição ou região específica para a ligação das proteínas do cinetócoro, que conectam os cromossomos as fibras do fuso durante a divisão celular (Cunha e Pavan 1954, Bongiorne et al. 2004, Melters et al. 2012, Escudero et al. 2016). Esse comportamento cinético pode permitir que os microtúbulos liguem-se ao longo de todo o comprimento cromossômico durante a divisão celular. Desta forma, os cromossomos e/ou cromátides movem-se paralelamente na anáfase, formando um ângulo reto com as fibras do fuso (Bongiorne et al. 2004). Os cromossomos holocêntricos também podem ser diferenciados dos monocêntricos quanto ao tamanho da região centromérica em relação ao comprimento total do cromossomo, isto é, nos holocêntricos a porção do cromossomo que interage com os microtúbulos é grande, em contraste com os

monocêntricos, nos quais esta região é pequena (Wolf 1996). Nos cromossomos holocêntricos, podem-se destacar ainda diferenças quanto aos tipos de placas cinetocóricas, tais como: 1) aquelas que se estendem pela maioria ou totalidade do comprimento cromossômico (Albertson e Thompson 1982), 2) várias placas localizadas ao longo do comprimento cromossômico (Gama et al. 1981), 3) uma placa cinetocórica que ocupa menos da metade da extensão cromossômica (Wolf et al. 1992), 4) ausência de placa cinetocórica (Shanahan e Hayman 1990, Schneider et al. 2009a). Em alguns casos ainda, os cromossomos holocêntricos se comportam como cromossomos monocêntricos, restringindo sua atividade cinética à região terminal dos cromossomos (comportamento telocinético) como verificado em Heteroptera e Nematoda (Pimpinelli e Goday 1989, Perez et al. 2000, Viera et al. 2009).

Estudos imunocitogenéticos realizados em espécies que possuem cromossomos holocêntricos, como Heteroptera, têm mostrado que alterações epigenéticas sofridas pelos cromossomos durante a divisão celular, podem especificar domínios para a ligação dos microtúbulos do fuso de divisão. A ligação dos cromossomos aos microtúbulos do fuso de divisão tem importância fundamental para direcionar os cromossomos no momento da segregação e permitir que ocorra a divisão reducional dos cromossomos na meiose I (Viera et al. 2009). Levando isso em consideração, é curioso notar que a trimetilação da lisina 9 da histona H3 é restrita às regiões terminais dos autossomos, tal modificação epigenética faz com que a atividade cinética dos cromossomos fique limitada às extremidades, ou seja, os cromossomos holocêntricos funcionam como monocêntricos durante a meiose (Viera et al. 2009). No entanto, a característica mais peculiar é que embora ambas as extremidades dos cromossomos possam adquirir a atividade cinética devido à modificação da histona H3, apenas uma delas torna-se ativa. Isto possibilita que cada bivalente adquira pelo menos duas orientações alternativas na metáfase I. A escolha da extremidade cromossômica

que se torna ativa cineticamente está frequentemente relacionada à presença de quiasma na extremidade oposta do bivalente. Desta forma, os escorpiões constituem um grupo extremamente interessante para análise de modificações epigenéticas, uma vez que dentro de Arachnida, são os únicos animais em que todas as espécies citogeneticamente analisadas parecem ter meiose aquiasmática em pelo menos um dos sexos (Schneider et al. 2009a, b).

Adicionalmente, a análise de modificações epigenéticas em histonas de cromossomos holocêntricos pode revelar características de expressão gênica e condensação cromossômica, bem como, se as extremidades dos cromossomos estão envolvidas com a segregação durante a meiose. Este processo pode ajudar a compreender como os elementos envolvidos em associações multivalentes são orientados e segregam de modo alternado durante a meiose I, produzindo gametas balanceados.

Os mecanismos que produzem alterações no número cromossômico parecem ser semelhantes para os cromossomos monocêntricos e holocêntricos (Luceño e Guerra 1996). Porém, no caso dos cromossomos monocêntricos, determinados rearranjos podem originar segmentos cromossômicos acêntricos ou dicêntricos, os quais são usualmente perdidos durante a divisão celular. Por outro lado, os fragmentos cromossômicos gerados por rearranjos podem ter uma segregação regular em espécies que possuem cromossomos do tipo holocêntrico (Wolf 1996, Dernburg 2001). Os rearranjos cromossômicos, principalmente aqueles presentes em condição heterozigota, como verificado em escorpiões, acarretam na redução da fertilidade devido a problemas meióticos (Fossey et al. 1989, Kingswood et al. 1994). No entanto, os efeitos prejudiciais dos rearranjos heterozigotos sobre a fertilidade podem ser diminuídos, quando os gametas não balanceados são eliminados ou a frequência de recombinação cromossômica é drasticamente reduzida (Reed et al. 1992, Kingswood et al. 1994).

A ocorrência de altos índices de rearranjos cromossômicos heterozigotos em Buthidae também pode ter uma relação com a estrutura populacional e o padrão de dispersão de algumas espécies. Schneider et al. (2009a) sugeriram que a grande diversidade de número diploide e de configurações cromossômicas multivalentes observadas durante a meiose I de uma população de *T. bahiensis*, coletada em uma área urbana, pode ser resultado da alta incidência de endocruzamento entre os indivíduos. Tal endocruzamento pode ser mais frequente em espécies que ocupam ambientes modificados, as quais devido à abundância de alimento podem viver agregadas em um micro-habitat e apresentar uma dispersão reduzida. Cioffi et al. (2015) relataram que, apesar das espécies de peixes da família Channidae apresentarem uma ampla distribuição geográfica, sua baixa vagilidade facilita a manutenção de rearranjos cromossômicos em populações pequenas, o que resulta em um aumento na diversidade cariotípica.

O estudo da meiose é fundamental para determinar a influência dos rearranjos cromossômicos sobre o processo reprodutivo e, conseqüentemente, sua importância para a especiação, de modo especial, em espécies que vivem em ambientes naturais. Além disso, a comparação entre populações que habitam diferentes localidades pode fornecer dados que indiquem uma possível causa para as altas frequências de rearranjos heterozigotos presentes nas espécies.

Embora o sistema meiótico aquiasmático pareça mais simples que o quiasmático, o primeiro provavelmente evoluiu de modo secundário, uma vez que foi registrado em espécies de grupos filogeneticamente não relacionados, e pode ocorrer de três formas distintas: 1) com formação e manutenção do complexo sinaptonêmico de modo regular e semelhante às espécies que possuem meiose quiasmática; 2) o complexo sinaptonêmico é organizado, mas não persiste até o final do paquíteno; 3) o complexo sinaptonêmico está ausente (John 1990). Existem várias hipóteses para

explicar o significado evolutivo deste tipo particular de meiose, como a seleção favorecendo uma baixa frequência de recombinação, e a preservação de certas combinações alélicas que estariam coadaptadas e funcionariam como um supergenes (Altiero e Rebecchi 2003, Ituarte e Papeschi 2004). Para os escorpiões, ainda não há dados suficientes para explicar o significado da meiose aquiasmática; no entanto, este tipo particular de meiose pode estar relacionado aos altos níveis de rearranjos cromossômicos heterozigotos presentes em espécies deste táxon.

2. OBJETIVOS

Levando-se em consideração todas as particularidades cromossômicas verificadas em Scorpiones, de modo especial em representantes do subgênero *Tityus* (*Archaeotityus*), a diversidade de espécies na fauna brasileira e a escassez de estudos citogenéticos comparativos neste grupo, o objetivo deste trabalho é compreender os mecanismos responsáveis pela origem e manutenção da variabilidade cromossômica em espécies do subgênero *Archaeotityus*. Para alcançar tal objetivo foi necessário:

- a) Determinar o número diploide/haploide de cromossomos em diferentes espécies e populações de *T. (Archaeotityus)*;
- b) Determinar o comportamento dos cromossomos durante a meiose, quanto à sinapse, recombinação, orientação e segregação;
- c) Quantificar o número de células com diferentes configurações cromossômicas na meiose I e números haploides em metáfases II;
- d) Realizar medições de comprimento cromossômico de bivalentes e/ou de associações multivalentes encontradas em células pós-paquitênicas;
- e) Determinar o padrão de distribuição das regiões organizadoras nucleolares (RONS), de heterocromatina constitutiva (bandas C) e de sequências teloméricas e de DNA ribossomal 28S;
- f) Determinar o padrão de modificação de histonas durante a meiose e fases pós-meióticas e sua relação com a transcrição, condensação e segregação de cromossomos holocêntricos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

O número de exemplares adultos das seis espécies de *Tityus* (*Archaeotityus*) coletados, dissecados e analisados bem como seus respectivos locais de coleta estão listados na **Tabela 1**. A identificação taxonômica dos indivíduos foi realizada pelo Prof. MSc. Leonardo Sousa Carvalho, da Universidade Federal do Piauí, Campus Almícar Ferreira Sobral, Floriano, PI, Brasil; e pelo Prof. Dr. Marcos André de Carvalho, da Universidade Federal de Mato Grosso, Campus Cuiabá, MT, Brasil. Os exemplares foram depositados na Coleção de História Natural da Universidade Federal do Piauí (CHNUFPI – curador M. R. A. Soares), Floriano, PI, Brasil, Coleção Zoológica da Universidade Federal de Mato Grosso (curador A. R. Ferreira), Cuiabá, MT, Brasil, e nas Coleções Taxonômicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG – curador A. J. Santos), Belo Horizonte, MG, Brasil.

Um total de 425 indivíduos foi coletado, sendo 163 machos e 262 fêmeas. A análise de indivíduos machos foi priorizada, uma vez que os ovários são conhecidamente um material com baixo índice de divisão mitótica e/ou meiótica. Adicionalmente, fêmeas foram analisadas, com exceção daquelas que apresentaram embriões e de *T. mattogrossensis*. Desta forma, foram examinados 223 indivíduos (146 machos e 77 fêmeas) (**Tabela 1**). Apesar da grande quantidade de indivíduos coletados e analisados, nem todos apresentaram células em divisão (ver resultados).

Tabela 1. Espécies de *Tityus* (*Archaeotityus*) coletadas, dissecadas para obtenção de preparações cromossômicas e analisadas citogeneticamente, incluindo o número de indivíduos e os locais de coleta nos estados brasileiros. AM=Amazonas, CE=Ceará, GO=Goiás, MG=Minas Gerais, MS=Mato Grosso do Sul, MT=Mato Grosso, PI=Piauí, PR=Paraná, RR=Roraima.

Espécie	Indivíduos coletados	Indivíduos analisados	Local de coleta
<i>Tityus clathratus</i> C. L. Koch, 1844	20♂ e 18♀	14♂ e 17♀	Amajari (3°47'N, 61°43'O), RR
	1♂ e 1♀	1♂ e 1♀	Boa Vista (2°52'N, 60°43'O), RR
<i>Tityus maranhensis</i> Lourenço, de Jesus Junior e Limeira-de-Oliveira, 2006	5♂ e 3♀	5♂ e 3♀	Floresta Nacional dos Palmares (05°03'S, 42°35'O), Altos, PI
<i>Tityus mattogrossensis</i> Borelli, 1901	9♂ e 2♀	9♂	Alto Araguaia (17°17'S, 53°13'O), MT, Ponto 1
	14♂ e 8♀	13♂	Alto Araguaia (17°08'S, 53°12'O), MT Ponto 2
	2♂	2♂	Aruanã (14°55'S, 51°04'O), GO
	16♂ e 40♀	15♂	Cuiabá (15°29'S, 56°43'O), MT
	2♂ e 4♀	2♂	Parque Nacional Cavernas do Peruaçu (15°07'S, 44°16'O), Januária, MG
	6♂ e 40♀	5♂ e 3♀	Parque Nacional Chapada dos Guimarães (15°17'S, 55°48'O), Chapada dos Guimarães, MT
	1♂	1♂	Santa Rita do Araguaia (17°17'S, 53°12'O), GO
<i>Tityus paraguayensis</i> Kraepelin, 1895	2♂ e 6♀	1♂ e 2♀	Base de estudos do Pantanal (16°30'S, 56°25'O), Poconé, MT
	13♀	8♀	Fazenda Pouso Alegre (16°30'S, 56°47'O), Poconé, MT
	1♂ e 3♀	1♂ e 2♀	Ilha Rodrigues Saraiva (24°01'S, 54°10'O) Guaira, PR
	1♂ e 25♀	1♂ e 22♀	Ilha São Francisco (24°01'S, 54°10'O), Guaira, PR
	28♂ e 11♀	27♂	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (20°29'S, 54°36'O), Campo Grande, MS
<i>Tityus pusillus</i> Pocock, 1893	33♂ e 58♀	30♂ e 4♀	Serra da Ibiapaba (03°49'S, 40°59'O), Ubajara, CE
<i>Tityus silvestris</i> Pocock, 1897	15♂ e 20♀	12♂ e 8♀	Fazenda Continental (11°34'S, 55°17'O), Claudia, MT
	2♂ e 6♀	2♂ e 4♀	Reserva Florestal Adolpho Ducke (02°55'S, 59°58'O), Manaus, AM
	5♂ e 4♀	5♂ e 3♀	Universidade Federal do Amazonas (03°06'S, 59°58'O), Manaus, AM
Total	163♂ e 262♀	146♂ e 77♀	

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Obtenção das preparações cromossômicas

As preparações citológicas para estudo dos cromossomos mitóticos e meióticos, em microscopia de luz, foram obtidas de testículos e ovários de indivíduos adultos, de acordo com a metodologia descrita a seguir: a) Dissecar o animal em solução fisiológica (7,5g de NaCl; 2,38g de Na_2HPO_4 ; 2,72g de KH_2PO_4 em 1L de água destilada), retirar as gônadas e colocá-las em uma placa escavada, contendo solução fisiológica e solução hipotônica (água de torneira) durante 12 minutos; b) Transferir o material para outra escavação da placa, a qual deverá conter uma solução fixadora composta de metanol e ácido acético nas proporções de três para um, mantendo nessa solução por no mínimo 30 minutos; c) Macerar parte do material sobre uma lâmina, juntamente com uma gota de ácido acético 45% ou 60%; d) Secar a lâmina em uma placa de metal a 35°C.

3.2.2. Coloração convencional com Giemsa

Após a obtenção das preparações cromossômicas, deixar as lâminas à temperatura ambiente por pelo menos um dia e, posteriormente: a) Corar a lâmina em solução de Giemsa 3% (47mL de água destilada; 1,5mL de solução comercial de Giemsa e 1,5mL de tampão fosfato (Solução A: 29g de NaH_2PO_4 em 1L de água destilada; Solução B: 51,6g de Na_2HPO_4 em 1L de água destilada; Solução final: 230mL de solução A, 770mL de Solução B)) durante 12 minutos; b) Lavar rapidamente a lâmina em água destilada e secar ao ar.

3.2.3. Técnica de impregnação das regiões organizadoras de nucléolo pelo nitrato de prata (Ag-RON)

A metodologia utilizada para a detecção das RONS ativas foi aquela descrita por Howell e Black (1980), com algumas modificações, conforme descrito a seguir: a) Hidrolisar as lâminas em solução de ácido clorídrico 0,1N à temperatura ambiente, por cinco minutos; b) Colocar sobre a lâmina uma gota de solução coloidal reveladora (1g de gelatina Sigma dissolvida em 50mL de água destilada; 0,5mL de ácido fórmico) e duas gotas de solução de nitrato de prata a 50%; c) Cobrir com lamínula e incubar em câmara úmida, durante aproximadamente quatro minutos a 67°C; d) Lavar em água destilada e secar ao ar.

3.2.4. Técnica e obtenção das bandas C

As regiões de heterocromatina constitutiva foram identificadas através da técnica descrita por Sumner (1972), com algumas modificações: a) Hidrolisar as lâminas em ácido clorídrico 0,1N a temperatura ambiente por cinco minutos; b) Tratar as preparações cromossômicas com solução de hidróxido de bário octahidratado a 5%, durante aproximadamente 30 segundos a 60°C; c) Lavar as lâminas duas vezes em solução de ácido clorídrico 0,1N a temperatura ambiente; d) Lavar as lâminas em tampão 2xSSC (17,5g de NaCl; 8,8g de $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$; em 1L de água Mili-Q e ajustar o pH para 7,0) a temperatura ambiente; e) Incubar as lâminas em tampão 2xSSC por 30 minutos a 60°C; f) Lavar as lâminas várias vezes com água destilada e secar ao ar; g) Adicionar 20µL de solução DAPI/Vectashield sobre as lâminas e cobrir com lamínula.

3.2.5. Colorações associadas

Seguir o procedimento de coloração convencional com Giemsa. Após a análise e registro fotográfico das células: a) Lavar a lamínula várias vezes em xilol e secar ao ar;

- b) Submeter à lâmina a técnica de impregnação por íon prata ou de obtenção de bandas C.

3.2.6. Extração de DNA

A extração de DNA de hepatopâncreas de *Tityus silvestris* para obtenção das sondas de rDNA 28S (item 3.2.7) foi realizada segundo o manual da Qiagen, com modificações: a) Colocar o tecido para extração de DNA em microtubos de 1,5mL; b) Adicionar 180µL de buffer ATL e 20µL de proteinase K, passar no vortex até digerir completamente o tecido; c) Adicionar 200µL de buffer AL e passar no vortex; d) Adicionar 200µL de etanol 100% e passar no vortex; e) Colocar a mistura na coluna em um tubo de 2mL, centrifugar a 8000rpm por um minuto e descartar o filtrado; f) Transferir a coluna para um novo tubo e posteriormente adicionar 500µL de buffer AW1, centrifugar por um minuto a 8000rpm, descartar o filtrado; g) Adicionar 500µL de buffer AW2 e centrifugar novamente por três minutos a 14000 rpm, descartar o filtrado; h) Transferir a coluna para um novo tubo, eluir o DNA adicionando 50µL de buffer AE, deixar a 37°C por 20 minutos e posteriormente centrifugar por um minuto a 8000rpm; i) Adicionar 50µL de buffer AE, deixar por 20 minutos por 37°C e centrifugar por um minuto a 8000 rpm; j) Descartar a coluna e guardar o DNA em geladeira *overnight*, fazer alíquotas e guardar em freezer a -20°C.

3.2.7. Obtenção e marcação das sondas de rDNA 28S e (TTAGG)_n

3.2.7.1. Sondas de rDNA 28S

A sonda de DNA ribossomal 28S foi obtida a partir do DNA total de *Tityus silvestris* através da técnica de PCR em termociclador Applied Biosystems para o volume total de 25µL de reação, conforme descrito a seguir: 2,5µL de tampão 10X; 5µL de dNTPmix (2mM); 1µL de primer 28SF – 5' GACCCGTCTTGAAACACGGA e 1µL de

primer 28SR – 5' TCGGAAGGAACCAGCTACTA (Nunn et al. 1996); 1µL de MgCl₂; 1µL de DNA; 0,3µL de Taq polimerase e 13,2µL de água Mili-Q autoclavada. A reação foi realizada conforme descrito a seguir:

Passo 1: 95°C por 15 minutos (desnaturação inicial – adicionar a Taq no fim do passo)

Passo 2: 94°C por 35 segundos (desnaturação)

Passo 3: 60°C por 90 segundos (anelamento)

Passo 4: 72°C por 90 segundos (extensão)

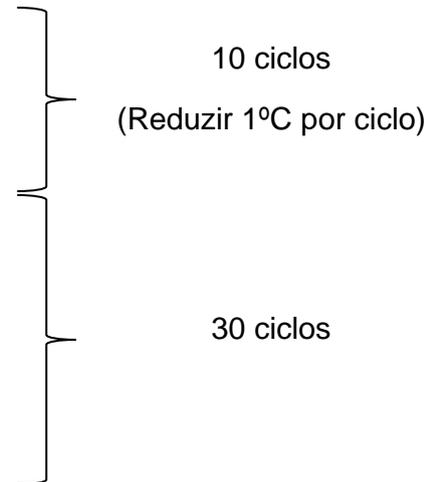
Passo 5: 94°C por 35 segundos (desnaturação)

Passo 6: 50°C por 90 segundos (anelamento)

Passo 7: 72°C por 90 segundos (extensão)

Passo 8: 72°C por 7 minutos (extensão final)

Passo 9: 4°C para manutenção



Para verificação da amplificação e da qualidade dos produtos de PCR, uma alíquota da reação foi submetida à eletroforese em gel de agarose 2%, corado com Gel Red e visualizados em um transiluminador de luz ultravioleta.

A marcação das sondas do rDNA 28S foi realizada para um volume total de 50µL (34,1µL de água Mili-Q autoclavada; 5µL de tampão 10X; 4µL de MgCl₂(50mM); 1µL de dATP (2mM); 1µL de dCTP (2mM); 1µL de dGTP (2mM) e 0,7µL de dTTP (2mM); 0,6µL de biotina 11dUTP (1mM); 1µL de DNA (produto do PCR); 0,5µL de primer F (10mM); 0,5µL de primer R (10mM); 0,6µL de Taq polimerase). Os ciclos de reação para marcação da sonda foram:

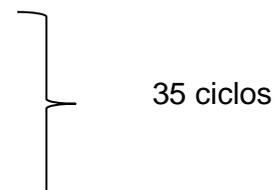
Passo 1: 95°C por 15 minutos (desnaturação inicial – adicionar a Taq no fim do passo)

Passo 2: 94°C por 35 segundos (desnaturação)

Passo 3: 56°C por 90 segundos (anelamento)

Passo 4: 72°C por 90 segundos (extensão)

Passo 5: 72°C por 7 minutos (extensão final)



Passo 6: 4°C para manutenção

3.2.7.2. Sonda telomérica (TTAGG)_n

Para a sequência telomérica (TTAGG)_n, os primers: Tel-F – 5' TAGGTTAGGTTAGGTTAGG e Tel-R – 5' AACCTAACCTAACCTAACCC foram utilizados como sonda, sem DNA genômico. A marcação da sonda foi realizada por PCR em um termociclador Applied Biosystems com um volume total de 50µL de reação (31,2µL de água Mili-Q autoclavada; 5µL de tampão 10X; 8µL de MgCl₂ (25mM); 1µL de dATP (2mM); 1µL de dCTP (2mM); 1µL de dGTP (2mM) e 0,7µL de dTTP (2mM); 0,6µL de biotina 11dUTP (1mM); 0,5µL de primer F (10mM); 0,5µL de primer R (10mM); 0,5µL de Taq polimerase). Os ciclos de reação para marcação da sonda foram:

Passo 1: 94°C por 5 minutos (desnaturação inicial)

Passo 2: 95°C por 60 segundos (desnaturação)

Passo 3: 50°C por 60 segundos (anelamento)

Passo 4: 72°C por 90 segundos (extensão)

Passo 5: 72°C por 7 minutos (extensão final)

Passo 6: 4°C para manutenção

} 20 ciclos

3.2.8. Hibridização *in situ* fluorescente (FISH)

Após a marcação das sondas, a técnica de FISH foi realizada de acordo com o protocolo de Pinkel et. al. (1986), com as modificações descritas a seguir: a) Colocar 100µL de pepsina (0,5%) sobre a lâmina, cobrir com parafilme e deixar por uma hora em câmara úmida a 37°C; b) Lavar as lâminas em tampão 1xPBS (7,58g de NaCl; 1,24g de Na₂HPO₄.2H₂O e 4,14g de NaH₂PO₄.H₂O em 1L de água destilada) durante cinco minutos sobre agitação em temperatura ambiente; c) Desidratar as lâminas em série alcoólica (70%; 90% e 100%), durante cinco minutos cada, e deixar as lâminas secarem

ao ar; d) Adicionar 100 μ L de RNase (10mg/mL) sobre a lâmina, cobrir com parafilme e incubar por uma hora em câmara úmida a 37°C; e) Lavar as lâminas três vezes em 2xSSC por cinco minutos cada; f) Lavar as lâminas em 1xPBS sobre agitação por cinco minutos; g) Desidratar as lâminas na série alcoólica citada acima por cinco minutos cada e secar as lâminas a temperatura ambiente; h) Desnaturar o DNA cromossômico em formamida 70% (70mL de formamida deionizada; 30mL de 2xSSC) por três minutos e 30 segundos a 70°C; i) Desidratar a lâmina em série alcoólica gelada (70%; 90% e 100%) (\pm -20°C), durante cinco minutos cada, e secar ao ar; j) Enquanto as lâminas são passadas na série alcoólica, desnaturar a solução de hibridização (6 μ L de sonda e 24 μ L de tampão de hibridização) em termociclador por 10 minutos a 95°C; k) Adicionar 30 μ L de solução de hibridização sobre a lâmina, cobrir com lamínula e deixar *overnight* em câmara úmida a 37°C; l) Lavar as lâminas duas vezes em formamida 15% (15mL de formamida deionizada; 85mL de 2xSSC) sobre agitação por cinco minutos a 42°C; m) Lavar as lâminas em solução de Tween 0,5% sobre agitação por cinco minutos em temperatura ambiente; n) Lavar as lâminas em tampão de bloqueio NFDM (20mL de 20xSSC; 5g de leite em pó desnatado; 80mL de água destilada) por 15 minutos a temperatura ambiente; o) Lavar as lâminas duas vezes em solução de Tween 0,5% com agitação por cinco minutos cada em temperatura ambiente; p) Incubar cada lâmina com 2 μ L de Alexa-Fluor 488 e 28 μ L de tampão de bloqueio durante uma hora em câmara úmida a 37°C; q) Lavar as lâminas três vezes em solução de Tween 0,5% com agitação durante cinco minutos cada a temperatura ambiente; r) Desidratar as lâminas em série alcoólica por cinco minutos, deixar secar ao ar; s) Colocar 20 μ L de DAPI/Vectashield®, cobrir com lamínula, retirar o excesso com papel filtro e selar as laterais da lamínula com esmalte incolor; t) Observar e fotografar as lâminas em microscopia de fluorescência com os filtros adequados conforme descrito no item 3.2.10.

3.2.9. Técnica de imunocitogenética

A preparação das lâminas e detecção de modificações epigenéticas nos cromossomos de *T. paraguayensis* foi realizada de acordo com o procedimento descrito a seguir: a) Dissecar os exemplares em solução fisiológica; b) Fixar os testículos com 1mL de paraformaldeído 2% (2,5mL de paraformaldeído 8%; 5 μ L de Triton 100X; 1mL de 10xPBS; 6,5 mL de água destilada) em tubos de microcentrífuga; c) Manter os tubos deitados e sobre agitação leve de 40rpm por 40 minutos; d) Descartar o paraformaldeído e adicionar o mesmo volume de 1xPBS; e) Manter em agitação por 10 minutos; f) Repetir duas vezes as lavagens em 1xPBS sobre agitação; g) Colocar um pedaço do testículo sobre a lâmina com uma gota de 1xPBS; h) Soltar a lamínula sobre o material, bater com bastão de metal para dissociar o tecido e, depois, apertar a lamínula com o dedo; i) Retirar o excesso de 1xPBS com papel toalha; j) Retirar a lamínula em nitrogênio líquido. a) Adicionar 90 μ L de solução bloqueadora BSA (3%) (0,3g de BSA, 5 μ L de Tween 20, 10mL de 1xPBS); b) Cobrir com parafilme e incubar em câmara úmida por 10 minutos a temperatura ambiente; c) Retirar o parafilme e o excesso da solução bloqueadora e adicionar 30 μ L do anticorpo primário policlonal da Abcam para H3K9ac (1:300), H4K5ac (1:200), H3S10f (1:300), H3K4me2 (1:100), H3K9me2 (1:100) e H3K9me3 (1:200) diluído em BSA 3%; d) Cobrir com parafilme e incubar em câmara úmida a 4°C *overnight*; e) Retirar o parafilme e lavar as lâminas três vezes em 1xPBS por cinco minutos cada; f) Adicionar 30 μ L do anticorpo secundário Goat anti-rabbit IgG H&L Alexa fluor® 488 (1:300 para os anticorpos: H3K9ac, H4K5ac, H3S10f, H3K4me2, H3K9me2; 1:600 para o anticorpo H3K9me3) diluído em solução bloqueadora; g) Cobrir com parafilme e incubar em câmara úmida por três horas a temperatura ambiente; h) Retirar o parafilme e lavar as lâmina três vezes em 1xPBS por cinco minutos cada; i) Retirar o excesso de 1xPBS e montar a lâmina com DAPI/Vectashield®.

3.2.10. Análises cromossômicas

As análises dos cromossomos corados convencionalmente ou submetidos à técnica de impregnação por íon prata foram realizadas em microscopia de luz. As análises dos cromossomos corados com fluorocromos, tais como os submetidos às técnicas de bandeamento C, FISH e imunocitogenética foram realizadas em microscopia de fluorescência com filtros específicos para DAPI (360-390nm) e FITC (496-520nm). Em ambos os casos, as melhores células mitóticas e meióticas foram fotografadas em um fotomicroscópio Olympus BX51 ou Zeiss Imager A2 com objetiva de 100X de imersão, optovar 1,6 utilizando o software DP Controller ou Axio Vision, respectivamente. As imagens escolhidas para apresentação neste trabalho foram editadas através dos programas Corel Photo-Paint X4 e Corel Draw Graphics Suite X4.

3.2.11 Medições cromossômicas

As medições cromossômicas de bivalentes e/ou de associações multivalentes encontradas em células pós-paquitênicas foram realizadas através do programa Image J (Image Processing and Analysis in Java) desenvolvido pela Research Service Branch of the US National Institute of Mental Health. Posteriormente, foi determinado o comprimento diploide total (DSL) e o coeficiente de variação ($CV = \text{desvio padrão} / \text{média}$ multiplicado por 100) no programa Microsoft® Excel® 2010 para fins de comparação dos valores obtidos. Levando-se em conta que o grau de variação de condensação cromossômica entre as células foi heterogêneo, nós consideramos diferenças no valor de CV maior que 20% como estatisticamente significante, conforme sugerido por Gomes (1982). Alternativamente, o DSL foi comparado com a análise de componentes principais (PCA), através do software Past (Paleontological Statistics), versão 2.17.

4. RESULTADOS

Os resultados obtidos com a análise cromossômica de seis espécies de *Tityus* (*Archaeotityus*) serão apresentados em três capítulos, mencionados a seguir:

Capítulo I

“High variability of multivalent associations in holocentric chromosomes of *Tityus* (*Archaeotityus*) scorpions (Scorpiones: Buthidae)”

Teve como objetivo compreender os rearranjos cromossômicos responsáveis pela variabilidade intraespecífica de número diploide e a presença de longas cadeias na meiose. Desta forma, apresenta descrições cromossômicas referentes ao número diploide, comportamento dos cromossomos na meiose, no que diz respeito à variabilidade de associações multivalentes e segregação dos cromossomos, identificação de regiões cromossômicas específicas, tais como, regiões organizadoras do nucléolo, heterocromatina constitutiva e localização de sequências repetitivas de rDNA 28S e teloméricas (TTAGG)_n em cinco espécies de *Tityus* (*Archaeotityus*) brasileiras – *Tityus clathratus*, *Tityus maranhensis*, *Tityus paraguayensis*, *Tityus pusillus* e *Tityus silvestris*.

Capítulo II

“Modificações epigenéticas em cromossomos holocêntricos de *Tityus paraguayensis* (Scorpiones: Buthidae)”

O objetivo deste trabalho foi descrever o padrão de modificação de histonas (H3K9ac, H4K5ac, H3S10f, H3K4me2, H3K9me2 e H3K9me3) bem como o papel de cada uma delas, principalmente em relação à transcrição, condensação e segregação dos cromossomos holocêntricos de *Tityus paraguayensis* em fases meióticas e pós-meióticas.

Capítulo III

“Citogenética populacional de *Tityus mattogrossensis* (Scorpiones: Buthidae)”

Teve como objetivo realizar uma análise citogenética populacional em *Tityus mattogrossensis*. Desta forma, apresenta descrições do número diploide e do comportamento dos cromossomos durante a meiose, identificação de regiões cromossômicas específicas tais como, regiões organizadoras do nucléolo, heterocromatina constitutiva e localização de sequências repetitivas de rDNA 28S e teloméricas (TTAGG)_n em seis populações de *Tityus mattogrossensis*.

CAPÍTULO I

High variability of multivalent associations in holocentric chromosomes of *Tityus* (*Archaeotityus*) scorpions (Scorpiones: Buthidae)

Viviane Fagundes Mattos¹, Leonardo Sousa Carvalho²; Marcos André Carvalho³; Marielle
Cristina Schneider⁴

¹Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Rio Claro, São Paulo, Brazil

²Universidade Federal do Piauí, UFPI, Floriano, Piauí, Brazil

³Universidade Federal de Mato Grosso, UFMT, Cuiabá, Mato Grosso, Brazil

⁴Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, Diadema, São Paulo, Brazil

Introduction

Karyotype comparisons between most species of plants and animals have revealed chromosomal differences on large-scale (Reig and Kiblicky 1969, Freitas 1997, Cook 2000, Murray and Young 2001, Paresque et al. 2004, Poletto et al. 2010, Gokhman et al. 2017). More recently, genome-scanning technologies have also shown that submicroscopic chromosomal variants are more common than previously thought (Lee et al. 2005, Feuk et al. 2006, Emanuel e Saitta 2007). These microscopic and submicroscopic chromosomal variants can have an important role in the species evolution, promoting changes in gene expression and influencing aspects of local adaptation of individuals (White 1978, Larson et al. 1984, King 1993, Rieseberg 2001, Burt 2002, Olmo 2005, Faria and Navarro 2010). The rearrangements that originate the chromosome variants frequently reduce the fertility in hybrids due to problems of chromosome segregation in meiosis and generation of unbalanced gametes with duplication or deletions. Nevertheless, the unbalanced gametes can be suppressed when the chromosomal rearranged regions are protected from recombination (Rieseberg 2001, Faria and Navarro 2010).

The karyotype changes are originated by deletions, duplications, inversions or translocations, and occur in both holocentric and monocentric chromosomes (Luceño and Guerra 1996, Burt 2002). In holocentric, all chromosome segments arising from rearrangements might segregate normally to the poles due to the attachment of the microtubules along the entire chromosome length (Dernburg 2001, Nagaki et al. 2005, Melters et al. 2012). However, in monocentric chromosomes the rearrangements can give rise to acentric or dicentric fragments, which are frequently lost during the cell division (Dernburg 2001).

Chromosomal heterozygosity originated by translocation, fusion or fission can lead to the association of many chromosomes at meiosis I, forming trivalents,

quadrivalents even multivalents. The multivalent associations of more than four chromosomes are rare, although they have already been observed in some plants (Sharma and Gohil 2003), invertebrate (John and Quraishi 1963, Chinnappa and Vitor 1979, Shanahan 1989, Sharp and Rowell 2007, Mattos et al. 2013, Plisková et al. 2016) and vertebrate species (Lourenço et al. 2000, Siqueira-Jr et al. 2004, Gruetzner et al. 2006, Carvalho et al. 2009, Gross et al. 2009, Gazoni et al. 2012). These multi-chromosomal associations can be formed by rearrangements encompassing both autosomes and sex chromosomes or only autosomes. Generally, the multivalent associations appeared as a linear chain when including the sex chromosomes, and as a ring configuration when are formed only by autosomes (Martins and Mesa 1995, Gruetzner et al. 2006, Sharp and Rowell 2007, Gazoni et al. 2012). Furthermore, in some cases, the multivalent associations vary in the number of chromosomes within a species, such as observed in the cockroach *Periplaneta americana* $2n=33$ (rings with four, six or eight chromosomes) (John and Lewis 1958, John and Quraishi 1963) and in the spider *Delena cancerides* $2n=22-43$ (linear chains from three to 19 chromosomes) (Sharp and Rowell 2007), or, rarely, within an individual, such as encountered in one population of the plant *Allium roylei* ($2n=16$) (cells with one trivalent and also cells with a complex multivalent association comprising all chromosomes of the diploid set) (Sharma and Gohil 2003).

Scorpiones is an intriguing group that includes a high incidence of heterozygous chromosome rearrangements. In addition, the family Buthidae combines three unusual cytogenetic features: holocentric chromosomes, multivalent-meiotic association and achiasmate meiosis in males (Shanahan 1989, Schneider et al. 2009a, Mattos et al. 2013, Adilardi et al. 2015). The multivalent associations in meiosis were observed in 50% of the species included in eight different buthid genera (Piza 1947a, 1950a, 1955, 1957, Sharma et al. 1959, Shanahan 1989, Schneider et al. 2009a, Mattos et al. 2013, Adilardi

et al. 2015, 2016, Almeida et al. 2017). The number of chromosomes involved in these chains (C) can vary within the species, e.g. *Isometrus maculatus* ($2n=12$) with CIV, CVI and CVIII (Piza 1947a, 1950a, 1955); *Lychas marmoreus* ($2n=12-15$) with seven bivalents (II) and chains of CIV, CVI, CVIII, and CX chromosomes (Shanahan 1989, Shanahan and Hayman 1990); *Rhopalurus agamemnon* ($2n=28$) with 14II and CXXVIII; *Rhopalurus rochai* ($2n=28$) with CVIII, CX and CIV+CVIII (Mattos et al. 2013). However, the most extreme variability of chromosomal configurations was observed in the genus *Tityus*. In *T. bahiensis* ($2n=5-19$), in addition to differences in specimens with the same diploid number (for example: $2n=9$ – CIII, CIV, CVII; $2n=10$ – CIII, CIV, CVI, CVII, CX) (Piza 1940, 1943, 1948, 1950b, Takahashi 1976, Schneider et al. 2009a) variations among the cells from a same individual was also registered, i.e., one specimen with $2n=6$ exhibited cells with three well-paired elements resembling bivalents and others with one multivalent association of six chromosomes (Schneider et al. 2009a). *Tityus paraguayensis* ($2n=16$) showed in a same individual, cells with 8II and polyploidy cells, which included chromosomal chains composed by a variable number of elements ($5II+3CIV+CVIII$) (Mattos et al. 2013).

In buthid scorpions, heterozygous reciprocal translocations or fission/fusion were the rearrangements responsible for the origin of these multi-chromosomal associations in meiosis I (Shanahan 1989, Schneider et al. 2009a, Mattos et al. 2013, Adilardi et al. 2015). The mechanisms responsible for the correct chromosome pairing and segregation of long chromosomal chains are still poorly known. Nevertheless, it has been demonstrated that a permissive meiosis, which allows the correct alignment and alternate segregation of the chromosomes involved in complex chains, is necessary to maintain the fertility and to produce balanced gametes (Gruetzner et al. 2006, Sharp and Rowell 2007). Moreover, considering that only a small number of species has routinely shown multi-chromosomal association in meiosis, it seems that there is a genetic ability

to balanced segregation of chromosomal chains (Gruetzner et al. 2006; Sharp and Rowell 2007).

In this work, we examined five species of *Tityus* (*Archaeotityus*) from Brazilian fauna, using standard and molecular cytogenetic techniques with the particular focus on understanding the rearrangements responsible for intraspecific variability of diploid number and presence of long chromosomal chains in meiosis. In order to access any interpopulational diversity, in three species we studied individuals from distinct localities as shown in Figure 1.

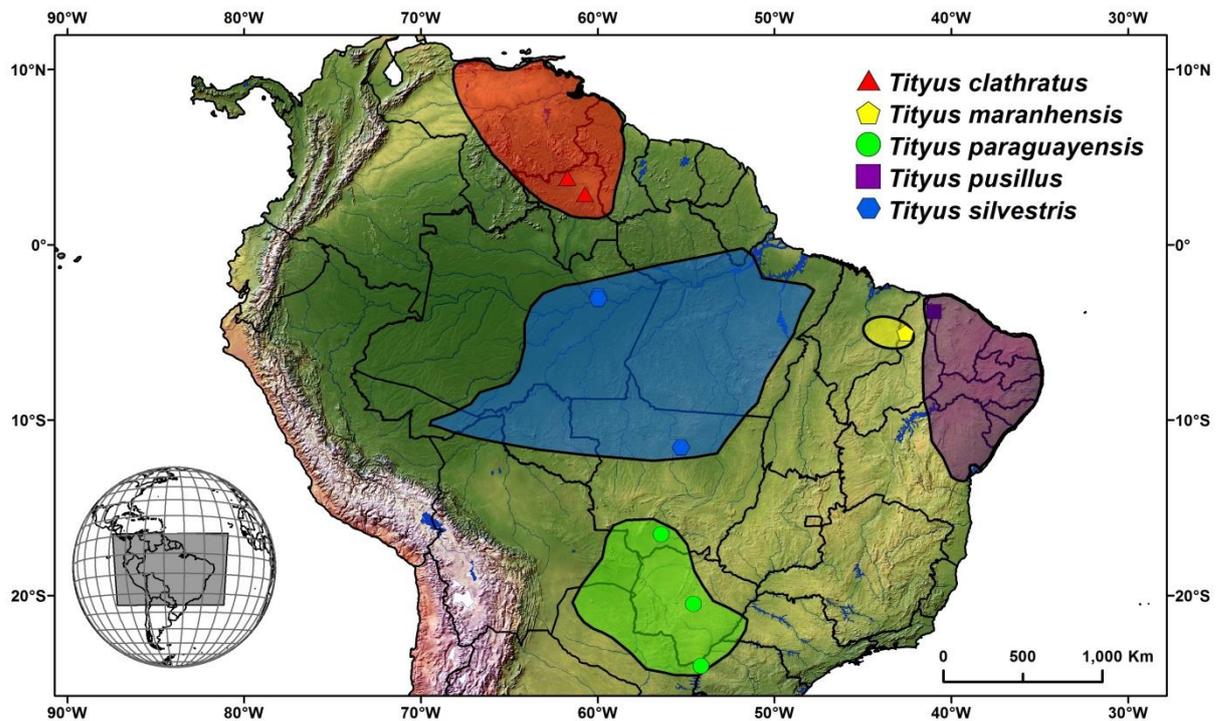


Figure 1 – Distribution and occurrence area of the scorpions samples from Brazil analyzed in this work.

Material and Methods

A sample of 93 scorpions of the subgenera *Tityus* (*Archaeotityus*), belonging to five species was investigated in this work. The data concerning the number of analyzed individuals of each species and the collection localities are listed in Table 1. The

20xSSC, 20% DNA probe) was denatured in thermocycler for 10 min at 95°C, and applied on the slides, which were maintained in humid chamber overnight at 37°C. Post-hybridization washes were performed twice in 15% formamide/2xSSC for 5 min each at 42°C, and 0.5% Tween for 5 min at room temperature. The chromosome spreads were counterstained with DAPI/Vectashield. The images of the mitotic and meiotic cells were captured in a Zeiss Imager A2 microscope coupled to a digital camera, using the Axio Vision software.

For four these cytogenetically analyzed species, *T. clathratus*, *T. paraguayensis*, *T. pusillus* and *T. silvestris*, all cells encountered in each slide were photographed. The number of cells per individual and the chromosome configuration observed in postpachytene nuclei are mentioned in Tables 2 and 3. The cells with variable number of chromosomes were grouped in the category “variable number” (VN) and those in which the chromosome configurations were not determined due to the complexity of chromosome chain was categorized as “not determined” (ND). The diploid set length (DSL) was determined for two males of *T. clathratus* (CHNUFPI 1853 and CHNUFPI 1863), which showed differences in the number of bivalents but equal number of chromosomes involved in the multivalent associations. For establishing the DSL, 42 postpachytene cells with similar degree of chromosome condensation were measured, using the Image J software (Image Processing and Analysis in Java) developed at the Research Services Branch of the US National Institute of Mental Health. The obtained values of the DSL were compared by coefficient of variation (CV). Due to the heterogeneous degree of chromosome condensation among the cells, CV values up to 20% were considered as statistically significant (Gomes, 1982). For specimens of *T. clathratus*, *T. paraguayensis* and *T. pusillus* with odd diploid number, the data of metaphase II cells were statistically compared by the chi-square test (df=1) (Table 4).

Table 1. *Tityus* scorpions analyzed in this work, including the number of specimens and the collection localities in Brazilian states. AM=Amazonas, CE=Ceará, MS=Mato Grosso do Sul, MT=Mato Grosso, PI=Piauí, PR=Paraná, RR=Roraima.

Species	Number of individuals	Collection localities
<i>Tityus clathratus</i> C. L. Koch, 1844	14♂/1♀	Amajari (3°47'N, 61°43'W), RR
	1♂	Boa Vista (2°52'N, 60°43'W), RR
<i>Tityus maranhensis</i> Lourenço, de Jesus Junior and Lima de Oliveira, 2006	5♂	Floresta Nacional dos Palmares (05°03'S, 42°35'W), Altos, PI
<i>Tityus paraguayensis</i> Kraepelin, 1895	1♂	Base de estudos do Pantanal (16°30'S, 56°25'W), Poconé, MT
	1♂	Ilha Rodrigues Saraiva (24°01'S, 54°10'W), Guaira, PR
	1♂	Ilha São Francisco (24°01'S, 54°10'W), Guaira, PR
	26♂	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (20°29'S, 54°36'W), Campo Grande, MS
<i>Tityus pusillus</i> Pocock, 1893	23♂/1♀	Serra da Ibiapaba (03°49'S, 40°59'W), Ubajara, CE
<i>Tityus silvestris</i> Pocock, 1897	9♂/3♀	Fazenda Continental (11°34'S, 55°17'W), Claudia, MT
	2♂	Reserva Florestal Adolpho Ducke (02°55'S, 59°58'O), Manaus, AM
	5♂	Universidade Federal do Amazonas (03°06'S, 59°58'W), Manaus, AM
Total	88♂/5♀	

Results

Conventional Giemsa staining

The chromosomes of all species studied in this work (Table 1) are holocentric, exhibited synaptic and achiasmatic behavior during the male meiosis I, and multivalent associations in postpachytene cells. An intraspecific variability of the diploid number and chromosomes involved in the chains was observed in the analyzed species (Tables 2-3). *Tityus maranhensis* showed chromosomal features similar to that previously registered by Mattos et al. (2013), thus we describe this species only regarding molecular cytogenetic techniques.

Mitotic metaphase cells of four *Tityus* (*Archaeotityus*) species showed the following diploid numbers: $2n=19$ and $2n=20$ in *T. clathratus* (Fig. 2A, C) and *T. pusillus* (Fig. 2I-J); $2n=16$, $2n=17$ and $2n=18$ in *T. paraguayensis* (Fig. 2E-G); $2n=16$ and $2n=24$ in *T. silvestris* (Fig. 2L, N-O). The diploid number variability occurred within the population in *T. clathratus*, *T. paraguayensis* and *T. pusillus*, and between the

populations in *T. silvestris* (Tables 2-3). The chromosomes of all species gradually decreased in size (Fig. 2). However, in *T. clathratus*, a difference in the chromosome size was verified in specimens with $2n=19$, which presented one chromosome slightly larger than the other elements of the diploid set (Fig. 2A). Three individuals of *T. silvestris* ($2n=24$) showed a terminal constriction in two chromosomes (Fig. 2O). Due to the lack of mitotic metaphase cells, the diploid number was not determined for three males and one female of *T. clathratus*, two males of *T. paraguayensis*, 10 males of *T. pusillus*, two males and three females of *T. silvestris*.

Most pachytene nuclei of all species analyzed here presented overlapped bivalents, making it difficult to establish the total number of double filaments (Fig. 3A-C). Unsynapsed interstitial and/or terminal chromosomal segments were observed in early pachytene cells of *T. clathratus* ($2n=19-20$) and *T. paraguayensis* ($2n=17$); these regions were generally continuous with completely paired segments (Fig. 3A). The total synapsis of the chromosomes was verified in late pachytene cells, in which a multivalent association was also visualized (Fig. 3B-C). Some late pachytene cells of *T. clathratus*, *T. paraguayensis*, *T. pusillus* and *T. silvestris* showed continuous and entirely synapsed chromosomes (Fig. 3B-I). In *T. clathratus* ($2n=20$) and *T. silvestris* ($2n=24$), 10 and 12 bivalents, were respectively identified (Fig. 3B, I). *Tityus paraguayensis* and *T. silvestris* with $2n=16$ presented eight bivalents (Fig. 3D, H), whilst *T. paraguayensis* with $2n=17$ and $2n=18$ exhibited nine bivalents (Fig. 3E). In *T. pusillus*, pachytene cells of a same individual showed a variable number of bivalents, i.e., nine or 10 (Fig. 3F-G).

The number and percentage of postpachytene cells with different chromosomal configuration were compiled in Tables 2 and 3. In the four *Tityus* species, the multi-chromosomal associations appeared closed in most postpachytene cells, and opened or totally disorganized in later substage of meiosis I (Fig. 4-5).

The postpachytene spermatocytes of *T. clathratus* from Boa Vista showed 10 bivalents with chromosomes disposed side by side (Fig. 4A). In the sample from Amajari, 11 different chromosome configurations were recognized in meiosis I (Table 2), including variable number of bivalents and chains with nine (CIX) (Fig. 4B-C), ten (CX) (Fig. 4D-F), 11 (CXI) (Fig. 4H-J) or 13 (CXIII) chromosomes (Fig. 4K-L). The postpachytene configurations most frequently observed were 3II+CXI (Fig. 4H) and 4II+CXI (Fig. 4I) in specimens with $2n=19$, and 4II+CX (Fig. 4E) and 5II+CX (Fig. 4F) in males with $2n=19$ and $2n=20$. The DSL were determined for two specimens of *T. clathratus* (CHNUFPI 1853; 1863), which presented a same number of chromosomes in the chains but a variable number of bivalents (see Table 2). The averages the DSL and the CV were: specimen 1853 – 147 μ m (3II+CX), 163 μ m (4II+CX), 175 μ m (5II+CX) (CV=10.80); specimen 1863 - 139 μ m (2II+CXI), 137 μ m (3II+CXI), 179 μ m (4II+CXI) (CV=15.86). In late postpachytene nuclei, the chains were organized in zigzag, indicating the correct orientation of the chromosomes for segregation in the anaphase I (Fig. 4N).

In *T. paraguayensis* with $2n=16$ and $2n=18$, postpachytene nuclei exhibited eight and nine bivalents, respectively (Fig. 4O-P). In some cells, the bivalents revealed conspicuous regions with low degree of condensation and presence of gaps (Fig. 4Q). In specimens with $2n=17$, the configuration commonly observed was 5II+CVII (Fig. 4R-S). Additionally, late postpachytene cells showed the disorganization of the multivalent association (Fig. 4U-V). Metaphase I nuclei showed nine bivalents (Fig. 4W); in anaphase I, the total disassembly of the bivalents and multi-chromosomal associations were verified (Fig. 4X).

The specimens of *T. pusillus* with $2n=20$ exhibited 10II and 7II+CVI (Fig. 5A, E). The number of bivalents and chromosome chains in males with $2n=19$ could be categorized in 8II+CIII (Fig. 5B), 7II+CIV (Fig. 5C) and 7II+CV (Fig. 5D). Additionally, one specimen (253) presented polyploidy in 9.33% of its postpachytene cells, due to the

occurrence of a higher number of bivalents and multi-chromosomal associations (Fig. 5F-G). Metaphase I cells showed nine bivalents and one univalent, with the early segregation of some chromosomes (Fig. 5H).

Postpachytene nuclei of *T. silvestris* with $2n=16$ showed $2II+CXII$ (Fig. 5K). In late postpachytene cells, the zigzag disposition of the chromosomes of the chain was verified (Fig. 5L). All specimens with $2n=24$ presented $11II$ or $12II$ (Fig. 5I-J). In some cells, a subterminal constriction was visible in one bivalent (Fig. 5I-J).

In the four species, more than 70% of metaphase II nuclei revealed the expected haploid number (Fig. 6), i.e. $n=8$ in *T. paraguayensis* ($2n=16$) and *T. silvestris* ($2n=16$) (Fig. 6C, G); $n=8$ and $n=9$ in *T. paraguayensis* ($2n=17$) (Fig. 6C-D); $n=9$ in *T. paraguayensis* ($2n=18$) (Fig. 6D); $n=9$ and $n=10$ in *T. clathratus* ($2n=19$) and *T. pusillus* ($2n=19$) (Fig. 6A-B, E-F); $n=10$ in *T. clathratus* ($2n=20$) and *T. pusillus* ($2n=20$) (Fig. 6B, F); $n=12$ in *T. silvestris* ($2n=24$) (Fig. 6H). To evaluate the difference between the haploid number observed and expected, metaphase II cells of the specimens with odd diploid number were subjected to chi-square test. The results are shown in Table 4, indicating a statistically significant divergence in only one individual.

Conventional banding and molecular cytogenetics

The mitotic metaphase cells of *T. clathratus*, *T. paraguayensis*, *T. pusillus* and *T. silvestris* revealed Ag-NORs localized on subterminal or terminal regions of two chromosomes (Fig. 2B, D, H, K, M, P). In *T. clathratus* and *T. paraguayensis*, the NORs occurred on small-sized chromosomes whereas in *T. pusillus* and *T. silvestris* on medium-sized chromosomes. Additionally, the association of the NORs with the prominent terminal constriction was visible in *T. silvestris* (Fig. 2P).

The number of Ag-NORs was confirmed by FISH with 28S rDNA (Fig. 7). However, the analysis of postpachytene cells revealed that the ribosomal cistrons were

not localized in well-paired meiotic elements resembling bivalents in all species. *Tityus clathratus* (10II) showed ribosomal cistrons in the terminal region of one bivalent (Fig. 7C). The specimens of *T. maranhensis* ($2n=20$) presented an intraspecific variation in the number of bivalents (9II and 10II), but in both cases, only one bivalent was carrier of the ribosomal cistrons (Fig. 7D-E). The same pattern of 28S rDNA localization was observed in postpachytene nuclei of *T. paraguayensis* with 8II (Fig. 7F), 9II (Fig. 7G) and 5II+CVII (Fig. 7H), and *T. pusillus* with 10II (Fig. 7I) and 7II+CIV (Fig. 7J). On the other hand, *T. silvestris* with 2II+CXII revealed ribosomal genes localized in two chromosomes involved in the multivalent association (Fig. 7K). Mitotic metaphase cells revealed ribosomal sites in the terminal region of two chromosomes (Fig. 7L-N). Frequently, the 28S rDNA loci were easier observed in terminal/subterminal region of one chromosome, revealing a difference between the homologues in the size of the ribosomal cistron. In *T. silvestris* ($2n=24$), the 28S rDNA sites were coincident with the constriction present in one chromosome pair (Fig. 7N). Metaphase II cells frequently showed ribosomal sites localized in only one chromosome, indicating the correct and balanced chromosome segregation (Fig. 7O).

Cytological preparations of *T. pusillus* ($2n=20$) and *T. silvestris* ($2n=16$) subjected to C-banding and subsequently stained with DAPI presented small blocks of constitutive heterochromatin in terminal regions of two chromosomes (Fig. 8A-B). Moreover, tenuous C-bands were observed in the interstitial region of some chromosomes of *T. silvestris*.

In the five *Tityus* species, FISH with (TTAGG) $_n$ probe revealed typical telomeric signals in all chromosomes or at least in one chromosome end (Fig. 8C-J). Additionally, no evidence of positive signals in interstitial region of the chromosomes was observed in the analyzed species. Interphase nuclei revealed bright-labeled regions in one nuclear pole, indicating the clustering of telomeres forming the bouquet (Fig. 8C). Early prophase

I cells exhibited the brightest telomeric signals due to the low degree of chromosome condensation (Fig. 8D-E). Postpachytene nuclei also revealed bright-labeling localized only in the terminal region of the bivalents and/or chromosomes of the chains (Fig. 8F-H). Mitotic metaphase cells and metaphase II cells showed positive signals in almost all chromosome ends (Fig. 8I-J).

Table 2 – Percentages and number of cells (parentheses) of the chromosome configurations at male postpachytene cells of *Tityus clathratus*. ND=not determined. VN=variable number. C=Chain. II=bivalent. The Roman numeral indicates the number of chromosomes in the chain. CHNUFPI=Coleção de História Natural of the Universidade Federal do Piauí.

Species/Populations	Chromosome configuration in postpachytene cells													VN	ND	Total
	10II	1II+CXIII	2II+CXI	3II+CX	3II+CXI	3II+CXIII	4II+CIX	4II+CX	4II+CXI	5II+CIX	5II+CX	5II+CXI				
<i>Tityus clathratus</i>																
Amajari – 2n=19																
CHNUFPI 1873	-	19.4 (7)	-	-	-	30.6 (11)	-	-	-	-	-	-	44.4 (16)	5.6 (2)	36	
CHNUFPI 1863	-	-	23.7 (9)	-	15.8 (6)	-	-	-	18.4 (7)	-	-	-	36.8 (14)	5.3 (2)	38	
677	-	-	-	-	16.7 (3)	-	-	22.2 (4)	22.2 (4)	-	-	-	33.3 (6)	5.6 (1)	18	
CHNUFPI 1875; 1927	-	-	-	-	-	-	-	-	35.3 (36)	-	-	-	54.9 (56)	9.8 (10)	102	
CHNUFPI 1858	-	-	-	-	-	-	-	13.6 (8)	15.3 (9)	-	-	-	62.7 (37)	8.5 (5)	59	
CHNUFPI 1852	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10.5 (9)	18.6 (16)	9.3 (8)	44.2 (38)	17.4 (15)	86	
CHNUFPI 1870; 1871	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	90.3 (37)	9.8 (4)	41	
Amajari – 2n=20																
CHNUFPI 1853	-	-	-	16.9 (12)	-	-	-	11.3 (8)	-	-	21.1 (15)	-	46.5 (33)	4.2 (3)	71	
Amajari – 2n=?																
CHNUFPI 1850	-	-	-	-	-	-	8.82 (3)	17.7 (6)	-	-	-	-	47.1 (16)	26.5 (9)	34	
Boa Vista – 2n=20																
CHNUFPI 1860	69,6 (16)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	30.4 (7)	-	23	

Table 3 –Percentages and number of cells (parentheses) of the chromosome configurations at male postpachytene cells of *Tityus* species. ND=not determined. VN=variable number. PO=polyploid cells. C=Chain. II=bivalent. The Roman numeral indicates the number of chromosomes in the chain. CHNUFPI=Coleção de História Natural of the Universidade Federal do Piauí.

Species/ Populations	Chromosome configuration in postpachytene cells													Total	
	8II	9II	10II	12II	2II+CXII	5II+CVII	5II+CVIII	7II+CIV	7II+CV	7II+CVI	8II+CIII	PO	VN		ND
<i>Tityus paraguayensis</i>															
Poconé – 2n=16 579	46.7 (14)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	53.3 (16)	-	30
Guaira – 2n=16 CHNUFPI 1841	63.2 (12)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	36.9 (7)	-	19
Campo Grande – 2n=17 1331; 1333; 1339; 1570; 1574	-	-	-	-	-	30.2 (49)	-	-	-	-	-	-	42.6 (69)	27.16 (44)	162
1322	-	-	-	-	-	26.3 (26)	11.11 (11)	-	-	-	-	-	43.4 (43)	19.20 (19)	99
Campo Grande – 2n=18 1328; 1324; 1330; 1332; 1341; 1346; 1347; 1348; 1356; 1357; 1568; 1569; 1571; 1572; 1575; 1583; 1584	-	80.0 (762)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	18.0 (171)	2.00 (19)	619
<i>Tityus pusillus</i>															
Ibiapaba – 2n=19 UFMG 15200	-	-	-	-	-	-	-	34.5 (31)	-	-	32.2 (29)	-	25.6 (23)	7.77 (7)	90
257	-	-	-	-	-	-	-	12.5 (5)	25.0 (10)	-	-	-	45.0 (18)	17.5 (7)	40
253	-	-	-	-	-	-	-	14.7 (11)	45.3 (34)	-	-	9.33 (7)	22.7 (17)	8.0 (6)	75
Ibiapaba – 2n=20 235; 239; 241; 246; 247; 252; 257	-	-	85.6 (161)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14.4 (27)	-	188
236; 255; 242	-	-	-	-	-	-	-	-	-	58.1 (136)	-	-	36.8 (86)	5.1 (12)	234
UFMG 15198	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12.7 (5)	-	-	26.8 (11)	61.0 (25)	41
Ibiapaba – 2n=? CHNUFPI 1336;UFMG 15205; 15206; 15211	-	-	78.3 (18)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	21.7 (5)	23
<i>Tityus silvestris</i>															
Cláudia – 2n=16 CHNUFPI 1804; 1806; 1816; 1818; 466; 467; 493; 494; 582	-	-	-	-	36.5 (155)	-	-	-	-	-	-	-	25.41 (108)	38.1 (162)	425
Manaus, Ducke – 2n=24 AM; 1466	-	-	-	16.7 (4)	-	-	-	-	-	-	-	-	83.3 (20)	-	24
CHNUFPI 1835	-	-	-	44.4 (8)	-	-	-	-	-	-	-	-	55.6 (10)	-	18
Manaus, UFAM – 2n=24 CHNUFPI 1795; 1796; 1797; 1474; 1476	-	-	-	47.5 (38)	-	-	-	-	-	-	-	-	51.2 (41)	1.3 (1)	80

Table 4 – Statistical comparison between the numbers of metaphase II cells observed and expected in *Tityus* species. The expected number is shown in parentheses. Degree of freedom=1. * Statistically significant value.

Species	Diploid number and postpachytene configuration	Haploid number observed and expected in metaphase II cells		χ^2
		n=9	n=10	
<i>Tityus clathratus</i>	19 = 4II+CXI	8 (10)	12 (10)	0,8
	19 = 4II+CX; 4II+CXI	11 (12)	13 (12)	0,16
	19 = 5II+CIIX; 5II+CX; 5II+CXI	1 (7)	13 (7)	10,28*
<i>Tityus paraguayensis</i>	17 = 5II+CVII	5 (6.5)	8 (6.5)	0,7
	17 = 5II+CVII; 5II+CVIII	12 (10)	8 (10)	0,8
<i>Tityus pusillus</i>		n=9	n=10	
	19 = 7II+CIIV; 7II+CV	6 (9)	12 (9)	2,0

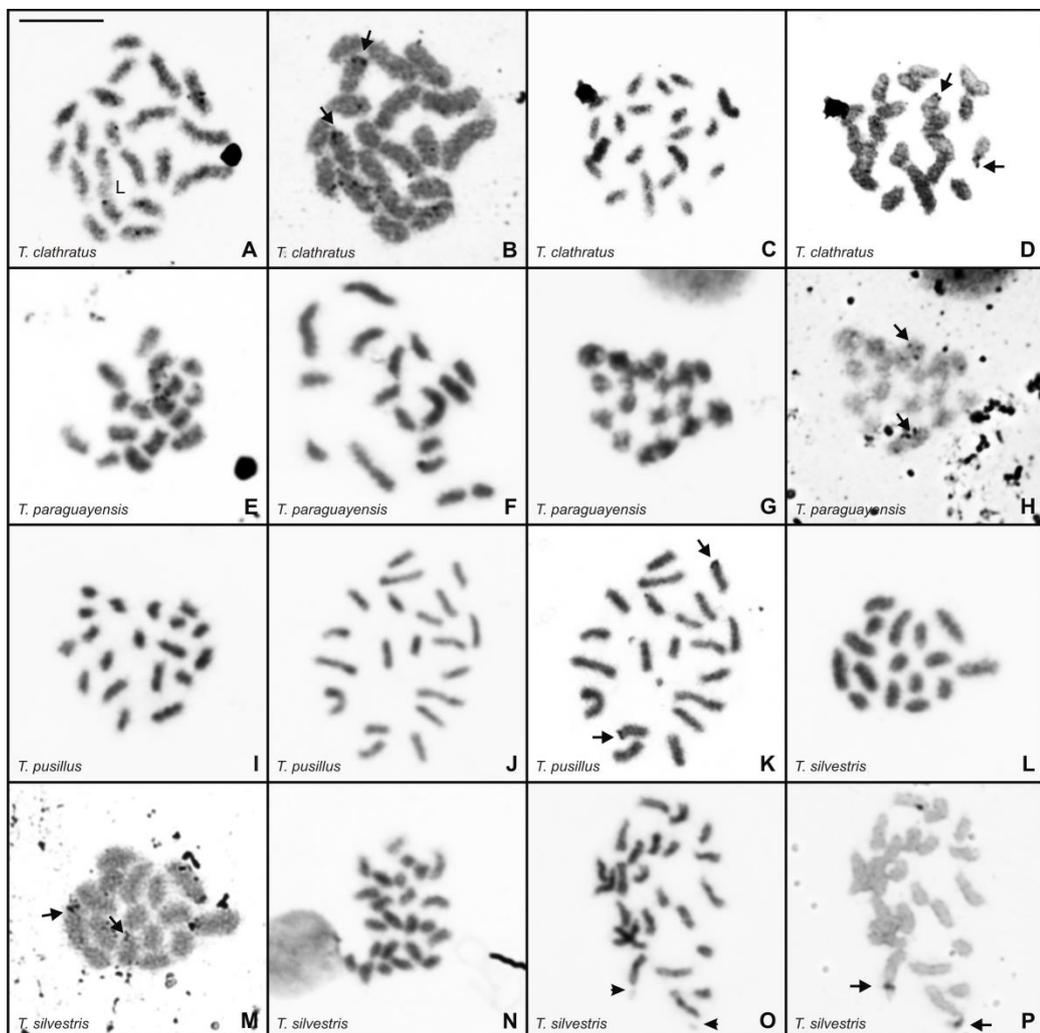


Figure 2 - Mitotic metaphase cells of *Tityus* species after Giemsa staining (A, C, E-G, I-J, L, N-O) and silver impregnation (B, D, H, K, M, P). A-D. *Tityus clathratus*, $2n\♂=19$ (A-B) and $2n\♂=20$ (C-D). E-H. *Tityus paraguayensis*, $2n\♂=16$ (E), $2n\♂=17$ (F) and $2n\♂=18$ (G-H). I-K. *Tityus pusillus*, $2n\♂=19$ (I) and $2n\♀=20$ (J-K). L-P. *Tityus silvestris*, $2n\♂=16$ (L-M) and $2n\♂=24$ (N-P). In all species, the nucleolar organizer regions (NORs=arrows) were localized on the subterminal or terminal regions of two chromosomes. L=large chromosome size. Arrowhead=constriction. Scale bar=10 μ m.

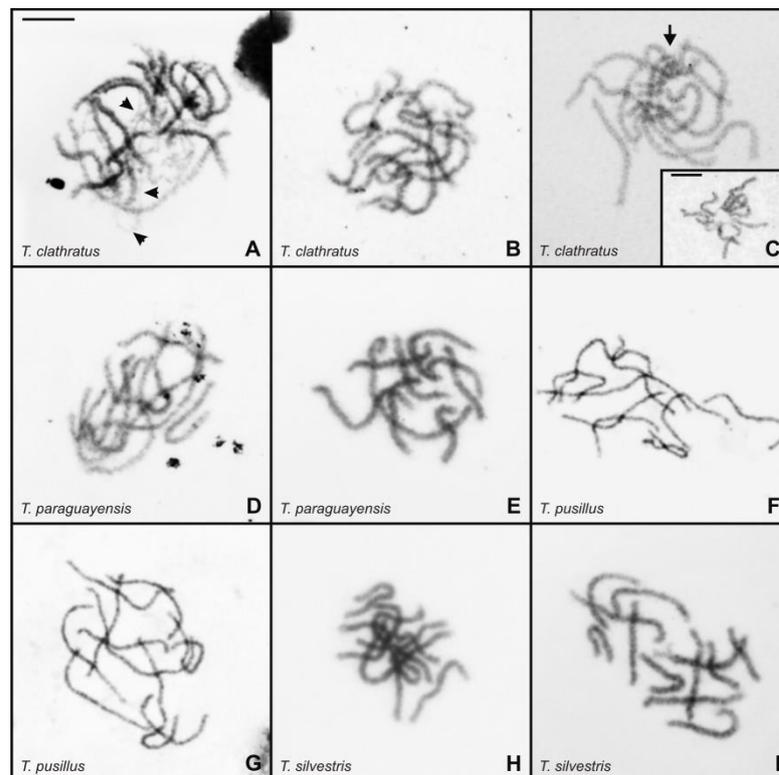


Figure 3 - Testicular pachytene cells of *Tityus* species stained with Giemsa. **A-C.** *Tityus clathratus* with unsynapsed chromosome regions (arrowhead) (**A**), with 10 bivalents completely synapsed (**B**), and with a complex multivalent association (arrow) (**C**). The detail highlights the multivalent association. **D-E.** *Tityus paraguayensis* with eight and nine bivalents, respectively. **F-G.** *Tityus pusillus* with nine and 10 bivalents, respectively. **H-I.** *Tityus silvestris* with eight and 12 bivalents, respectively. Scale bar=10µm.

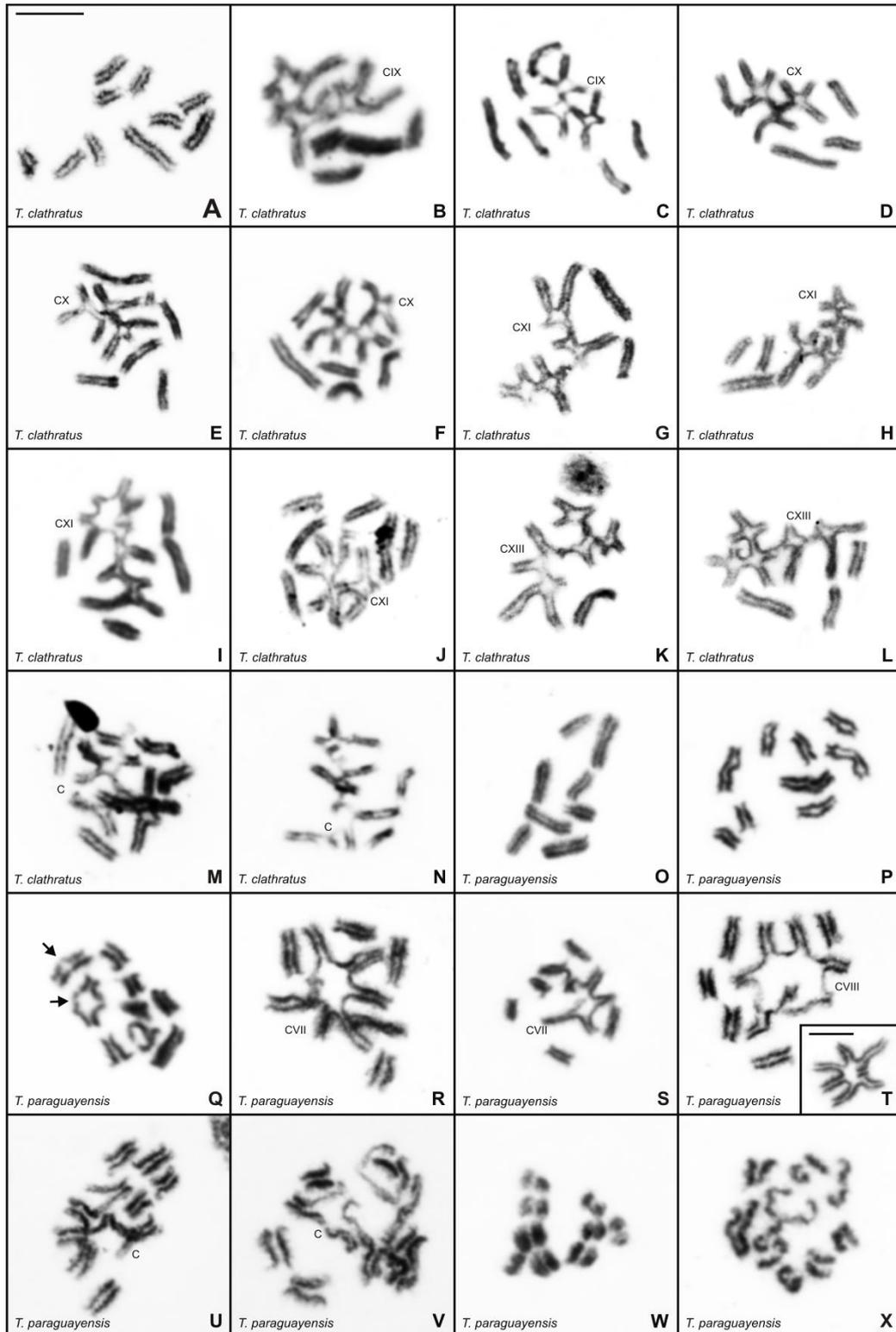


Figure 4 - Meiotic cells of *Tityus* stained with Giemsa. **A-V**. Postpachytene. **W**. Metaphase I. **X**. Anaphase. **A-N**. *Tityus clathratus* with 10II (**A**), 4II+CIX (**B**), 5II+CIX (**C**), 3II+CX (**D**), 4II+CX (**E**), 5II+CX (**F**), 2II+CXI (**G**), 3II+CXI (**H**), 4II+CXI (**I**), 5II+CXI (**J**), 1II+CXIII (**K**), 3II+CXIII (**L**), complex multivalent association in which is not possible to determine the chromosome configuration (**M-N**). **O-X**. *Tityus paraguayensis* with 8II (**O**), 9II (**P-Q**), 5II+CVII (**R-S**), 5II+CVIII (**T**). The detail in **T** highlights the chain of eight chromosomes. **N.S.U-V**. The dissociation of the chromosome chain. **W**. 9II. **X**. Early segregation of some chromosomes. Arrow=gap. II=bivalent. C=chain. The Roman numeral indicates the number of chromosomes in the chain. Scale bar=10 μ m.

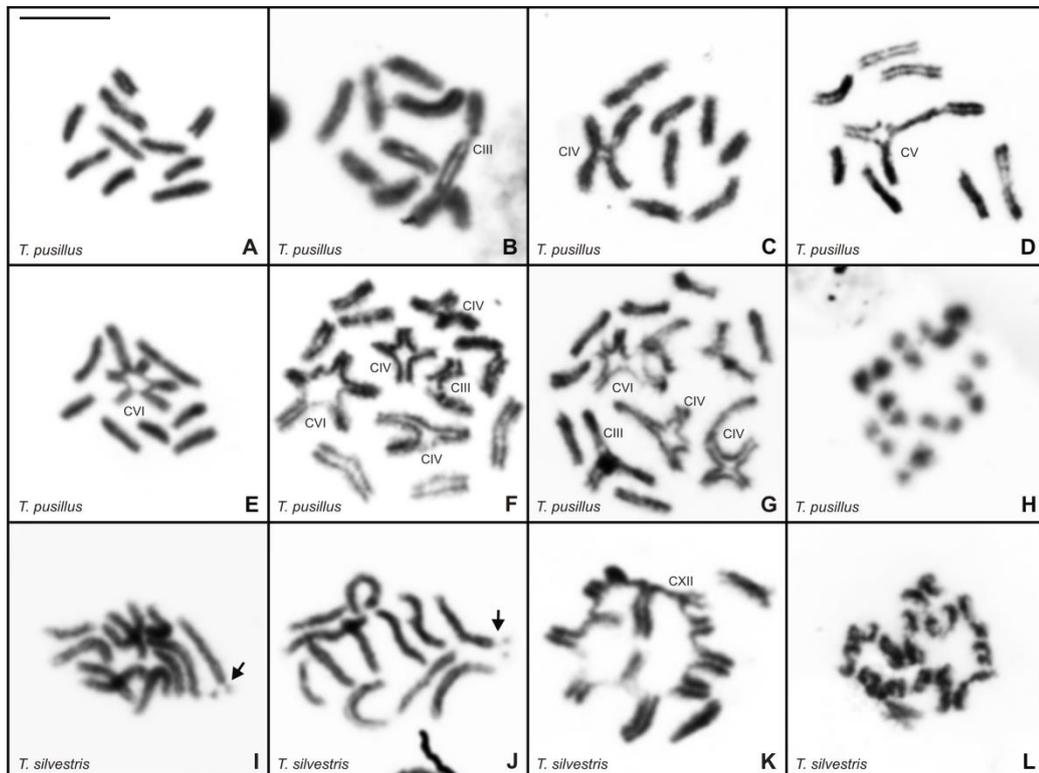


Figure 5 - Meiotic I cells of *Tityus* stained with Giemsa. **A-G. I-L.** Postpachytene. **H.** Metaphase I. **A-H.** *Tityus pusillus* with 10II (**A**), 8II+CIII (**B**), 7II+CIV (**C**), 7II+CV (**D**), 7II+CVI (**E**), variable number of bivalents and chromosome chains, generally constituted by four chromosomes (**F-G**), 9II (**H**). **I-L.** *Tityus silvestris* with 11II (**I**), 12II (**J**), 2II+CXII (**K**), and the zigzag disposition of the chromosome chain (**L**). Arrow=subterminal constriction. II=bivalent. C=chain. The Roman numeral indicates the number of chromosomes in chain. Scale bar=10 μ m.

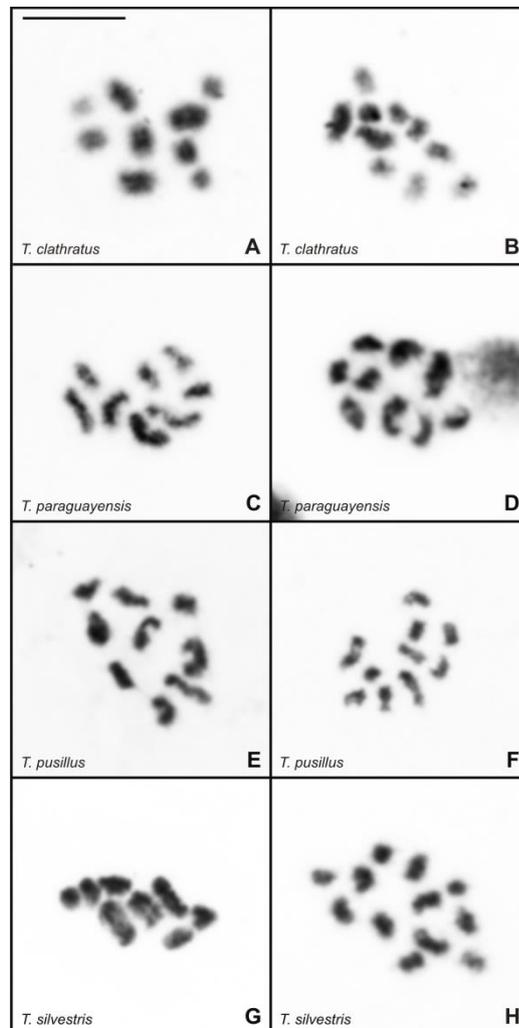


Figure 6 - Metaphase II cells of *Tityus* stained with Giemsa. **A-B.** *Tityus clathratus* with n=9 (**A**) and n=10 (**B**). **C-D.** *Tityus paraguayensis* with n=8 (**C**) and n=9 (**D**). **E-F.** *Tityus pusillus* with n=9 (**E**) and n=10 (**F**). **G-H.** *Tityus silvestris* with n=8 (**G**) and n=12 (**H**). Scale bar=10 μ m.

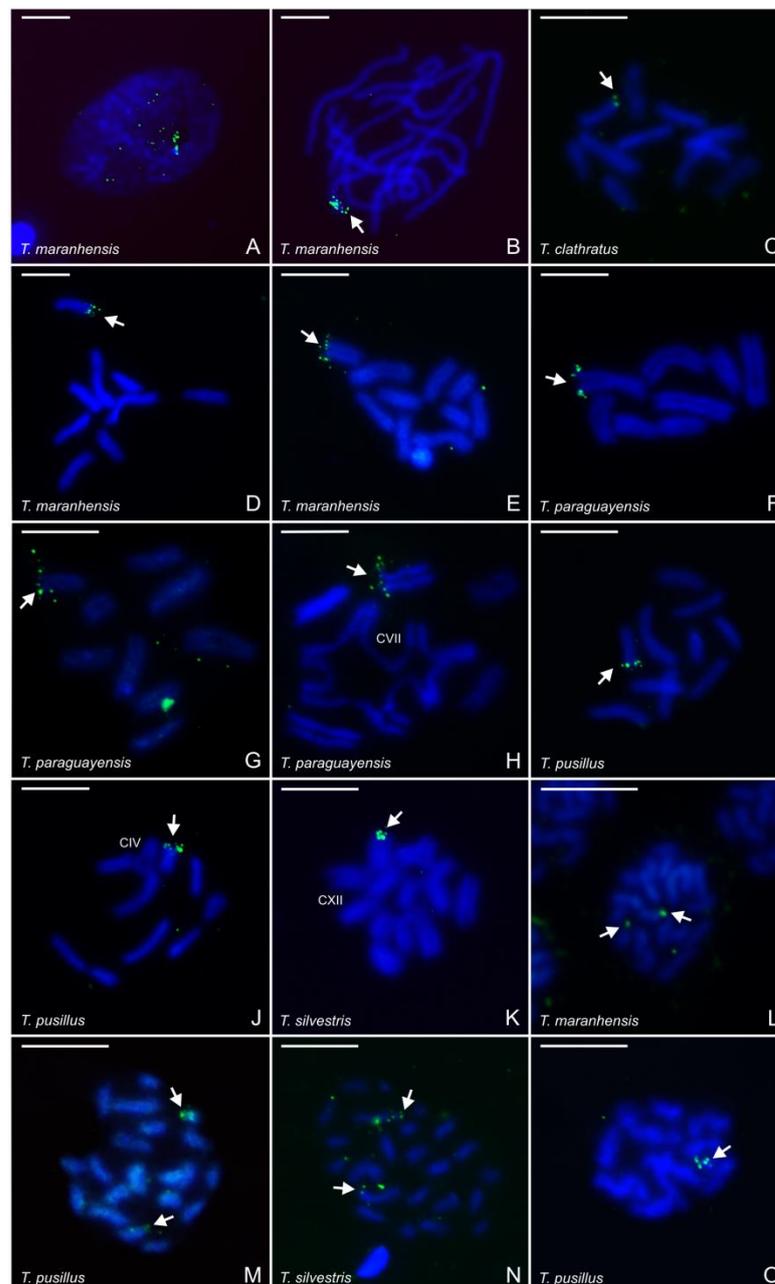


Figure 7 - Localization of the 28S rDNA cistrons (green signal=arrow) in chromosomes of *Tityus* species. **A.** Interphase. **B.** Pachytene. **C-K.** Postpachytene. **L-N.** Mitotic metaphase. **O.** Metaphase II. **A-B. D-E. L.** *Tityus maranhensis* 9II (**D**), 10II (**E**) and 2n=20 (**L**). **C.** *Tityus clathratus* with 10II. **F-H.** *Tityus paraguayensis* with 8II (**F**), 9II (**G**) and 5II+CVII (**H**). **I-J. M. O.** *Tityus pusillus* with 10II (**I**), 7II+CIV (**J**), 2n=20 (**M**) and n=10 (**O**). **K. N.** *Tityus silvestris* with 2II+CXII (**K**) and 2n=24 (**N**). II=bivalent. The Roman numeral indicates the number of chromosomes in chain. C=chain. Scale bar=10 μ m.

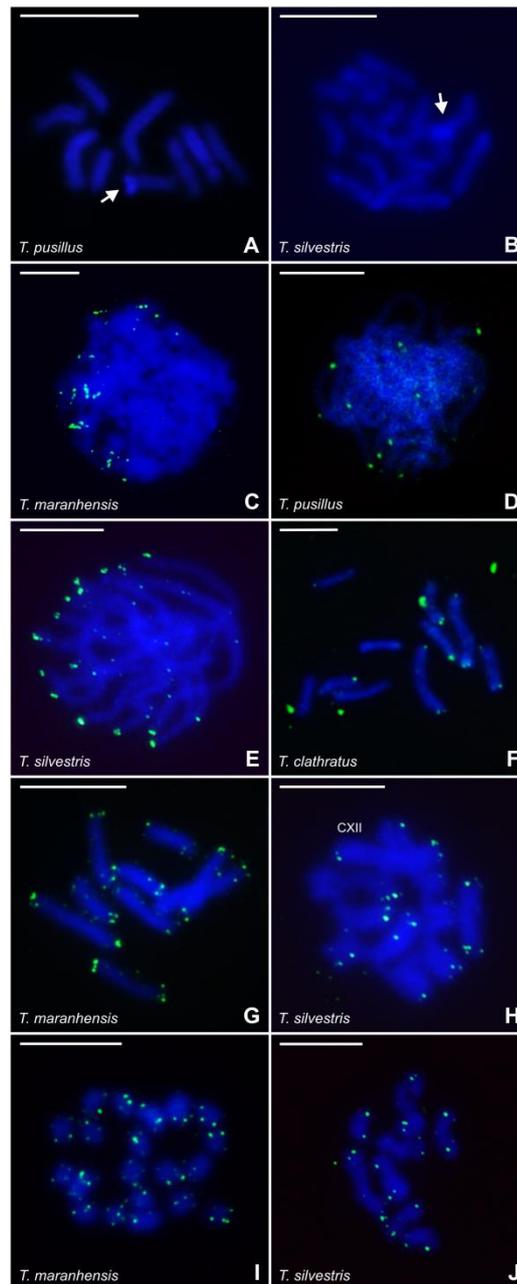


Figure 8 - C-banding with DAPI (A-B) and fluorescent in situ hybridization with TTAGGn telomeric probe (green signal) in chromosomes of *Tityus* species. A. F-H. Postpachytene. B. I. Mitotic metaphase. C. Interphase. D-E. Pachytene. J. Metaphase II. A. D. *Tityus pusillus* with 9II (A). B. E. H. J. *Tityus silvestris* with 2n=16 (B), 1II+CXII (H), n=8 (J). C. G. I. *Tityus maranhensis* with 9II (G), 2n=20 (I). Arrow=constitutive heterochromatin. II=bivalent. C=chain. CXII=chain of 12. Scale bar=10 μ m.

Discussion

In this work, we characterized cytogenetically five *Tityus* (*Archaeotityus*) species, emphasizing the diploid number variability and chromosome behavior during meiosis. With these analyses, we examined all Brazilian species of the subgenus *Archaeotityus*, with the exception of *T. bastosi*. The genus *Tityus* is the most diverse within Scorpiones, with approximately 210 described species (Rein 2017). This genus is restricting to American continent (Central and South America, Antillean islands) and diverged from Old World buthids about 40 Ma (Ojanguren-Affilastro et al. 2017). Although there is no phylogenetic hypothesis to *Tityus* species, in a recent study with southernmost American buthids, Ojanguren-Affilastro et al. (2017) demonstrated the monophyly of the subgenus *Archaeotityus*. With six species described cytogenetically (*T. clathratus*, *T. maranhensis*, *T. mattogrossensis*, *T. paraguayensis*, *T. pusillus* and *T. silvestris*), the *Archaeotityus* scorpions reveal diploid number ranging from $2n=16$ to $2n=24$, with a predominance of $2n=20$ (Piza 1947b, Mattos et al. 2013, this work). The $2n=24$ reported here for one population of *T. silvestris* is the highest chromosome number for this group. These diploid numbers differ from the species of two other subgenera, *T. (Tityus)* with the highest karyotype variability, $2n=5$ to $2n=27$, and *T. (Atreus)* with $2n=11$ to $2n=20$ (see Schneider et al. 2017).

The extraordinary diversity of diploid number recorded for *Tityus* and Buthidae species is also coupled with genome organization, considering that the first sequenced scorpion genome (*Mesobuthus*, Buthidae), suggested gene duplication events, resulting over 32.000 protein-coding genes, which represent more than any sequenced arthropods (Cao et al. 2013). Based on genomic and karyotype data, we hypothesize that some chromosome features may be facilitated the gene duplication in buthids, i.e., occurrence of polyploid cells, holocentric chromosomes, lack of meiotic recombination, ability to segregate multi-chromosomal associations. Prophase I cells with an increased number

of chromosomes (bivalents and chains) were registered in *T. bahiensis* (Piza 1940, 1947c), *T. paraguayensis* (Mattos et al. 2013), *Rhopalurus guanambiensis* (personal data) and *T. pusillus* (present work, Fig. 4F-G). This type of cell seems to be recurrent in buthids and probably arise via endopolyploidy (see Mattos et al. 2013). In this way, some duplicated chromosome or chromosomal segments may have been incorporated into a diploid set, giving rise to change in diploid number or structural chromosome organization. The holocentricity allow the correct segregation of any chromosomal segment; the achiasmatic behavior of the chromosomes and the balanced segregation of the chromosomal chains avoid the formation of gametes with deletions, which could be deleterious. These factors may be responsible for chromosome variability, which seems to happen freely in buthids, and expansion of the gene families and neo functionalization, described by Cao et al. (2013) and Sharma et al. (2014). Alternatively, as proposed to angiosperms (Ortiz et al. 2011, Schubert and Lysak 2011, Moraes et al. 2016), a polyploidy/paleopolyploidy followed by repeated dispolody events could also originated the high variability of diploid numbers at meiosis I. However, in scorpions there is no evidence of whole-genome duplication (Cao et al. 2013).

Intraspecific variability of diploid number has been recorded in 40% among the 16 *Tityus* species karyotyped (Schneider et al. 2017). Similarly to species herein investigated, these previous studies revealed variations at inter- and intra-populational levels and attributed the differences of chromosome number to fission/fusion rearrangements (Schneider et al. 2009a, Mattos et al. 2013, Adilardi et al. 2016, Almeida et al. 2017). In specimens of *T. clathratus* with $2n=19$, we observed one chromosome slightly larger than others of the diploid set, corroborating the chromosome fusion from $2n=20$. This same rearrangement should take place in specimens of *T. pusillus* with $2n=19$. However, in both species, the karyotypes with $2n=19$ were not originated only by a simple fusion rearrangement, taking into account that the meiotic cells showed multi-

chromosomal association with more than three chromosomes (see Tables 2 and 3). In a simple fusion, the expected is a trivalent association during meiosis I, as observed in *T. bahiensis* with $2n=5$ and *T. obscurus* with $2n=13$ and $2n=11$ (Schneider et al. 2009a, Almeida et al. 2017). In *T. paraguayensis*, it is premature speculate if the karyotype with $2n=16$ was originated from $2n=18$ by fusion or the $2n=18$ arised from $2n=16$ by fission. Nevertheless, it is clear that the karyotype $2n=17$ is not only a hybrid between individuals with $2n=16$ and $2n=18$ once the postpachytene cells exhibited a multivalent association with seven chromosomes instead of three chromosomes.

On the other hand, the great difference of diploid number between the two distant populations of *T. silvestris*, $2n=16$ in state of Mato Grosso ($11^{\circ}34'S$, $55^{\circ}17'W$) and $2n=24$ in state of Amazonas ($03^{\circ}06'S$, $59^{\circ}58'W$), need to be evaluated because the individuals can correspond to distinct taxonomic entities with low degree of morphological differentiation. Therefore, the analysis of gene flow and molecular differentiation between chromosomally distinct *Tityus* populations is certainly indispensable to reveal the degree of isolation between populations.

The high rate of chromosome rearrangement combined with some characteristics present in other buthids, such as low vagility, spatial isolation of populations and inbreeding (Polis 1990) may be also contributed to diversification of *Tityus*, the most specious genus within Scorpiones. Many research deals with karyotype differences between populations (John and Lewis 1958, John and Quraishi 1963, Syren and Luykx 1981, Colombo et al. 2004, Basheva et al. 2014, Faria and Navarro 2010) but the role of chromosomal rearrangements in speciation has never been unequivocally demonstrated. The scorpions, especially of the genus *Tityus*, may be interesting to test some theoretical predictions of chromosome speciation.

In addition to diploid number variability, all species characterized in this work presented multi-chromosomal association during meiosis, indicating that at least some

individuals are carrier of heterozygous rearrangements. These multivalent associations differed even among specimens with the same chromosome number, such as *T. clathratus*, $2n=19 - 3II+CXIII$, $4II+CXI$, $5II+CX$, and *T. pusillus*, $2n=19 - 7II+CV$, $8II+CIII$, and appeared not only in individuals with odd diploid number, such as *T. clathratus*, $2n=20 - 10II$, $5II+CX$, *T. pusillus*, $2n=20 - 10II$, $7II+CVI$, and *T. silvestris*, $2n=16 - 2II+CXII$. These results indicate that independent chromosomal rearrangements (fusion/fission and reciprocal translocations), occurring in different combinations, are present in specimens with the same diploid number. Certain heterozygous rearrangements probably get establish in populations, as the case of *T. silvestris* from Mato Grosso, in which all the nine examined specimens exhibited $2II+CXII$. According to Faria and Navarro (2010), the chromosome rearrangement fixation depends of many factors: selection, meiotic drive, small and semi-isolated demes. In *Tityus* species, all of these factors can be present, but in virtue of recurrent chromosome changes, it is unlikely that rearrangements may arise and fixed only by genetic drift.

The intra-individual variability of chromosome chains observed in *T. clathratus*, *T. paraguayensis* and *T. pusillus* can be explained by distinct ways: 1) variable degree of heterosynapsis between non-homologous chromosome regions; 2) early dissociation of the chromosomes that constitute the multivalent chains; 3) persistence of unsynapsed chromosome regions, which are visualized in chains as gaps or open configurations. The two first factors lead to variations in number of bivalents and/or chromosomes of the chains as, for example, in *T. clathratus* – $3II+CXI$, $4II+CX$, $4II+CXI$ or $4II+CX$, $4II+CXI$ or $5II+CIX$, $5II+CX$, $5II+CXI$. These events were also described for other buthids analyzed under light and electron microscopy (Schneider et al. 2009a, 2015; Mattos et al. 2013) and seem not be uncommon in other organisms bearing heterozygous rearrangements as grasshopper, lizard and rodent (Reed et al. 1992, Díez and Santos 1993, Basheva et al. 2014). To confirm if any other mechanism of chromosomal change could be

responsible for intraindividual variation in number of bivalents without alteration the number of the chromosomes of chains, we determine the DSL for two specimens of *T. clathratus* – 1853 with 3II+CX, 4II+CX and 5II+CX, and 1863 with 2II+CXI, 3II+CXI, 4II+CXI. In both, the comparison of DSL values was not significant statistically, indicating that the intra-individuals variation in postpachytene cells occurred due to a variety of heterosynaptic interactions between the chromosomes.

As mentioned above, the presence of unsynapsed chromosomes segments may also reflect in the variability of chromosome configurations visualized at meiosis I, such as in *T. paraguayensis* with 5II+CVII and 5II+CVIII and *T. pusillus* with 7II+CIV and 7II+CV. In these two species, when a gap appears on one chromosome, the chain seems to be composed of highest number of elements. In an elegant study in mice bearing multiple Robertsonian translocations, Manterola et al (2009) demonstrated that unsynapsed chromosomal region can persist until late prophase I, escaping from pachytene checkpoint that ensuring the correct synapsis. According to the authors, in an evolutionary context, this permissive pachytene checkpoint could contribute to maintenance and spreading of chromosomal translocations into populations.

To evaluate the effects of multi-chromosomal association on meiotic segregation, we applied the chi-square test in metaphase II cells of individuals with odd diploid number. The non-significant occurrence of aneuploid metaphase II nuclei indicates that non-disjunction was negligible in the specimens bearing heterozygous rearrangements. The only exception was one individual of *T. clathratus* with χ^2 10.28 (see Table 4). Nevertheless, we attributed this statistically significant result to sampling error, which probably occurred due to low number of cells examined. Considering that the multi-chromosomal chains are widespread among *Tityus* species, we already presume the correct number of chromosomes in metaphase II, as a mechanism of avoiding the unbalanced gametes, which could reduce the reproductive fitness of

heterozygous. Although the segregation pattern has been analyzed for only some specimens, this find can be an evidence of the role of selection in the maintenance of the chromosomal rearrangements in scorpions.

The studies about specific chromosomal regions in scorpions has increased significantly in recent years (Schneider et al. 2009a, b, Schneider and Cella 2010, Mattos et al. 2013, 2014; Adilardi et al. 2014, 2015, 2016; Sadílek et al. 2015; Almeida et al. 2017). The data of NORs and rDNA localization has revealed a remarkable stability, especially in genus *Tityus*, in which more than 80% of the species presented a similar pattern, i.e., NORs/rDNA in the terminal region of two chromosomes. Furthermore, in the five species herein analyzed, the FISH technique showed that despite the extensive variability of postpachytene configurations, the 28S rDNA genes were always located in bivalents of similar size, with exception of *T. silvestris* from Mato Grosso that exhibited rDNA sites in two chromosomes of the chain. Heckmann et al. (2011) discuss about the functional interrelationship between holocentricity and terminal NOR position. After revising the position of NORs in many holocentric species and examining the structure of holocentric chromosomes of *Luzula elegans*, the authors suggested that the rDNA sites in distal centromere-free chromosome regions could ensure the chromosome stability, avoiding breaks. The scorpions are particularly interesting to test this prediction once exhibited both holocentric and monocentric chromosomes.

Similar to *T. pusillus* and *T. silvestris*, the presence of small blocks of constitutive heterochromatin predominantly located in terminal region of one chromosome pair was also recorded for other *Tityus* species (Schneider et al. 2009a, Schneider and Cella 2010, Mattos et al. 2013, Almeida et al. 2017). Analyzing 11 buthid scorpions, Mattos et al. (2013) proposed that species with the lowest amount of constitutive heterochromatin exhibit the highest rates of chromosomal rearrangements. However, the low quantity of heterochromatin can be also influenced by technique employed (C-banding and

fluorochromes staining), which reveal only certain types of repetitive DNA sequences (Sumner 1994).

The detection of telomeric cluster (TTAGG) $_n$ in chromosomes of five *Tityus* species confirmed the presence of this sequence in individuals carriers of holocentric chromosomes and multivalent chains. This pentanucleotide sequence had been previously reported for four species, the scorpionid *Heterometrus spinifer* ($2n=49$) with monocentric chromosomes (Vitková et al. 2005), and the buthids *Zabius fuscus* ($2n=18$), *T. confluens* ($2n=5-6$) and *T. obscurus* ($2n=11-16$) with holocentric chromosomes (Adilardi et al. 2015; 2016; Almeida et al. 2017). This result shows that the telomeric chromosomal region is conserved despite extensive rearrangements. The synthesis of new telomeres at break points can be an ability of holocentric chromosomes, enabling the rapid karyotype evolution through fissions or other rearrangements (Jankowska et al. 2015).

In summary, we demonstrated that the karyotype variability in these *Tityus* species is not only originated by chromosome fissions/fusions but also by reciprocal translocations, which give rise to the multi-chromosomal associations in meiosis. Moreover, with the absence of abnormal metaphase II cells, we proved the balanced segregation of the chromosomes in individuals bearing heterozygous rearrangements. Finally, based on many chromosome characteristics, e.g. holocentricity, achiasmatic meiosis, endopolyploidy, ability to segregate heterosynaptic or unsynapsed chromosomes, (TTAGG) $_n$ sequence located in terminal regions of rearranged chromosomes, we suggested that maintenance of multi-chromosomal association may be evolutionary advantageous for *Tityus* species.

Acknowledgements

The authors would like to thank Dr. Douglas Araujo from Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, for collecting some *Tityus paraguayensis* specimens. This research was supported through funding from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP (2013/11840-0; 2011/21643-1). Collecting permits were granted by the Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) and the Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBIO) (40014-2; 40014-3; 40014-4).

References

- Adilardi RS, Ojanguren-Affilastro AA, Martí DA, Mola LM (2014). Cytogenetic analysis on the geographically distant parthenogenetic populations of *Tityus trivittatus* Kraepelin, 1898 (Scorpiones, Buthidae): Karyotype, constitutive heterochromatin and rDNA localization. **Comparative Cytogenetics** 8(2):81-92.
- Adilardi RS, Ojanguren-Affilastro AA, Mattoni CI, Mola LM (2015). Male and female meiosis in the mountain scorpion *Zabius fuscus* (Scorpiones, Buthidae): heterochromatin, rDNA and TTAGG telomeric repeats. **Genetica** 143:393-401.
- Adilardi RS, Ojanguren-Affilastro AA, Mola LM (2016). Sex-linked chromosome heterozygosity in males *Tityus confluens* (Buthidae): a clue about the presence of sex chromosomes in scorpions. **PLoS ONE** 11(10):E0164427.
- Almeida BRR, Milhomem-Paixão SSR, Noronha RCR, Nagamachi CY, Costa MJR, Pardal PPO, Coelho JS, Pieczarka JC (2017). Karyotype diversity and chromosomal organization of repetitive DNA in *Tityus obscurus* (Scorpiones, Buthidae). **BMC Genetics** 18:35.
- Basheva EA, Torgasheva AA, Fernandez MJG, Boston E, Mirol P, Borodin PM (2014). Chromosome synapsis and recombination in simple and complex chromosomal

heterozygotes of tuco-tuco (*Ctenomys talarum*: Rodentia: Ctenomyidae). **Chromosome Research** 22(3):351-363.

Burt DW (2002). Chromosome rearrangement in evolution. **Encyclopedia of Life Sciences**. John Wiley & Sons Ltd, Chichester doi:10.1038/npg.els.0001500.

Cao Z, Yu Y, Wu Y, Hao P, Di Z, He Y, Chen Z, Yang W, Shen Z, He X, Sheng J, Xu X, Pan B, Feng J, Yang X, Hong W, Zhao W, Li Z, Huang K, Li T, Kong Y, Liu H, Jiang D, Zhang B, Hu J, Hu Y, Wang B, Dai J, Yuan B, Feng Y, Huang W, Xing X, Guoping Z, Li X, Li Y, Li W (2013). The genome of *Mesobuthus martensii* reveals a unique adaptation model of arthropods. **Nature Communications** 4:2602.

Carvalho KA, Garcia PCA, Recco-Pimentel SM (2009). NOR dispersion, telomeric sequence in centromeric regions and meiotic multivalent configurations in species of the *Aplastodiscus albofrenatus* group (Anura, Hylidae). **Cytogenetic and Genome Research** 126:359-367.

Chinnappa CC, Victor R (1979). Achiasmatic meiosis and complex heterozygosity in female cyclopoid copepods (Copepoda, Crustacea). **Chromosoma** 71:227-236.

Colombo PC, Pensel S, Isabel RM (2004). Chromosomal polymorphism, morphometric traits and mating success in *Leptysmia argentina* Bruner (Orthoptera). **Genetica** 121:25-31.

Cook LG (2000). Extraordinary and extensive karyotypic variation: a 48-fold range in chromosome number in the gall-inducing scale insect *Apiomorpha* (Hemiptera: Coccoidea: Eriococcidae). **Genome** 43:255-263.

Dernburg AF (2001). Here, there, and everywhere: kinetochore function on holocentric chromosomes. **The Journal of Cell Biology** 153(6):33-38.

Díez M, Santos JL (1993). Synapsis in a paracentric inversion heterozygote of *Chrothippus jacobsi* (grasshopper). **Heredity** 70:231-236.

- Emanuel B, Saitta S (2007). From microscopes to microarrays: dissecting recurrent chromosomal rearrangements. **Nature Review Genetics** 8(11):869-883.
- Faria R, Navarro A (2010). Chromosomal speciation revisited: rearranging theory with pieces of evidence. **Trends in Ecology and Evolution** 25(11):660-669.
- Feuk L, Carson AR, Scherer SW (2006). Structural variation in the human genome. **Nature** 7:85-97.
- Freitas TRO (1997). Chromosome polymorphism in *Ctenomys minutus* (Rodentia – Octodontidae). **Brazilian Journal of Genetics** 20:1-6.
- Gazoni T, Gruber SL, Silva APZ, Araujo OGS, Narimatsu H, Strüssmann C, Haddad CFB, Kasahara S (2012). Cytogenetics analyses of eight species in the genus *Leptodactylus* Fitzinger, 1843 (Amphibia, Anura, Leptodactylidae), including a new diploid number and a karyotype with multiple translocations. **BMC Genetics** 13:109.
- Gokhman VE, Kuhn KL, Woolley JB, Hopper KR (2017). Variation in genome size and karyotype among closely related aphid parasitoids (Hymenoptera, Aphelinidae). **Comparative Cytogenetics** 11(1):97-117.
- Gomes FP (1982). Curso de estatística experimental, 10th edn. Nobel.
- Gross MC, Feldberg E, Cella DM, Schneider MC, Schneider CH, Porto JIR, Martins C (2009). Intriguing evidence of translocations in Discus fish (*Symphysodon*, Cichlidae) and a report of the largest meiotic chromosomal chain observed in vertebrates. **Heredity** 102:435-441.
- Gruetzner F, Ashley T, Rowell DM (2006). How did the platypus get its sex chromosome chain? A comparison of meiotic multiples and sex chromosomes in plants and animals. **Chromosoma** 115:75-88.
- Heckmann S, Schroeder-Reiter E, Kumke K, Ma L, Nagaki K, Murata M, Wanner G, Houben A (2011). Holocentric chromosomes of *Luzula elegans* are

characterized by a longitudinal centromere groove, chromosome bending, and a terminal nucleolus organizer region. **Cytogenetic and Genome Research** 134(3):220-228.

Howell WM, Black DA (1980). Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia** 36:1014-1015.

Jankowska M, Fuchs J, Klocke E, Fojtová M, Polanská P, Fajkus J, Schubert V, Houben A (2015). Holokinetic centromeres and efficient telomere healing enable rapid karyotype evolution. **Chromosoma** 124(4):519-528.

John B, Lewis KR (1958). Studies on *Periplaneta americana*. III. Selection for heterozygosity. **Heredity** 12:185-199.

John B, Quraishi B (1963). Studies on *Periplaneta americana*. IV. Pakistani populations. **Heredity** 19:147-156.

King M (1993). Species evolution: the role of chromosome change. Cambridge: Cambridge University Press.

Larson A, Prager EM, Wilson AC (1984). Chromosomal evolution, speciation and morphological change in vertebrates: the role of social behaviour. **Chromosomes Today** 8:215-228.

Lee C (2005). Vive la difference! **Nature** 37(7):660-661.

Lourenço LB, Recco-Pimentel SMR, Cardoso AJ (2000). A second case of multivalent meiotic configurations in diploid species of Anura. **Genetics and Molecular Biology**. 23(1):131-133.

Luceño M, Guerra M (1996). Numerical variations in species exhibiting holocentric chromosomes: a nomenclatural proposal. **Caryologia** 49:301-309.

Manterola M, Page J, Vasco C, Berríos S, Parra MT, Viera A, Rufas JS, Zuccotti M, Garagna S, Fernández-Donoso R (2009). A high incidence of meiotic silencing

of unsynapsed chromatin is not associated with substantial pachytene loss in heterozygous male mice carrying multiple simple robertsonian translocations.

PLoS Genetics 8:e1000625.

Martins VG, Mesa A (1995). Two permanent linear chains of sex chromosomes in *Neotermes fulvescens* and karyotypes of two other neotropical Kalotermitidae species (Insecta, Isoptera). **Genome** 38:958-967.

Mattos VF, Carvalho LS, Cella DM, Schneider MC (2014). Location of 45S ribosomal genes in mitotic and meiotic chromosomes of buthid Scorpions. **Zoological Science** 31:603-607.

Mattos VF, Cella DM, Carvalho LS, Candido DM, Schneider MC (2013). High chromosome variability and the presence of multivalent associations in buthid scorpions. **Chromosome Research** 21:121-136.

Melters PD, Paliulius LV, Korf IF, Chan SWL (2012). Holocentric chromosomes: convergent evolution, meiotic adaptations, and genomic analysis. **Chromosome Research** 20:579-593.

Moraes AP, Koehler S, Cabral JS, Gomes SSL, Viccini LF, Barros F, Feliz LP, Guerra M, Forni-Martins ER (2016). Karyotype diversity and genome size variation in Neotropical Maxillariinae orchids. **Plant Biology** 19:298-308.

Murray BG, Young AG (2001). Widespread chromosome variation in the endangered grassland forb *Rutidosia leptorrhynchoides* F. Muell. (Asteraceae: Gnaphalieae). **Annals of Botany** 87:83-90.

Nagaki K, Kashihara K, Murata M (2005). Visualization of diffuse centromeres with centromere-specific histone H3 in the holocentric plant *Luzula nivea*. **Plant Cell** 17:1886-1893.

- Nunn GB, Theisen BF, Christensen B, Arc tander P (1996). Simplicity-correlated size growth of the nuclear 28S ribosomal RNA D3 expansion segment in the crustacean order isopoda. **Journal of Molecular Evolution** 42:211-223.
- Ojanguren-Affilastro AA, Adilardi RS, Mattoni CL, Ramírez MJ, Ceccarrelli FS (2017). Dated phylogenetic studies of the southernmost American buthids (Scorpiones: Buthidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution** 110:39-49.
- Olmo E (2005). Rate of chromosome changes and speciation in reptiles. **Genetica** 125:185-203.
- Ortiz AM, Seijo JG, Fernández A, Lavia GI (2011). Meiotic behavior and pollen viability of tetraploid *Arachis glabrata* and *A. nitida* species (Section *Rhizomatosae*, Leguminosae): implications concerning their polyploidy nature and seed set production. **Plant Systematics and Evolution** 292:73-83.
- Paresque R, Souza WP, Mendes SL, Fagundes V (2004). Composição cariotípica da fauna de roedores marsupiais de duas áreas de Mata Atlântica do Espírito Santo, Brasil. **Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão** 17:5-33.
- Pinkel D, Straume T, Gray JW (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America** 83:2934–2938.
- Piza ST (1940). Poliploidia natural em *Tityus bahiensis* (Scorpiones) associada a aberrações cromossômicas espontâneas. **Revista de Biologia e Hygiene** 10:143-155.
- Piza ST (1943). Meiosis in the male of the Brazilian scorpion *Tityus bahiensis*. **Revista de Agricultura** 18:249-276.
- Piza ST (1947a). Interessante comportamento dos cromossômios na espermatogênese do escorpião *Isometrus maculatus* De Geer. **Anais da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”** 62:177-182.

- Piza ST (1947b). Notas sobre cromossômios de alguns escorpiões brasileiros. **Anais da Escola Superior de Agricultura “Luiz-de-Queiroz”** 62:169-176.
- Piza ST (1947c). Uma raça cromossômica natural de *Tityus bahiensis* (Scorpiones – Buthidae). **Anais da Escola Superior de Agricultura “Luiz-de-Queiroz”** 62:183-192.
- Piza ST (1948). Uma nova raça cromossômica natural de *Tityus bahiensis* (Scorpiones – Buthidae). **Revista de Agricultura de São Paulo** 24:181-186.
- Piza ST (1950a)**. Observações cromossômicas em escorpiões brasileiros. **Ciência e Cultura** 2:202-206.
- Piza ST (1950b). Variações cromossômicas do *Tityus bahiensis* de Ribeirão Preto. **Ciência e Cultura** 2:57-59.
- Piza ST (1955). Notable geographical expansion of a peculiar type of chromosomal constitution of the cosmopolitan scorpion *Isometrus maculatus*. **Arquivos do Museu Nacional** 42:611-612.
- Piza ST (1957). The chromosomes of *Rhopalurus* (Scorpiones – Buthidae). **The Canadian Entomologist** 89:565-568.
- Plisková J, Kovarik F, Kosulic O, Stahlavsky F (2016). Description of a new species of *Heterometrus* Ehrenberg, 1828 (Scorpiones: Scorpionidae) from Thailand with remarks about the utilization of cytogenetic data in taxonomy of the genus. **Annales Zoologici** 66(3):467-476.
- Poletto AB, Ferreira IA, Cabral-de-Mello DC, Nakajima RT, Mazzuchelli J, Ribeiro HB, Venere PC, Nirchio M, Kocher TD, Martins C (2010). Chromosome differentiation patterns during cichlid fish evolution. **BMC Genetics** 11:50.
- Polis GA, Sissom WD (1990). Life History PP. 161-223. In: Polis GA (ed.) *The Biology of Scorpions*. **Stanford University Press** 587p.

- Reed KM, Sites JW, Greenbaum IF (1992). Synapsis, recombination, and meiotic segregation in the mesquite lizard, *Sceloporus grammicus*, complex. **Cytogenetics and Cell Genetics** 61:40-45.
- Reig OA, Kiblicky P (1969). Chromosome multiformity in the genus *Ctenomys* (Rodentia, Octodontidae). **Chromosoma** 28:211-244.
- Rein JO. (2017). The Scorpion files. Disponível em: [http:// www.ntnu.no/scorpion-files](http://www.ntnu.no/scorpion-files).
- Rieseberg LH (2001). Chromosomal rearrangements and speciation. **Tree** 16:351-358.
- Sadílek D, Nguyen P, Koç H, Kovarik F, Yagmur EA, Stahlavský F (2015). Molecular cytogenetics of *Androctonus* scorpions: an oasis of calm in the turbulent karyotype evolution of the diverse family Buthidae. **Biological Journal of the Linnean Society** 115:69-76.
- Schneider MC, Mattos VF, Carvalho LS, Cella DM (2015). Organization and behaviour of the synaptonemal complex during achiasmatic meiosis of four buthid scorpions. **Cytogenetic and Genome Research** 144(4): 341-347.
- Schneider MC, Mattos VF, Cella DM (2017). The scorpion cytogenetic database. Disponível em: <http://www.arthropodcytogenetics.bio.br/scorpionsdatabase/index.html>
- Schneider MC, Zacaro AA, Pinto-da-Rocha R, Candido DM, Cella DM (2009a). Complex meiotic configuration of the holocentric chromosomes: the intriguing case of the scorpion *Tityus bahiensis*. **Chromosome Research** 17:883-898.
- Schneider MC, Zacaro AA, Pinto-da-Rocha, Candido DM, Cella DM (2009b). A comparative cytogenetic analysis of two Bothriuridae species and overview of the chromosome data of Scorpiones. **Journal of Heredity** 100:545-555.
- Schubert I, Lysak M (2011). Interpretation of karyotype evolution should consider chromosome structural constraints. **Cell Press** 27(6):207-216.

- Shanahan CM (1989). Cytogenetics of Australian scorpions. I. Interchange polymorphism in the family Buthidae. **Genome** 32:882-889.
- Shanahan CM, Hayman DL (1990). Synaptonemal complex formation in male scorpions exhibiting achiasmatic meiosis and structural heterozygosity. **Genome** 33: 914–926.
- Sharma G, Gohil RN (2003). Cytology of *Allium roylei* Stearn. I. Meiosis in a population with complex interchanges. **The Japan Mendel Society** 68(2):115-119.
- Sharma GP, Parshad R, Joneja MG (1959). Chromosome mechanism in the males of three species of Scorpions (Scorpiones-Buthidae). **Research Bulletin of Panjab University** 10:197-207.
- Sharma PP, Schwager EE, Extavour CG, Wheeler WC (2014). Hox gene duplications correlate with posterior heteronomy in scorpions. **Proceedings of the Royal Society** 281:20140661.
- Sharp HE, Rowell DM (2007). Unprecedented chromosomal diversity and behaviour modify linkage patterns and speciation potential: structural heterozygosity in a Australian spider. **Journal of Evolutionary Biology** 20:2427-2439.
- Siqueira-Jr S, Ananias F, Recco-Pimentel SMR (2004). Cytogenetics of three Brazilian species of *Eleutherodactylus* (Anura, Leptodactylidae) with 22 chromosomes and re-analysis of multiple translocation in *E. binotatus*. **Genetics and Molecular Biology** 27(3):363-372.
- Sumner AT (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research** 75:304-306.
- Sumner AT (1994). Chromosome banding and identification, 83-96pp. In: Methods in Molecular Biology , v.29. JR. Gosden ed.

Syren RM, Luykx P (1981). Geografic variation of sex-linked translocation heterozygosity in the termite *Kaloterme approximat* Snyder (Insecta: Isoptera).

Chromosoma 82:65-88.

Takahashi CS (1976). Cytogenetical studies on the effects of high natural radiation levels in *Tityus bahiensis* (Scorpiones, Buthidae) from Morro do Ferro, Brazil.

Radiation Research 67:371-381.

Vítková M, Král J, Traut W, Zrzavý J, Marec F (2005). The evolutionary origin of insect telomeric repeats, (TTAGG)_n. **Chromosome Research** 13:145-156.

White (1978). Models of speciation. **Systematic Zoology** 27(4): 478-482.

CAPÍTULO II

Modificações epigenéticas em cromossomos holocêntricos de *Tityus paraguayensis* (Scorpiones: Buthidae)

Viviane Fagundes Mattos¹ & Marielle Cristina Schneider²

¹Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Rio Claro, São Paulo, Brasil

²Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, Diadema, São Paulo, Brasil

Introdução

Modificações em histonas, tais como, acetilação, metilação, fosforilação e ubiquitinação, controlam a estrutura da cromatina e mediam a sinalização para processos celulares tais como reparo, replicação e recombinação (Kouzarides 2007, Bannister e Kouzarides 2011, Houben et al. 2013). A fosforilação da histona H3 pode ter como consequência a compactação da cromatina, desta forma, está relacionada com a condensação e segregação cromossômica, coesão das cromátides irmãs, transcrição, reparo de DNA e ativação da apoptose (Houben et al. 2007, 2013, Cerutti e Casas Mollano 2009, Hayashi-Takanaka et al. 2009, Bannister e Kouzarides 2011). A fosforilação da serina 10 da histona H3 (H3S10f) é uma das mais estudadas atualmente e, apesar de sua função ainda não ser bem determinada, os trabalhos realizados apontam para um papel na condensação cromossômica e/ou manutenção da coesão das cromátides-irmãs (Sotero-Caio et al. 2011, Marcon-Tavares et al. 2014).

Cromossomos monocêntricos, como de besouros e gafanhotos, e holocêntricos encontrado nos percevejos, mostram padrões de fosforilação semelhantes (Sotero-Caio et al. 2011, Marcon Tavares et al. 2014). Nestes casos, independentemente da natureza cinética, os cromossomos apresentaram-se inteiramente fosforilados, atingindo o grau máximo de fosforilação durante a metáfase-anáfase I e II (Sotero-Caio et al. 2011). Apesar disso, diferenças no padrão de fosforilação podem ser observadas em plantas, ou seja, plantas portadoras de cromossomos monocêntricos geralmente evidenciam a região pericentromérica hiperfosforilada ao passo que plantas com cromossomos holocêntricos apresentam cromossomos uniformemente fosforilados, aumentando a intensidade na metáfase (Guerra et al. 2006, Fernandes et al. 2008, Marcon-Tavares et al. 2014). Adicionalmente, cromossomos B podem apresentar padrão de fosforilação diferente daqueles do complemento A. Esse tipo de comportamento foi observado em *Cestrum strigilatum* (Solanaceae), onde a fosforilação da H3 na serina 10 ocorreu

apenas na região pericentromérica dos cromossomos do complemento A, tanto na mitose quanto na meiose, enquanto que o univalente B apareceu fosforilado por quase toda a extensão cromossômica, exceto pela porção terminal do braço longo (Fernandes et al. 2008).

Modificações associadas à heterocromatina incluem hipoacetilação de lisinas, dimetilação ou trimetilação da histona H3 (Kim e Workman 2010). A acetilação de histonas está relacionada com a ativação genômica e a desacetilação resulta em repressão e silenciamento (Cabrero et al. 2007). Hiperacetilação das histonas H3 e H4 em resíduos de lisina têm sido observadas nas regiões organizadoras nucleolares de *Hordeum vulgare* e *Vicia faba*, neste último, ocorrendo a hiperacetilação da H3 também em regiões de heterocromatina que contém elementos repetitivos (Houben et al. 1996, 1997, Belyaev et al. 1997,1998, Jasencakova et al. 2001). Forte acetilação de histonas nas regiões organizadoras nucleolares permite que esses domínios cromossômicos evitem a condensação na preparação para o início da transcrição a partir da telófase (Houben et al. 1996, Houben et al. 2013). Assim, a acetilação da H3K9 é rica na região promotora de genes ativos, enquanto a metilação no mesmo sítio está associada a genes inativos.

Metilação de DNA e modificações em histonas estão envolvidas no processo de formação e regulação da heterocromatina e expressão gênica em muitos organismos (Cedar e Bergman 2009, Saksouk et al. 2015). Soppe et al. (2002) propuseram um modelo de montagem da heterocromatina que relaciona metilação do DNA com metilação de histonas e replicação em *Arabidopsis*. Adicionalmente, a H3K9me3 é um marcador de heterocromatina constitutiva ao passo que a H3K27me3 é usualmente enriquecida na heterocromatina facultativa (Saksouk et al. 2015). Conseqüentemente, metilação da H3K9 é comumente encontrada em regiões heterocromáticas, uma vez

que a desacetilação da H3K9 permite a ligação da proteína HP1, facilitando a formação local de heterocromatina (Li et al. 2007, Cedar e Bergman 2009, Saksouk et al.).

A técnica de imunocitogenética tem sido aplicada para identificar e localizar proteínas e glicoproteínas que estejam envolvidas com tais modificações na cromatina, por meio da interação entre uma determinada molécula a um anticorpo que a reconhece. Desta forma, o objetivo deste trabalho é investigar o padrão de modificações de histonas (H3K9ac, H4K5ac, H3S10f, H3K4me2, H3K9me2 e H3K9me3) e o papel de cada uma delas principalmente em relação à transcrição, condensação e segregação cromossômica de *Tityus paraguayensis*.

Material e métodos

Preparação do material

Nove machos de *T. paraguayensis* foram coletados na Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil (20°29'S, 54°46'O). Os indivíduos foram dissecados em solução fisiológica (128,3 mM NaCl; 16,7 mM Na₂HPO₄ e 19,9 mM KH₂PO₄) e a fixação dos testículos de adultos foi realizada com paraformaldeído 2% (2,5mL paraformaldeído 8%; 5µL Triton 100x; 1mL 10xPBS; 6,5mL H₂O) em tubos de microcentrífuga, os quais foram mantidos deitados e em agitação leve de 40 rpm por 40 minutos. Posteriormente, seguiram-se três lavagens de 10 minutos cada com 1xPBS (pH 7,0). As preparações cromossômicas foram realizadas através do esmagamento do testículo sobre a lâmina com o auxílio da lamínula e de um bastão de metal. Posteriormente, as lamínulas foram removidas em nitrogênio líquido.

Imunodeteção

As lâminas foram incubadas com 90 µL de solução bloqueadora (BSA 3%) em câmara úmida por 10 minutos a temperatura ambiente. Foram adicionados 30 µL do

anticorpo primário policlonal da Abcam contra H3K9ac (1:300), H4K5ac (1:200), H3S10f (1:300), H3K4me2 (1:100), H3K9me2 (1:100) e H3K9me3 (1:200) diluído em BSA 3%. As lâminas foram incubadas em câmara úmida a 4°C *overnight* e lavadas três vezes em 1xPBS por cinco minutos cada. Foram adicionados 30 µL do anticorpo secundário Goat anti-rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 488) diluído em BSA 3%, na proporção de 1:600 sobre as lâminas, as quais foram incubadas em câmara úmida a temperatura ambiente por três horas e lavadas três vezes com 1xPBS por cinco minutos cada. As lâminas foram montadas com DAPI/Vectashield®, e as imagens foram capturadas em um fotomicroscópio Zeiss Imager A2, utilizando o software Axio Vision, e editadas em Corel Draw Graphics suíte X4.

Resultados

O escorpião *T. paraguayensis* possui cromossomos holocêntricos e, nesta população, o número diploide variou de $2n=17$ a $2n=18$. Sete indivíduos apresentaram $2n=18$, e as células em meiose I foram compostas por nove bivalentes dispostos lado a lado (9II). Por outro lado, dois indivíduos portadores do $2n=17$ exibiram associações multivalentes em células pós-paquitênicas, as quais foram constituídas por cinco bivalentes mais uma cadeia (C) de sete cromossomos (5II+CVII).

Acetilação

A cromatina difusa de alguns núcleos interfásicos e profásicos iniciais de *T. paraguayensis* foi acetilada na H3K9 e na H4K5 (Fig. 1). Adicionalmente, em todas as demais fases do ciclo celular os cromossomos apresentaram-se hipoacetilados (Fig. 1). Uma exceção pode ser observada em alguns pós-paquítenos, os quais apresentaram a região lateral dos cromossomos levemente acetilada para a H4K5, porém menos intensamente que nos núcleos interfásicos (Fig. 1I-J).

Metilação

A dimetilação da lisina 4 na histona H3 foi intensa no paquíteno (Fig. 2A-F). Adicionalmente, metáfases mitóticas de *T. paraguayensis* apresentaram cromossomos inteiramente dimetilados com o uso do anticorpo H3K9me2 (Fig. 2G-H). A cromatina difusa de alguns núcleos interfásicos e profásicos I iniciais apresentou trimetilação pontual da H3 na lisina 9. Hipertrimetilação na região terminal de todos os cromossomos foi observada em células pós-paquitênicas, em metáfase II e metáfase mitótica. Porém, as marcações foram mais intensas nos pós-paquitenos do que nas fases de metáfase, especialmente de metáfase mitótica (Fig. 2M-R).

Fosforilação

A maioria dos núcleos interfásicos de *T. paraguayensis* não apresentou fosforilação da histona H3 na serina 10 (Fig. 3). No entanto, foi possível visualizar alguns núcleos fosforilados uniformemente (Fig. 3A-B; G-H), os quais provavelmente estão em uma fase pós-meiótica. Sinais de H3S10f foram observados em paquítenos, pós-paquítenos, metáfases II e metáfases mitóticas (Fig. 3). Em todos os casos, os cromossomos apresentaram fosforilação uniforme. Adicionalmente, algumas regiões terminais de alguns cromossomos em células em pós-paquíteno e metáfase mitótica apareceram hiperfosforiladas.

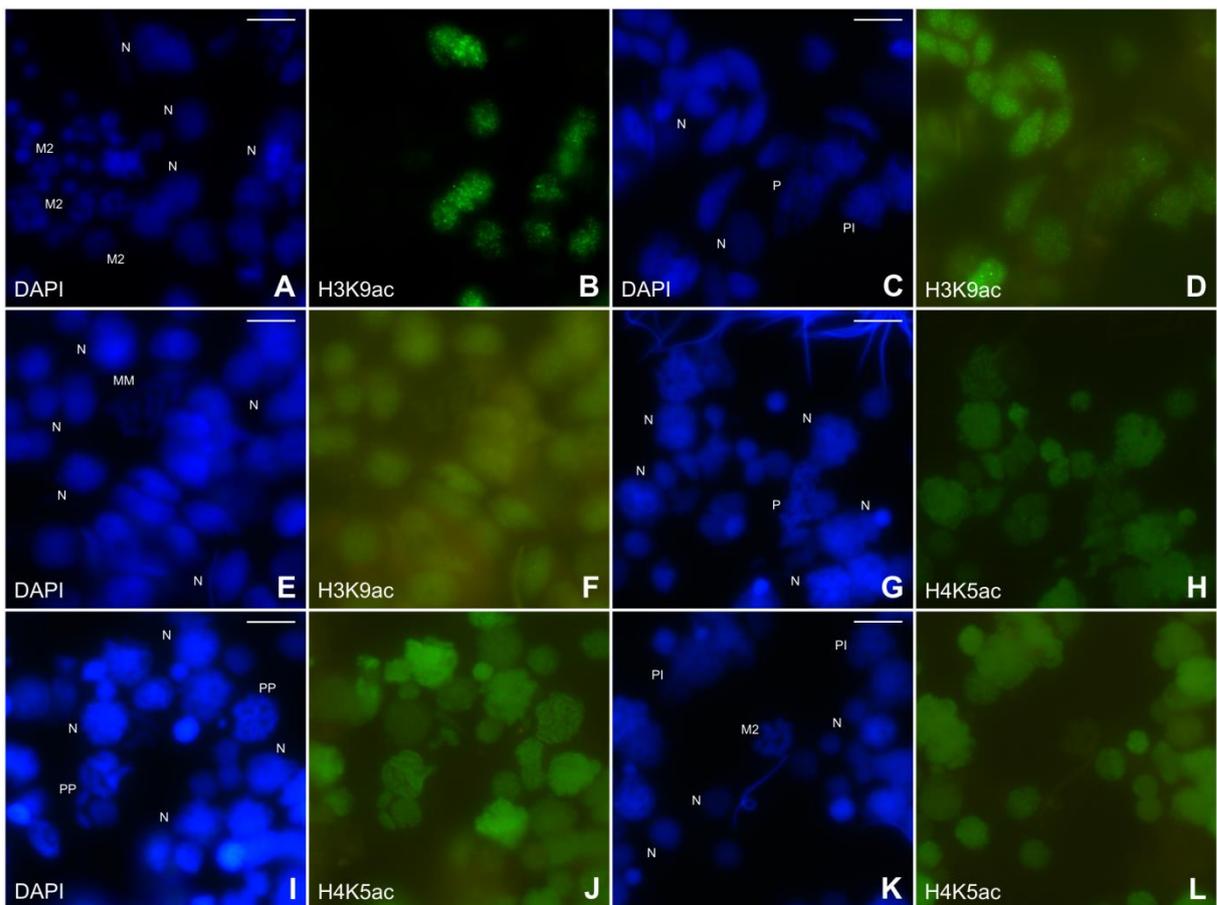


Fig. 1 – Imunodeteccção das histonas H3K9ac (A-F) e H4K5ac (G-L) em cromossomos de *Tityus paraguayensis*. MM = metáfase mitótica. M2 = metáfase II. N = núcleo interfásico. P = paquíteno. PI = prófase inicial. PP = pós-paquíteno. Escala = 10 μ m.

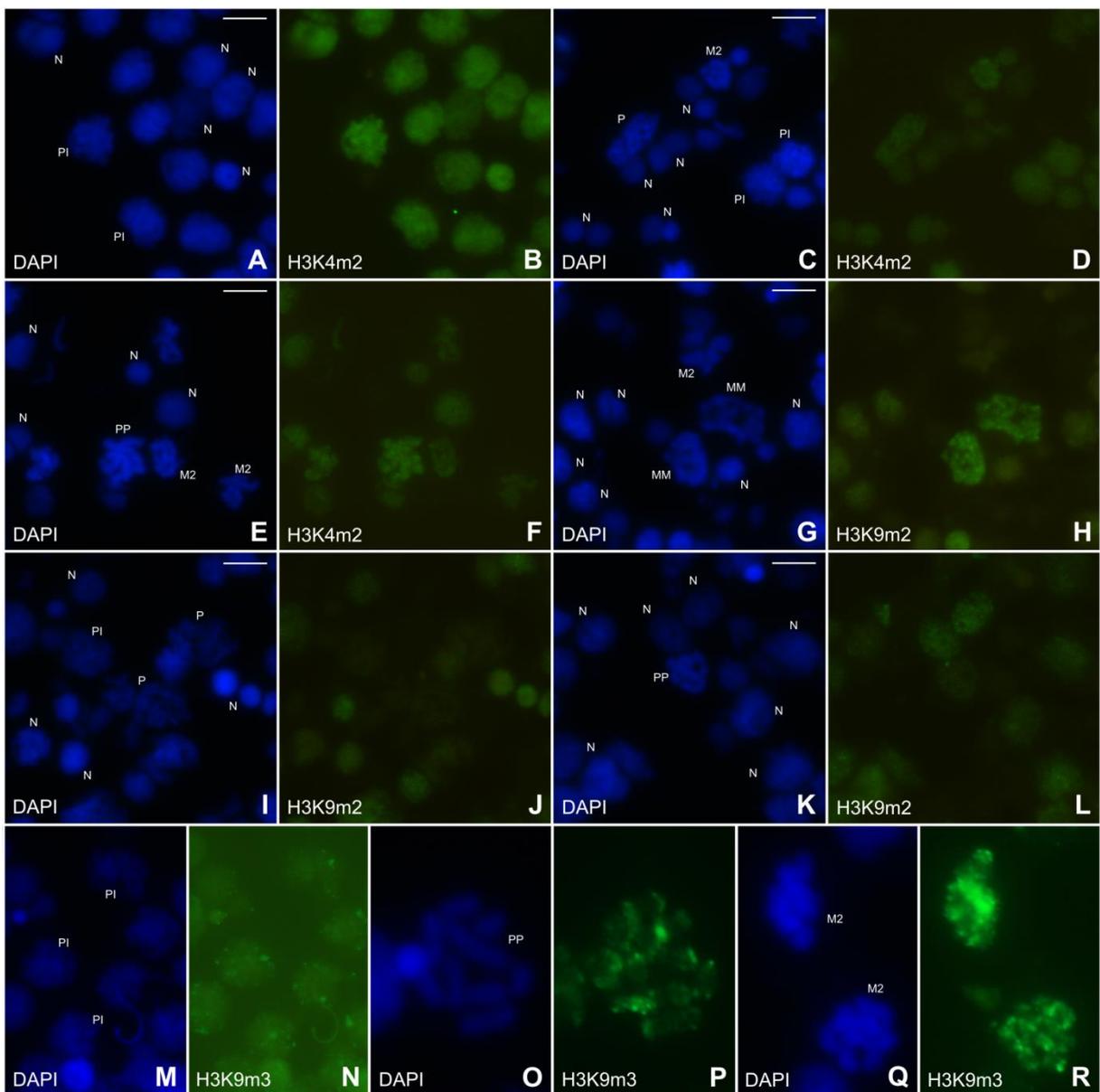


Fig. 2 – Imunodeteção das histonas H3K4m2 (A-F), K3K9me2 (G-L) e H3K9me3 (M-R). MM = metáfase mitótica. M2 = metáfase II. N = núcleo interfásico. P = paquíteno. PI = prófase inicial. PP = pós-paquíteno. Escala = 10μm.

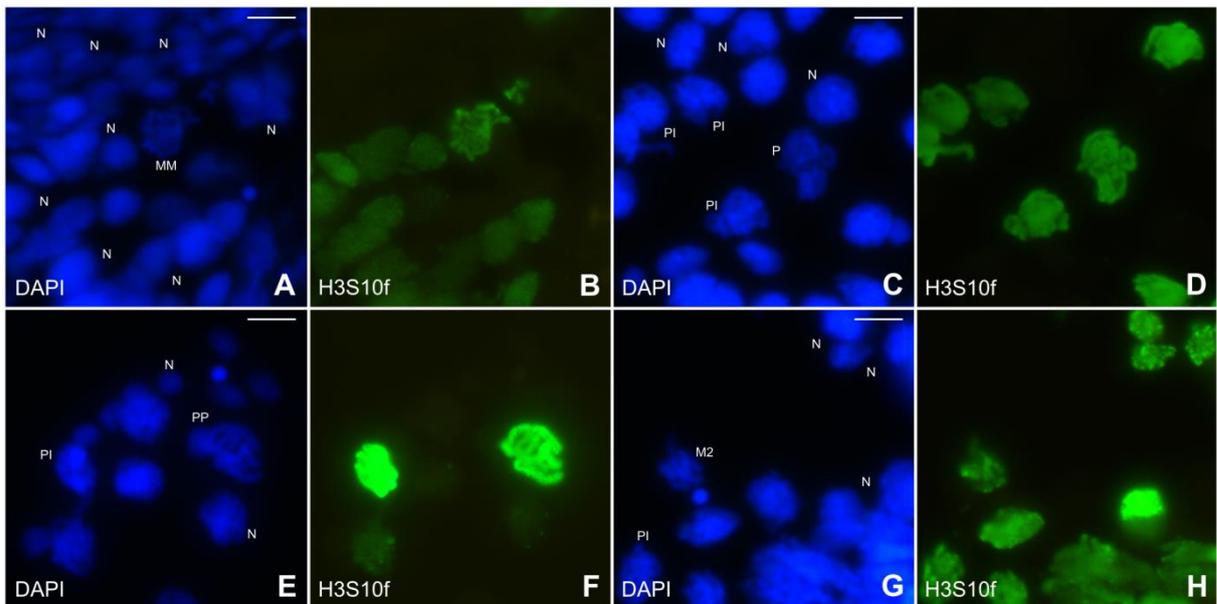


Fig. 3 – Imunodeteção da histona H3S10f em cromossomos de *Tityus paraguayensis*. MM = metáfase mitótica. M2 = metáfase II. N = núcleo interfásico. P = paquíteno. PI = prófase inicial. PP = pós-paquíteno. Escala = 10 μ m.

Discussão

A regulação transcricional não é simplesmente determinada pela sequência de DNA, mas é mediada através de modificações na cromatina (Sternier e Berger 2000, Chen e Tiang 2007). A acetilação de histonas afeta a conformação da cromatina, regulando funções celulares como, replicação, transcrição e progressão do ciclo celular (Sternier e Berger 2000, Chen et al. 2001, Roth et al. 2001, Wako et al. 2002, Legube e Trouche 2003).

Todos os núcleos apresentaram-se uniformemente acetilados em *T. paraguayensis*. Pouco é conhecido sobre acetilação de histonas de um domínio cromossômico específico durante estágios interfásicos definidos. Entretanto, o tratamento com tricostatina A, um inibidor de histona desacetilase, indica que a acetilação da H4 em domínios cromossômicos específicos pode variar na interfase (Jasencakova et al. 2000). Jasencakova et al. (2000), relataram quatro tipos de marcação de acetilação da H4K5 em núcleos interfásicos do feijão do campo, sendo um deles semelhante ao descrito para *T. paraguayensis*, onde não aparecem diferenças na intensidade de marcação dos nucléolos e da cromatina remanescente. A acetilação de histonas H4K5 e H4K12 estão relacionadas à ativação genômica e ao funcionamento das regiões organizadoras nucleolares, evitando a condensação desses domínios cromossômicos em preparação para a transcrição em *Hordeum vulgare* e *Vicia faba* (Houben et al. 1996, 1997, 2013, Belyaev et al. 1997, 1998, Jasencakova et al. 2001, Wako et al. 2002, Cabrero et al. 2007).

Tityus paraguayensis mostrou resultados de acetilação para H3K9 e H4K5. A dificuldade em obter anticorpos para organismos não modelo, tal como escorpiões, faz com que sejam analisadas a presença e distribuição de variantes de histonas que são comuns em eucariotos (Viera et al. 2009). Assim, esses são os primeiros resultados de modificações em histonas não apenas em escorpiões, mas em Arachnida como um

todo. Locais de acetilação relacionados à resíduos de lisina 5 e 12 da H4 são conservados em células bem distintas, como de *Drosophila* e da linhagem Hela 114 (Sobel et al. 1995). Entretanto, quanto à histona H3, diferenças podem ser observadas. As lisinas 9 e 14 são sítios de acetilação em *Tetrahymena*, ao passo que, as lisinas 14 e 23 são preferencialmente acetiladas em *Drosophila* (Sobel et al. 1995). *Tityus paraguayensis* não mostrou níveis de acetilação em fases posteriores a prófase I. Níveis de acetilação de H3K9 e H4K5 são reduzidos em células mitóticas, sugerindo que a cromatina hiperacetilada prejudica a condensação cromossômica, que futuramente interfere na separação das cromátides-irmãs e na progressão mitótica (Cimini et al. 2003, Chen e Tian 2007).

Formação, regulação da heterocromatina e expressão gênica estão relacionadas ao processo de modificação de histonas e metilação do DNA (Cedar e Bergman 2009, Saksouk et al. 2015). Adicionalmente, modificações sequenciais entre acetilação e metilação podem ocorrer (Pokholok et al. 2005, Chen e Tian 2007). A dimetilação da histona H3 na lisina 4 ocorreu em todas as fases do ciclo celular de *T. paraguayensis*, tornando-se mais intensa a partir do paquíteno. Esse resultado demonstra uma modificação sequencial, na qual a dimetilação ocorreu após a acetilação da H4K5 e H3K9. Um estudo revelou que modificações sequenciais entre acetilação e metilação têm ocorrido em leveduras, sugerindo que a acetilação de histonas ocorre predominantemente no início dos genes, enquanto a dimetilação e trimetilação pode aparecer em todas as regiões dos genes ativamente transcritos (Pokholok et al. 2005, Vakoc et al. 2005, Chen e Tian 2007). Mais notavelmente, eventos específicos de metilação estão associados com o meio e o fim de genes ativamente transcritos (Pokholok et al. 2005).

Metilações da H3K9 estão relacionadas ao silenciamento gênico, agindo como marcadores de heterocromatina constitutiva. Tal modificação tem sido comumente

encontrada em regiões heterocromáticas, uma vez que a desacetilação da H3K9 permite a ligação da proteína HP1 e, conseqüente, a formação da heterocromatina (Li et al. 2007, Cedar e Bergman 2009, Saksouk et al. 2015). Desta forma, a desacetilação e metilação da histona H3 na lisina 9 são necessárias para a condensação cromossômica adequada (Park et al. 2011).

A trimetilação pontual e a hipertrimetilação em núcleos interfásicos/ profásicos I iniciais e na região terminal de alguns cromossomos, respectivamente, foram observados em *T. paraguayensis*. A trimetilação da H3K9 e H4K20 tem sido recentemente identificada em domínios teloméricos e subteloméricos de mamíferos (Garcia-Cao et al. 2004, Gonzalo et al. 2005, Gonzalo et al. 2006). Em *T. paraguayensis*, a hipertrimetilação nas extremidades cromossômicas pode estar relacionada à segregação de cromossomos holocêntricos, fazendo com que apenas estas regiões interajam com as fibras do fuso. Estudos em Heteroptera tem mostrado que a trimetilação da H3K9 é restrita a regiões terminais dos autossomos, fazendo com que a atividade cinética dos cromossomos fique limitada as extremidades, ou seja, cromossomos holocêntricos funcionam como monocêntricos durante a meiose (Viera et al. 2009). No entanto, em Heteroptera, a característica mais peculiar é que embora ambas as extremidades dos cromossomos possam adquirir a atividade cinética devido à modificação da histona H3, apenas uma delas torna-se ativa, possibilitando que cada bivalente adquira ao menos duas orientações alternativas na metáfase I (Viera et al. 2009). Almeida et al. (2017) relataram o acúmulo de sequências repetitivas na região distal dos cromossomos de *T. obscurus*, sugerindo que essas regiões não estariam cobertas pelos cinetócoros, e portanto, não teriam atividade cinética. No entanto, os resultados obtidos em *T. paraguayensis* parecem contrariar essa hipótese.

Escorpiões apresentam um grande número de rearranjos cromossômicos, os quais conferem a variabilidade neste grupo (Schneider et al. 2009, Mattos et al. 2013,

Almeida et al. 2017). Em consequência disso, revelam associações multivalentes na meiose I, compostas por um número variável de cromossomos (Schneider et al. 2009, Mattos et al. 2013, Almeida et al. 2017, ver Capítulo I). A atividade cinética nas porções distais dos cromossomos holocêntricos de escorpiões pode ser estar relacionada ao mecanismo de segregação dos cromossomos, garantindo a correta disjunção, principalmente daqueles pertencentes a associações multivalentes.

A fosforilação e metilação de histonas H3 são responsáveis pela condensação cromossômica (Park et al. 2011). Os cromossomos de *T. paraguayensis* apresentaram-se inteiramente fosforilados a partir da prófase I, com evidência de hiperfosforilação na região distal de alguns cromossomos. Este padrão é similar aquele encontrado em outros artrópodes, que possuem cromossomos monocêntricos ou holocêntricos, como gafanhoto, besouros e percevejos (Sotero-Caio et al. 2011) e plantas portadoras de cromossomos holocêntricos (Guerra et al. 2006, Marcon-Tavares et al. 2014). Além disso, nossos resultados revelaram que todos os cromossomos aparecem igualmente fosforilados durante a meiose, diferindo do que foi observado em espécies de três grupos de artrópodes que possuem cromossomos sexuais diferenciados. Nestes organismos, os cromossomos sexuais aparecem hipofosforilados até a anáfase II (Sotero-Caio et al. 2011). Este resultado é interessante, pois além de ser um indício da ausência de cromossomos sexuais em *T. paraguayensis*, permite que a fosforilação da H3S10 seja investigada em espécies de escorpiões que foram recém descritas como portadoras de cromossomos sexuais.

Agradecimentos

Essa pesquisa tem apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP (2013/11840-0; 2011/21643-1). A coleta de exemplares foi realizada com autorização do Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e Recursos

Naturais Renováveis (IBAMA) e do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBIO) (Número: 40014-3). Adicionalmente, gostaríamos de agradecer ao Prof. Dr. Douglas de Araujo pelo auxílio na coleta dos exemplares de *Tityus paraguayensis*.

Referências

- Almeida BRR, Milhomem-Paixão SSR, Noronha RCR, Nagamachi CY, Costa MJR, Pardal PPO, Coelho JS, Pieczarka JC (2017). Karyotype diversity and chromosomal organization of repetitive DNA in *Tityus obscurus* (Scorpiones, Buthidae). **BMC Genetics** 18:35.
- Bannister AJ, Kouzarides T (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. **Cell Research** 21:381-395.
- Belyaev ND, A Houben, Baranczewski P, Schubert I (1998). The acetylation patterns of histones H3 and H4 along *Vicia faba* chromosomes are different. **Chromosome Research** 6:59-63.
- Belyaev ND, Houben A, Baranczewski P, Schubert I (1997). Histone H4 acetylation in plant heterochromatin is altered during the cell cycle. **Chromosoma** 106:193-197.
- Cabrero J, Teruel M, Carmona FD, Jiménez R, Camacho JP (2007). Histone H3 lysine 9 acetylation patterns suggest that X and B chromosomes are silenced during entire male meiosis in grasshopper. **Cytogenetic and Genome Research** 119(1-2):135-142.
- Cedar H, Bergman Y (2009). Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. **Nature Review Genetics** 10(5):295-304.
- Cerutti H, Casas-Mollano Histone H3 phosphorylation: universal code or lineage specific dialects? **Epigenetics** 4(2):71-75.

- Chen H, Tini M, Evans RM. HATs on and beyond chromatin. **Current Opinion in Cell Biology** 13(2):218-224.
- Chen ZJ, Tian L (2007). Roles of dynamic and reversible histone acetylation in plant development and polyploidy. **Biochimica et Biophysica Acta** 1769(5-6):295-307.
- Cimini D, Mattiuzzo M, Torosantucci L, Degrossi F (2003). Histone hyperacetylation in mitosis prevents sister chromatid separation and produces chromosome segregation defects. **Molecular Biology of the Cell** 14:3821-3833.
- Fernandes T, Yuyama PM, Moraes AP, Vanzela ALL (2008). An uncommon H3/Ser10 phosphorylation pattern in *Cestrum strigilatum* (Solanaceae), a species with B chromosomes. **Genome** 51:772-777.
- Garcia-Cao M, O'Sullivan R, Peters AHFM, Jenuwein T, Blasco M (2004) Epigenetics regulation of telomere length in mammalian cells by Suv39h1 and Suv39h2 histone methyltransferases. **Nature Genetics** 36(1):94-99.
- Gonzalo S, García-Cao M, Fraga MF, Schotta G, Peters AHFM, Cotter AE, Eguía R, Dean DC, Esteller M, Jenuwein T, Blasco MA (2005). Role of the RB1 family in stabilizing histone methylation at constitutive heterochromatin. **Nature Cell Biology** 7:420-428.
- Gonzalo S, Jaco I, Fraga MF, Chen T, Li E, Esteller M, Blasco MA (2006). DNA methyltransferases control telomere length and telomere recombination in mammalian cells. **Nature Cell Biology** 8(4):416-424.
- Guerra M, Brasileiro-Vidael AC, Arana P, Puertas MJ (2006). Mitotic microtubule development and histone H3 phosphorylation in the holocentric chromosomes of *Rhynchospora tenuis* (Cyperaceae). **Genetica** 126:33-41.

- Hayashi-Takanaka Y, Yamagata K, Nozaki N, Kimura H (2009). Visualizing histone modifications in living cells spatiotemporal dynamics of H3 phosphorylation during interphase. **The Journal of Cell Biology** 187(6):781-790.
- Houben A, Belyaev ND, Leach CR, Timmis JN (1997). Differences of histone H4 acetylation and replication timing between A and B chromosomes of *Brachycome dichromosomatica*. **Chromosome Research** 5:233-237.
- Houben A, Belyaev ND, Turner BM, Schubert I (1996). Differential immunostaining of plant chromosomes by antibodies recognizing acetylated histone H4 variants. **Chromosome Research** 4:191-194.
- Houben A, Demidov D, Caperta AD, Karimi R, Aqueci F, Vlasenko L (2007). Phosphorylation of histone H3 in plants – a dynamic affair. **Biochimica Biophysica Acta** 1769:308-315.
- Houben A, Demidov D, Karimi-Ashtiyani R (2013). Epigenetic control of cell division. In: **Epigenetic Memory and Control in Plants** pp. 155-175.
- Jasencakova Z, Meister A, Schubert I (2001). Chromatin organization and its relation to replication and histone acetylation during the cell cycle in barley. **Chromosoma** 110:83-92.
- Jasencakova Z, Meister A, Walter J, Turner BM, Schubert I (2000). Histone H4 acetylation of euchromatin and heterochromatin is cell cycle dependent and correlated with replication rather than with transcription. **The Plant Cell** 12:2087-2100.
- Kim JH, Workman JL (2010). Histone acetylation in heterochromatin assembly. **Genes & Development** 24:738-740.
- Kouzarides T (2007). Chromatin modifications and their function. **Cell** 128:693-705.
- Legube G, Trouche D (2003). Regulating histone acetyltransferases and deacetylases. **EMBO Reports** 4(10):944-947.

- Li B, Carey M, Workman JL (2007). The role of chromatin during transcription. **Cell** 128:707-719.
- Marcon-Tavares AB, Felinto F, Feitoza L, Barros e Silva AE, Guerra M (2014). Different patterns of chromosomal histone H3 phosphorylation in land plants. **Cytogenetic and Genome Research** 143(1-3):136-143.
- Mattos VF, Cella DM, Carvalho LS, Schneider MC (2013). High chromosome variability and the presence of multivalent associations in buthid scorpions. **Chromosome Research** 21:121-136.
- Park JA, Kim AJ, Kang Y, Jung YJ, Kim HK, Kim KC (2011). Deacetylation and methylation at histone H3 lysine 9 (H3K9) coordinate chromosome condensation during cell cycle progression. **Molecules and Cell** 31:343-349.
- Pokholok DK, Harbison CT, Levine S, Cole M, Hannett NM, Lee TI, Bell GW, Walker K, Rolfe PA, Herbolsheimer E, Zeitlinger J, Liewitter F, Gifford DK, Young RA (2005). Genome-wide map of nucleosome acetylation and methylation in yeast. **Cell** 122:517-527.
- Roth SY, Denu JM, Allis D (2001). Histone acetyltransferases. *Annual Review of Biochemistry* 70:81-120.
- Saksouk N, Simoeck E, Déjardin J (2015). Constitutive heterochromatin formation and transcription in mammals. **Epigenetics and Chromatin** 8:3.
- Schneider MC, Zacaro AA, Pinto-da-Rocha R, Candido DM, Cella DM (2009). Complex meiotic configuration of the holocentric chromosomes: the intriguing case of the scorpion *Tityus bahiensis*. **Chromosome Research** 17:883-898.
- Sobel RE, Cook RG, Perry CA, Annunziato AT, Allis CD (1995). Conservation of deposition-related acetylation sites in newly synthesized histones H3 and H4. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States** 92:1237-1241.

- Soppe WJJ, Jasencakova Z, Houben A, Kakutani T, Meister A, Huang MS, Jacobsen SE, Schubert I, Fransz PF (2002). DNA methylation controls histone H3 lysine 9 methylation and heterochromatin assembly in *Arabidopsis*. **The EMBO Journal** 21(23):6549-6559.
- Sotero-Caio CG; de Souza MJ; Cabral-de-Mello DC, Brasileiro-Vidal AC, Guerra M (2011). Phosphorylation of histone H3S10 in animal chromosomes: is there a uniform pattern? **Cytogenetic and Genome Research** 135(2):111-117.
- Sterner DE, Berger SL (2000). Acetylation of histones and transcription related factors. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** 64(2):435-459.
- Vakoc CR, Mandat SA, Olenchok BA, Blobel GA (2005). Histone H3 lysine 9 methylation and HP1 are associated with transcription elongation through mammalian chromatin. **Molecular Cell** 19:381-391.
- Viera A, Page J, Rufas JS (2009). Inverted meiosis: the true bugs as a model to study, p. 137-156. In: Meiosis. Editores: Benavente R, Volff JN. **Karger**.
- Wako T, Fukuda M, Furushima-Shimogawara R, Belyaev ND, Fukui K (2002). Cell cycle-dependent and lysine residue-specific dynamic changes of histone H4 acetylation in barley. **Plant Molecular Biology** 49:645-653.

CAPÍTULO III

Citogenética populacional de *Tityus mattogrossensis* (Scorpiones: Buthidae)

Viviane Fagundes Mattos¹, Marcos André Carvalho², Marielle Cristina Schneider³

¹Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Rio Claro, São Paulo, Brasil

²Universidade Federal de Mato Grosso, UFMT, Cuiabá, Mato Grosso, Brasil

³Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, Diadema, São Paulo, Brasil

Introdução

O escorpião *Tityus mattogrossensis*, pertencente à família Buthidae, possui tamanho corporal de 30 mm a 36 mm, coloração que vai desde o amarelo claro ao amarelo escuro, e um padrão variegado escuro por todo o corpo, característica essa que é compartilhada com todos os representantes do subgênero *Archaeotityus* (Lourenço 2006, Almeida 2010). Esta espécie encontra-se distribuída por áreas de cerrado e de formações abertas, ocorrendo em regiões centrais do território brasileiro, como, no sul da Bahia, Distrito Federal, Goiás, norte de Minas, norte de Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e sul de Tocantins (Almeida 2010).

Estudos citogenéticos em *T. mattogrossensis* foram realizados apenas por Piza (1947) que registrou o número diploide $2n=20$ para indivíduos de uma população de Três Lagoas, MS, Brasil. Neste trabalho, Piza (1947) chamou de aberrações cromossômicas os rearranjos encontrados em *T. mattogrossensis*, os quais envolveram até quatro cromossomos em uma associação multivalente. Desta forma, as seguintes configurações cromossômicas foram observadas por este autor em células pós-paquitênicas: oito bivalentes mais uma cadeia composta por quatro elementos (8II+CIV); nove bivalentes (9II), 10 bivalentes (10II) e 14 bivalentes (14II).

Estudos citogenéticos populacionais têm sido realizados em plantas (Chester et al. 2011, Jabeen et al. 2012, Baeza et al. 2015) e animais, tais como insetos, diplópodes, aracnídeos, peixes, anuros, roedores e morcegos (Tsurusaki 1993, Garcia et al. 2000, Tsurusaki e Shimada 2004, Vicari et al. 2005, Schneider et al. 2007, Mariano et al. 2008, Medrado et al. 2008, Barth et al. 2009, Neto et al. 2009, Schneider et al. 2009, Bruschi et al. 2013, Campos e Fontanetti 2013, Silva et al. 2015, Malleret et al. 2016, Peixoto et al. 2016, Aguiar et al. 2017, Almeida et al. 2017). Em alguns casos, pode-se observar similaridade do número diploide entre as populações, mas diferenças quanto à distribuição de heterocromatina constitutiva, de regiões organizadoras

nucleolares, e do gene ribossomal 18S, tal como descrito em *Alstroemeria presliana* ($2n=16$), *Astianax fasciatus* ($2n=48$), *Hoplias malabaricus* ($2n=42$); *Pseudonnanolenestrinatti* ($2n=16$). (Vicari et al. 2005, Medrado et al. 2008, Campos e Fontanetti 2013, Baeza et al. 2015). Por outro lado, diferenças acentuadas no número diploide têm sido descritas, como por exemplo, em populações de *Ctenomys minutus* ($2n=42-50$), *Dinoptera lucida* ($2n=106-120$) e *Sitophilus zeamais* ($2n=22-26$) (Freitas 1997; Gava e Freitas 2002; 2003; Freygang et al. 2004; Mariano et al. 2008; Castilho et al. 2012; Silva et al. 2015).

O número diploide nos butídeos é extremamente variável ($2n=5-56$). Consequentemente, cerca de 1/3 de todas as espécies estudadas exibiram variação intraespecífica (intra e/ou interpopulacional) no número cromossômico, o que pode envolver apenas um ou dois elementos, como em *Ananteris balzani* ($2n=12, 14$) e *Lychas marmoreus* ($2n=12, 14, 15$) ou diversos elementos, como em *Buthus occitanus* ($2n=22, 44, 56$) e *Uroplectes carinatus* ($2n=40-48$) (Carnoy 1885, Makino 1956, Guénin 1961, Newlands e Martindale, 1980, Shanahan 1989, Shanahan e Hayman 1990, Mattos et al. 2013, ver Schneider et al. 2017). O caso mais intrigante de variação cromossômica tem sido observado em *Tityus bahiensis* ($2n=5-19$) (Piza 1940, 1949, 1950, Brieger e Graner 1943, Schneider et al. 2009, ver Schneider et al. 2017). Variações cromossômicas em escorpiões têm sido atribuídas a rearranjos cromossômicos originados por fissões/fusões e translocações recíprocas, e na maioria dos casos, tais rearranjos deram origem a complexas associações multivalentes na meiose I. Adicionalmente, devido a sua ampla distribuição, grande número de espécies descritas e ausência de características morfológicas que permitam diferenciar as espécies do gênero, *Tityus* pode ser considerado um grupo bastante complexo, o que torna seu estudo bastante interessante (Riquelme et al. 2015).

por PCR e detectadas com Alexa Fluor 488 (200 µg/mL). As lâminas foram incubadas em solução de pepsina 1% e RNase/2xSSC (40 µg/mL), por cerca de uma hora a 37°C. As preparações foram fixadas em formaldeído 1% (1xPBS/50mM MgCl₂), durante 10 minutos, posteriormente lavadas em 1xPBS, por cinco minutos, e desidratadas em série alcóolica de 70%, 90% e 100%, durante cinco minutos cada. O DNA cromossômico foi desnaturado em formamida 70%/2xSSC, por cerca de três minutos e trinta segundos a uma temperatura de 70°C e, posteriormente, desidratado em série alcóolica gelada nas mesmas porcentagens citadas acima. A solução de hibridação foi desnaturada em termociclador por 10 minutos a 95°C, e, posteriormente, adicionados sobre as lâminas, as quais foram mantidas em câmara úmida a 37°C *overnight*. As lavagens pós-hibridação foram feitas com formamida 15%/2xSSC, duas vezes durante cinco minutos cada, a 42°C, e em Tween 0,5%, por cinco minutos a temperatura ambiente. Os cromossomos foram contra corados com DAPI/Vectashield. As imagens das células mitóticas e meióticas foram capturadas em um fotomicroscópio Zeiss Imager A2, utilizando o software Axio Vision. O comprimento diploide (DSL) foi determinado em células pós-paquitênicas dos indivíduos 492 (27 células), 1029 (14 células) e 1220 (25 células) pertencentes às populações de Chapada dos Guimarães, Januária e Alto Araguaia (ponto 2), respectivamente, com o objetivo de identificar se há diferença entre as configurações meióticas descritas para as diferentes populações (ver resultados). Para realização das medidas foi utilizado o programa Image J (Image Processing and Analysis in Java) desenvolvido pela Research Service Branch of the US National Institute of Mental Health. Posteriormente, os valores de DSL obtidos foram comparados através da análise de componentes principais (PCA), através do software Past (Paleontological Statistics), versão 2.17.

Tabela 1. Número de indivíduos de *Tityus mattogrossensis* analisados neste trabalho e seus respectivos locais de coleta nos estados brasileiros. GO=Goiás, MG=Minas Gerais, MT=Mato Grosso.

Espécie	Número de indivíduos	Localidade
<i>Tityus mattogrossensis</i> Borelli, 1901	9♂	Alto Araguaia (17°17'S, 53°13'O), MT, Ponto 1
	13♂	Alto Araguaia (17°08'S, 53°12'O), MT, Ponto 2
	2♂	Aruanã (14°55'S, 51°04'O), GO
	15♂	Cuiabá (15°29'S, 56°43'O), MT
	2♂	Parque Nacional Cavernas do Peruaçu (15°07'S, 44°16'O), Januária, MG
	5♂/3♀	Parque Nacional Chapada dos Guimarães (15°17'S, 55°48'O), Chapada dos Guimarães, MT
Total	46♂/3♀	

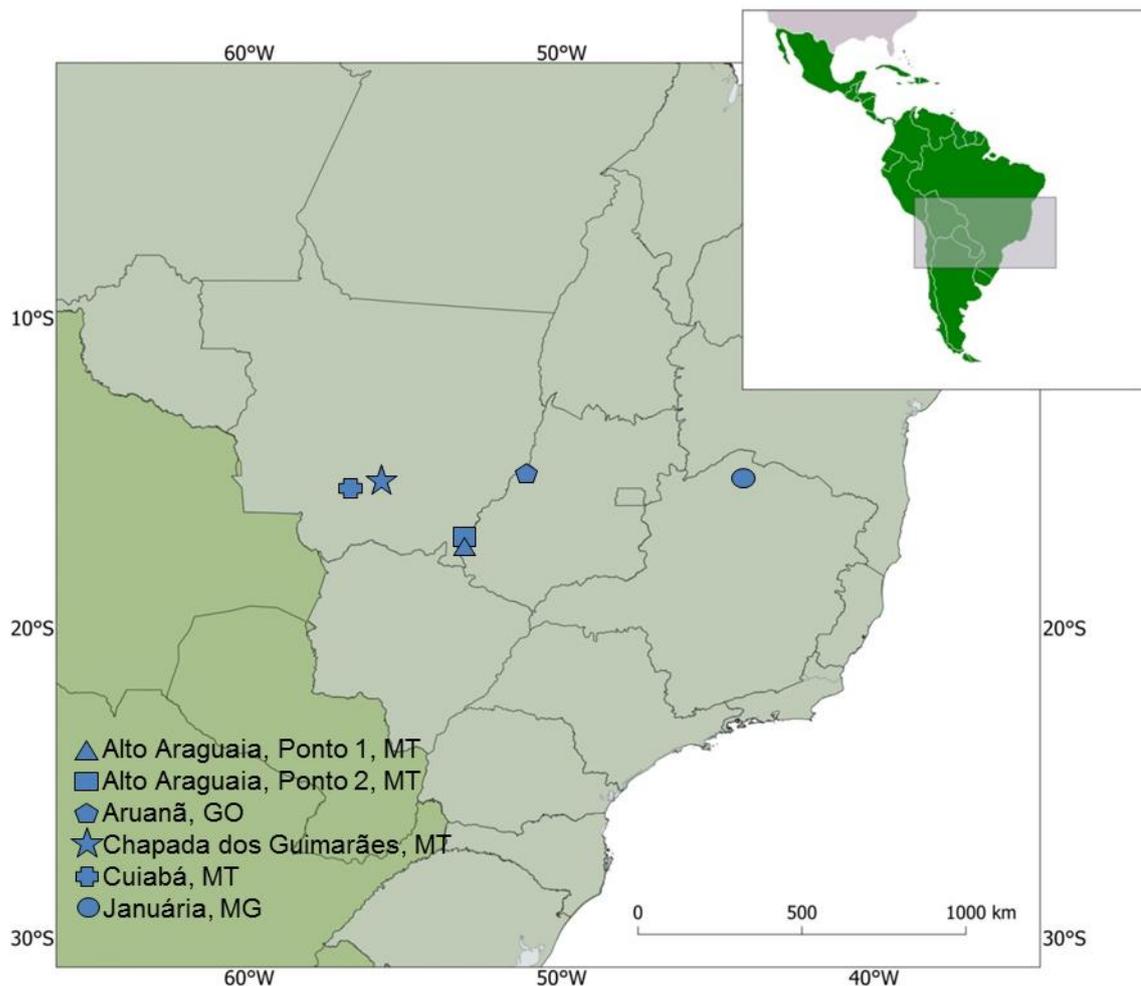


Fig. 1 – Locais de coleta de *Tityus mattogrossensis* no território brasileiro. GO=Goiás, MG=Minas Gerais, MT=Mato Grosso.

Resultados

Metáfase espermatogoniais de *T. mattogrossensis* revelaram $2n=19$ em cinco indivíduos da população de Cuiabá (Fig. 2A) e $2n=20$ em todos os exemplares de Alto Araguaia (pontos 1 e 2), Aruanã, Januária, Chapada dos Guimarães, e em quatro machos de Cuiabá (Fig. 2C, E) (Tabela 2). Devido à baixa quantidade de células mitóticas, não foi possível determinar o número diploide em nove machos pertencentes à população de Alto Araguaia (pontos 1 e 2), seis machos de Cuiabá, um macho e três fêmeas de Chapada dos Guimarães. Os cromossomos de todos os indivíduos decresceram gradualmente em tamanho e foram classificados como holocêntricos, pelo fato de não apresentarem uma região centromérica localizada (Fig. 2A-E). Eventualmente, indivíduos de Cuiabá apresentaram um cromossomo de tamanho muito menor quando comparado aos demais elementos do complemento (Fig. 2E).

Paquítenos iniciais apresentaram filamentos cromossômicos únicos, os quais estavam completamente emparelhados em paquítenos tardios. Devido ao fato de alguns bivalentes convergirem para um único ponto, a extremidade de um bivalente parece se conectar a extremidade de outro bivalente, tornando difícil determinar com precisão o número de bivalentes nesta fase (Fig. 2F).

As configurações cromossômicas observadas em células pós-paquitênicas de 25 exemplares de *T. mattogrossensis* foram agrupadas da seguinte forma: 1) indivíduos com $2n=19$ apresentaram quatro configurações meióticas distintas, ou seja, nove e/ou 10 bivalentes (9II; 10II) (Fig. 2G-H), seis bivalentes mais duas associações multivalentes compostas por três e quatro cromossomos (6II+CIII+CIV) (Fig. 2I), ou ainda, oito bivalentes mais uma cadeia de três cromossomos (8II+CIII) (Fig. 2J); 2) indivíduos com $2n=20$ (com exceção de indivíduos de Cuiabá) mostraram 10II (Fig. 2H) ou oito bivalentes mais uma associação multivalente composta por quatro cromossomos (8II+CIV) (Fig. K-M) (Tabela 2). Além disso, uma diferença quanto ao tamanho dos

cromossomos que constituem a cadeia foi observada entre os espécimes com 8II+CIV: 1) cromossomos que constituem a cadeia com tamanho similar, nos indivíduos de Alto Araguaia, ponto 2 (Fig. 2K), 2) cadeia composta por dois cromossomos grandes e dois médios, nos exemplares de Chapada dos Guimarães (Fig. 2L) e 3) quadrivalente formado por dois cromossomos grandes, um médio e um pequeno, nos indivíduos de Januária (Fig. 2M). O DSL de células pós-paquitênicas portadoras da configuração 8II+CIV foi determinado e comparado por PCA nos indivíduos de Alto Araguaia (ponto 2), Chapada dos Guimarães e Januária, a fim de avaliar se a diferença de tamanho dos cromossomos que compõe a cadeia era significativa. A análise do DSL total não mostrou valor significativo, indicando que não existe diferença entre os indivíduos, quando comparados o comprimento de todos os bivalentes e cromossomos da cadeia. No entanto, quando analisamos apenas o comprimento dos cromossomos da cadeia, foi possível verificar o agrupamento dos cromossomos dos indivíduos pertencente a cada população (Fig. 3), o que mostra que a associação quadrivalente é constituída por cromossomos diferentes. Metáfases II revelaram a correta segregação e disjunção dos cromossomos durante a anáfase I, uma vez que apresentaram $n=9$ (Fig. 2N) e $n=10$ (Fig. 2O) em todos os indivíduos portadores do número diploide $2n=19$ e, $n=10$ em indivíduos com número diploide $2n=20$ (Fig. 2O).

Metáfases mitóticas de todos os indivíduos das seis populações de *T. mattogrossensis* estudadas, quando impregnadas pelo íon prata revelaram RONS nas regiões terminais de dois cromossomos de tamanho médio/pequeno (Fig. 2B, D). Indivíduos de diferentes populações, os quais possuem configurações meióticas distintas, foram submetidos à técnica de FISH com sonda de rDNA 28S (Fig. 4). Células em metáfase mitótica revelaram um par de cromossomos portador do gene de rDNA 28S, confirmando o número e localização das Ag-RONS. Entretanto, o tamanho do cístron ribossomal diferiu entre os cromossomos, o que tornou difícil a visualização do

sítio ribossomal no cromossomo que apresenta uma sequência de rDNA 28S com poucas repetições (Fig. 4F). Células paquitênicas revelaram sítios ribossomais na região terminal de um bivalente (Fig. 4B). Em células pós-paquitênicas, independentemente da configuração meiótica, os sítios de rDNA 28S estavam sempre localizados em cromossomos de tamanho similar, não envolvidos nas associações multivalentes, como mostram as Figuras 4C-E de indivíduos de Cuiabá com 8II+CIV e Chapada dos Guimarães com 9II e 10II. Células em metáfase II revelaram apenas um cromossomo portador do gene ribossomal 28S, o que corrobora a segregação correta e balanceada dos cromossomos na anáfase I (Fig. 4G).

Preparações citológicas submetidas ao bandeamento C e subsequentemente coradas com DAPI apresentaram um pequeno bloco de heterocromatina constitutiva na região terminal de apenas um cromossomo (Fig. 4H). Células paquitênicas submetidas à técnica de FISH com sonda telomérica TTAGGn exibiram sinais positivos localizados nas porções finais dos bivalentes (Fig. 4I).

Tabela 2 – Características cromossômicas de *Tityus mattogrossensis* analisados neste trabalho, incluindo o número diploide e as configurações em células pós-paquitênicas dos machos. Parênteses = número de células. NV = número variável de bivalentes e/ou cadeias cromossômicas em células pós-paquitênicas. ND = número de bivalentes e cromossomos nas cadeias não determinados. II = bivalente. III = trivalente. CIV = quadrivalente.

Espécie	Configuração cromossômica em células pós-paquitênicas							Total
	6II+CIII+CIV	8II+CIII	9II	10II	8II+CIV	NV	ND	
<i>Tityus mattogrossensis</i>								
Alto Araguaia Ponto 1– 2n=20 – 1211; 1212; 1215; 1217; 1218	-	-	-	61.03 (83)	-	29.41 (40)	9.56 (13)	136
Alto Araguaia Ponto 2 – 2n=20 – 1221; 1223;1247; 1248; 1250 1220	-	-	-	69.62 (55)	-	27.84 (22)	2.54 (2)	79
Aruanã– 2n=20 – 990; 991	-	-	-	88.23 (30)	-	11.77 (4)	-	34
Cuiabá – 2n=19 – 1253	51.85 (14)	-	-	-	-	29.63 (8)	18.52 (5)	27
1258	-	45 (9)	-	-	-	50 (10)	5 (1)	20
452	-	-	25 (8)	40.62 (13)	-	31.25 (10)	3.13 (1)	32
449; 454	-	-	-	27.27 (6)	-	59.10 (13)	13.63 (3)	22
Januária– 2n=20 –1028	-	-	-	63.15 (60)	-	36.85 (35)	-	95
1029	-	-	-	-	46.67 (21)	40 (18)	13.33 (6)	45
Chapada dos Guimarães – 2n=20 – 435; 445; 519; 576 492	-	-	-	71.96 (95)	-	28.04 (37)	-	132
	-	-	-	-	92.60 (25)	7.40 (2)	-	27

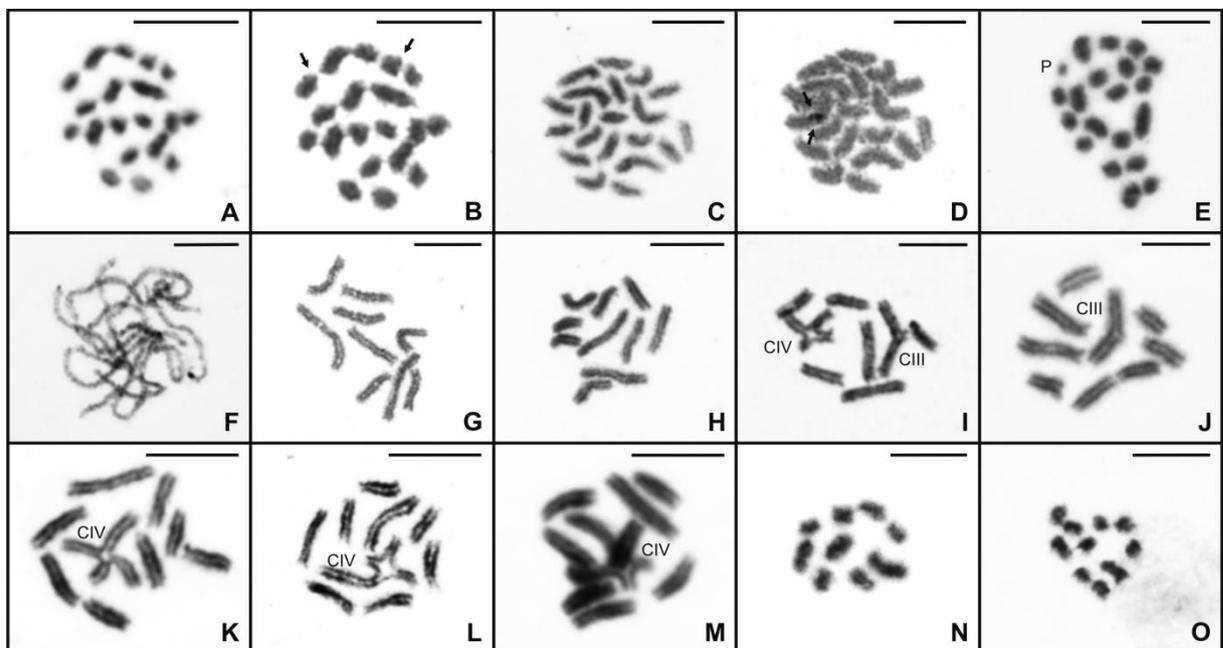


Fig. 2 – Células testiculares de *Tityus mattogrossensis* coradas com Giemsa (**A, C, E-O**) e impregnadas pelo íon prata (**B, D**). **A-E**. Metáfases mitóticas com $2n=19$ (**A-B**) e $2n=20$ (**C-E**). As regiões organizadoras nucleolares foram localizadas na região terminal de dois cromossomos (seta) (**B, D**). **F**. Paquíteno com bivalentes convergindo para um único ponto central. **G-M**. Pós-paquítenos, mostrando 9II (**G**), 10II (**H**), 6II+CIII+CIV (**I**), 8II+CIII (**J**) e 8II+CIV (**K-M**). **N-O**. Metáfases II com $n=9$ e $n=10$, respectivamente. II=bivalente. CIII=trivalente. CIV=quadrivalente. P=pequeno. Escala=10 μ m.

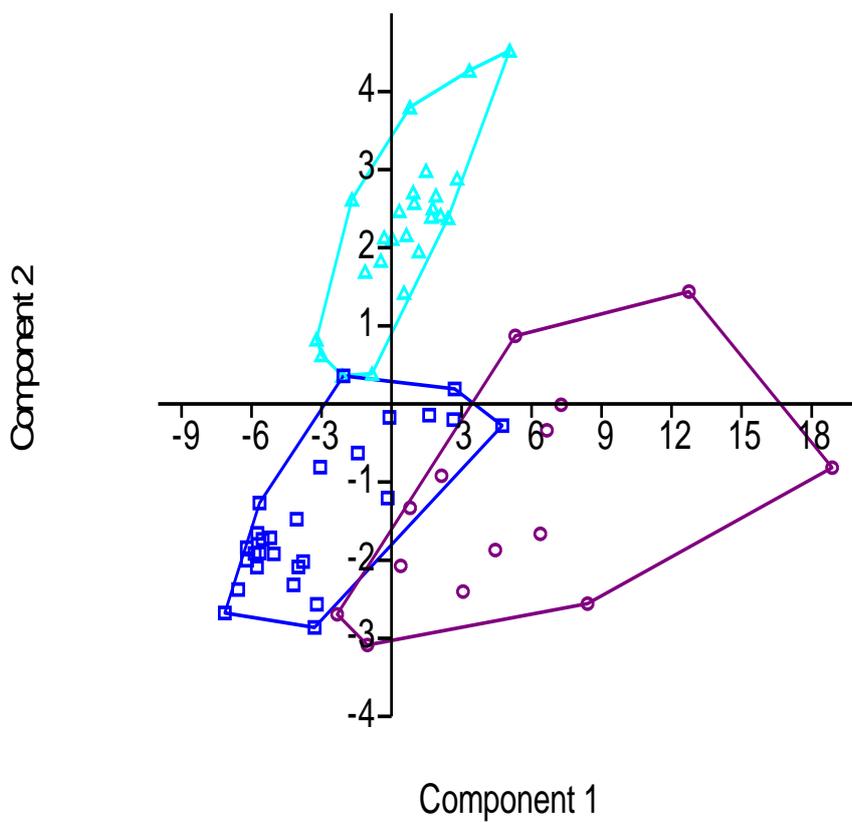


Fig. 3. Análise do comprimento total dos cromossomos constituintes da cadeia cromossômica da configuração 8II+ClV, entre três populações. Observar que os cromossomos de cada população estão agrupados. Roxo=Alto Araguaia. Azul escuro=Chapada dos Guimarães. Azul claro=Januária.

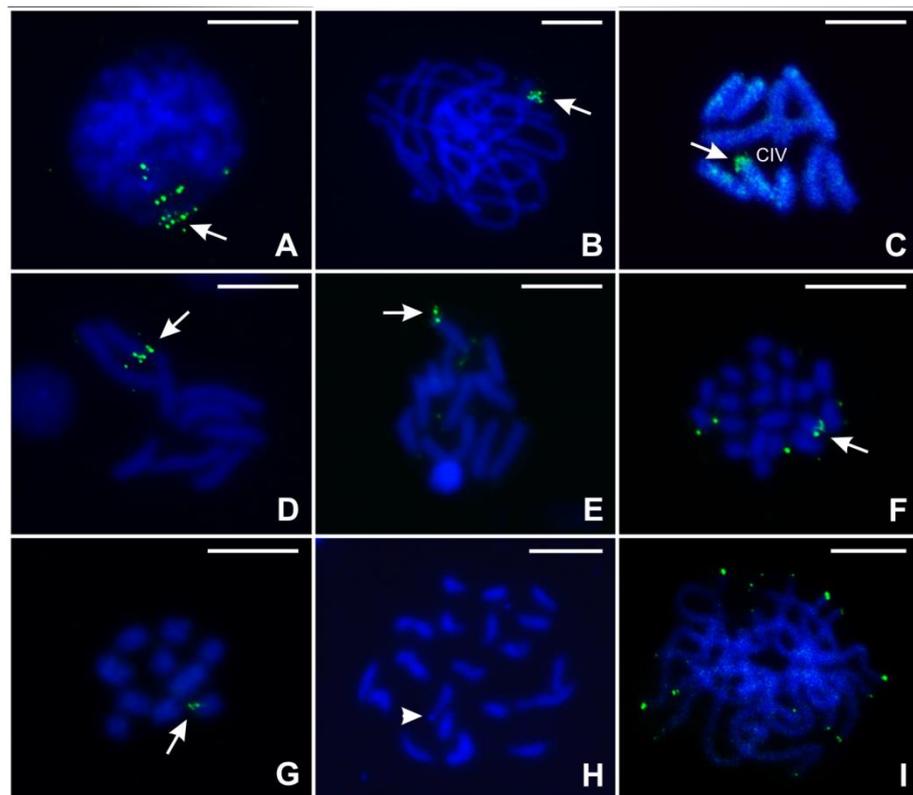


Fig. 4 – Hibridização in situ fluorescente com sonda ribossomal 28S (seta) (A-G), telomérica TTAGGn (sinal verde) (I) e bandamento C com coloração DAPI (cabeça-de-seta) (H). A. Núcleo interfásico. B, I. Paquíteno. C-E. Pós-paquíteno, exibindo sítios ribossomais na região terminal de um bivalente em configurações de 8II+CIV, 9II e 10II, respectivamente. F. Metáfase mitótica com $2n=20$. Notar que apenas um cromossomo apresentou cístron ribossomal bem evidente. G. Metáfase II com $n=9$ e localização dos genes ribossomais na região terminal de um cromossomo. H. Metáfase mitótica com $2n=20$. Notar o pequeno bloco de heterocromatina em apenas um cromossomo (cabeça-de-seta). I. Paquíteno mostrando sinais teloméricos na região terminal dos bivalentes. II=bivalente. IV=quadrivalente. Escala= $10\mu\text{m}$.

Discussão

As amostras de *T. mattogrossensis* estudadas neste trabalho foram coletadas em seis localidades distintas no território brasileiro. Apesar de algumas dessas populações serem geograficamente distantes entre si, similaridades relacionadas ao número diploide, comportamento dos cromossomos na meiose, bem como, de regiões cromossômicas específicas, como dos sítios ribossomais, regiões de heterocromatina e sequências teloméricas, foram observadas. Embora as espécies do gênero *Tityus* usualmente apresentem variações cromossômicas, similaridades cariotípicas foram descritas para populações geograficamente distantes nos escorpiões partenogenéticos *Tityus serrulatus* e *Tityus trivittatus* (Schneider e Cella 2010; Adilardi et al. 2014).

Entretanto, algumas diferenças cariotípicas foram observadas entre as populações de *T. mattogrossensis* analisadas aqui. A população de Cuiabá apresentou variação de número diploide, devido à presença de indivíduos com $2n=19$ e $2n=20$. Tal diferença provavelmente é consequência de rearranjo cromossômico do tipo fusão, que reduziu o número de cromossomos para $2n=19$ a partir do $2n=20$. Rearranjos do tipo fissão/fusão são comuns entre os escorpiões Buthidae e tem gerado toda a variabilidade de número diploide relatada para a família ($2n=5-56$) (ver Schneider et al. 2017). Variações intraespecíficas no número cromossômico também foram recentemente registradas em *Tityus obscurus* ($2n=11-16$) (Almeida et al. 2017), na qual os autores sugerem um padrão de variação cariotípica central-marginal, ou seja, as populações centrais da distribuição da espécie teriam a maior variabilidade genética que as populações marginais. Porém, em *T. mattogrossensis* não foi possível verificar tal padrão, uma vez que a presença de diferentes números diploides ocorreu apenas na população de Cuiabá.

A análise do comportamento dos cromossomos em células pós-paquitênicas revelou outra variação entre as populações analisadas, uma vez que quatro

configurações meióticas distintas foram observadas nos indivíduos de Cuiabá (9II, 10II, 6II+CIII+CIV, 8II+CIII), as quais foram exclusivas desta localidade e diferiram das fórmulas meióticas encontradas nas demais populações (8II+CIV e/ou 10II). Um estudo prévio de *T. mattogrossensis* foi realizado em indivíduos de Três Lagoas, MT, por Piza (1947), que revelou número diploide similar ao descrito para as populações analisadas neste trabalho ($2n=20$), com as seguintes fórmulas meióticas: 9II, 10II, 14II e 8II+CIV. A configuração 8II+CIV parece ser uma característica comum entre as populações de *T. mattogrossensis*. Porém, como os cromossomos que constituem a cadeia parecem ter tamanhos diferentes (Fig. 2K-M), nós comparamos o comprimento total do quadrivalente entre as populações de Alto Araguaia (ponto 2), Januária e Chapada dos Guimarães. A análise de PCA confirmou nossa hipótese e agrupou os cromossomos do quadrivalente cada qual a população correspondente, indicando que os cromossomos envolvidos nos rearranjos que deram origem a associação multivalente não foram os mesmos entre as populações. Assim, apesar das configurações meióticas parecerem similares, diferenças sutis revelam a variabilidade genética entre as populações investigadas.

Características cariotípicas similares referentes ao número diploide tem sido observadas em plantas e animais. Entretanto, estes organismos podem apresentar diferenças quanto à distribuição de heterocromatina constitutiva, de regiões organizadoras nucleolares e de genes ribossomais (Vicari et al. 2005, Medrado et al. 2008, Campos e Fontanetti 2013, Baeza et al. 2015). Vicari et al. (2005) e Neto et al. (2009) atribuíram as similaridades cariotípicas encontradas em diferentes populações de *Hoplias malabaricus* e *Astianax altiparaneae*, respectivamente, ao forte parentesco entre os indivíduos, porém as pequenas diferenças detectadas, tais como, fórmula cariotípica e número de regiões organizadoras nucleolares indicam divergência evolutiva devido a restrição de fluxo gênico. Adicionalmente, um estudo envolvendo 146 populações da aranha *Delena cancerides*, coletadas ao longo do sudeste da Austrália, revelou apenas

uma constituição meiótica em 127 populações, ao passo que, 19 populações mostraram polimorfismos com duas ou quatro configurações meióticas distintas. As características cromossômicas observadas em populações geograficamente distantes (extremos da distribuição) apresentaram-se bem definidas, cada qual, com diferentes configurações meióticas, tornando-as populações bem estruturadas. Entretanto, o meio do gradiente de coleta constitui uma zona híbrida, na qual, uma grande variação no número cromossômico foi encontrada (Sharp e Rowell 2007).

Todas as populações analisadas aqui apresentaram padrões similares e conservados no que diz respeito à distribuição das RONS e dos sítios de rDNA 28S, os quais estavam sempre localizados em cromossomos de tamanho similar, a presença de um cromossomo portador de heterocromatina constitutiva e de sequências teloméricas na extremidade dos cromossomos, sem evidência de ITS. O uso de técnicas de coloração diferencial e molecular pode revelar variações entre indivíduos e/ou espécies que apresentam características cromossômicas similares (Vicari et al. 2005, Neto et al. 2009, Campos e Fontanetti 2013; Mattos et al. 2014). Em *Tityus confluens*, o emprego da técnica de FISH com sonda de rDNA 45S, revelou que indivíduos portadores da mesma configuração pós-paquitênica (5II+CIII) diferiram quanto a localização do sítio ribossomal (Mattos et al. 2014). Diferenças quanto à localização da heterocromatina e sítios ribossomais, são comuns e foram relatadas para populações de espécies distintas como o diploploda *Pseudonannolene strinatii* e os peixes *Astianax altiparanae* e *Hoplias malabaricus* (Vicari et al. 2005, Neto et al. 2009, Campos e Fontanetti 2013).

As variações cariotípicas encontradas para *T. mattogrossensis* parecem não alterar o fenótipo dos indivíduos, uma vez que todos apresentam características morfológicas muito similares. No entanto, o emprego de diferentes abordagens, tais como a análise da sequência do gene citocromo oxidase I (COI), pode ser útil para identificar espécies morfológicamente similares e testar a estruturação populacional,

conforme demonstrado por Ramalho et al. (2016), ao analisar colônias de formigas que apresentam um alto grau de semelhança morfológica. Adicionalmente, Bruschi et al. (2013) utilizaram marcadores moleculares mitocondriais combinados a citogenética no anfíbio *Phyllomedusa hypocondrialis* para verificar se as variações fenotípicas observadas entre os indivíduos estava relacionada as diferenças genotípicas. Em *T. mattogrossensis*, o uso destas ferramentas, aliada aos dados citogenéticos que obtivemos para diferentes populações parece ser válido para avaliar a estrutura e fluxo gênico dessas populações.

Agradecimentos

Esta pesquisa tem o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP (2013/11840-0; 2011/21643-1). A coleta de exemplares foi realizada com a autorização do Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBIO) (40014-2; 40014-3; 40014-4).

Referências

- Adilardi RS, Ojanguren-Affilastro AA, Martí DA, Mola LM (2014). Cytogenetic analysis on the geographically distant parthenogenetic populations of *Tityus trivittatus* Kraepelin, 1898 (Scorpiones, Buthidae): Karyotype, constitutive heterochromatin and rDNA localization. **Comparative Cytogenetics** 8(2):81-92.
- Aguiar HJAC, Barros LAC, Alves DR, Mariano CSF, Delabie JHC, Pompolo SG (2017). Cytogenetic studies on populations of *Comptonotus rufipes* (Fabricius, 1775) and *Camponotus renggeri* Emery, 1894 (Formicidae: Formicinae). **PLoS One** 12(5):e0177702.

- Almeida BRR, Milhomem-Paixão SSR, Noronha RCR, Nagamachi CY, Costa MJR, Pardal PPO, Coelho JS, Pieczarka JC (2017). Karyotype diversity and chromosomal organization of repetitive DNA in *Tityus obscurus* (Scorpiones, Buthidae). **BMC Genetics** 18:35.
- Almeida, RB (2010). Atlas das espécies de *Tityus* C. L. Koch, 1836 (Scorpiones, Buthidae) do Brasil. Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo 161pp.
- Baeza C, Finot VL, Ruiz E (2015). Comparative karyotype analysis of population in the *Alstroemeria presliana* Hebert (Alstroemeriaceae) complex in Chile. **Genetics and Molecular Biology** 38(2):199-204.
- Barth A, Solé M, Costa MA (2009). Chromosome polymorphism in *Phyllomedusa rohdei* populations (Anura: Hylidae). **Journal of Herpetology** 43(4):676-679.
- Brieger FG, Graner EA (1943). On the cytology of *Tityus bahiensis* with special reference to meiotic prophase. **Genetics** 28:269-274.
- Bruschi DP, Busin CS, Toledo LF, Vasconcellos GA, Strussmann C, Weber LN, Lima AP, Lima JD, Recco-Pimentel SM (2013). Evaluation of the taxonomic status of populations assigned to *Phyllomedusa hypochondrialis* (Anura, Hylidae, Phyllomedusinae) based on molecular, chromosomal, and morphological approach. **BMC Genetics** 14:70.
- Burt DW (2002). Chromosome rearrangement in evolution. **Encyclopedia of Life Sciences**. John Wiley & Sons Ltd, Chichester doi:10.1038/npg.els.0001500.
- Campos KA, Fontanetti CS (2013). Comparative cytogenetics in different populations of the cavernicolous diplopod *Pseudonannolene strinatii* (Diplopoda, Pseudonannolenidae). **Iheringia** 103(1):42-46.
- Carnoy JB (1885). La cytogiérèse chez les arthropods. **Cellule** 1:189-440.

- Castilho CS, Gava A, Freitas TRO (2012). A hybrid zone of the genus *Ctenomys*: a case study in southern Brazil. **Genetics and Molecular Biology** 35(4):990-997.
- Chester M, Gallagher JP, Symonds VV, Silva AVC, Mavrodiev EV, Leitch AR, Soltis PS, Soltis DE (2011). Extensive chromosomal variation in a recently formed natural allopolyploid species, *Tragopogon miscellus* (Asteraceae). **Proceedings of the National Academy of Sciences** 109(4):1176-1181.
- Freitas TRO (1997). Chromosome polymorphism in *Ctenomys minutus* (Rodentia: Octodontidae). **Brazilian Journal of Genetics** 20(1).
- Freygang CC, Marinho JR, Freitas TRO (2004). New karyotype and some considerations about the chromosomal diversification of *Ctenomys minutus* (Rodentia: Ctenomyidae) on the coastal plain of the Brazilian state of Rio Grande do Sul. **Genetica** 121:125-132.
- Garcia L, Ponsa M, Egozgue J, Garcia M (2000). Cytogenetic variation in *Ctenomys perrensi* (Rodentia, Octodontidae). **Biological Journal of the Linnean Society** 71:615-624.
- Gava A, Freitas TRO (2002). Characterization of a hybrid zone between chromosomally divergent populations of *Ctenomys minutus* (Rodentia: Ctenomyidae). **Journal of Mammalogy** 83(3):843-851.
- Gava A, Freitas TRO (2003). Inter and intra-specific hybridization in tuco-tucos (*Ctenomys*) from Brazilian coastal plains (Rodentia: Ctenomyidae). **Genetica** 119:11-17.
- Guénin HA (1961). Contribution a la connaissance cytologique des scorpions: les chromosomes de *Buthus occitanus Amor* (I). **Vie et Milieu** 12:89-96.
- Howell WM, Black DA (1980). Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia** 36:1014-1015.

- Jabeen N, Bharti U, Sharma N (2012). Inter-population chromosome variation in *Artemisia nilagirica*. **Nucleus** 55(2):67-71.
- Lourenço WR (2006). Nouvelle proposition de découpage sous-générique du genre *Tityus* C. L. Koch, 1836 (Scorpiones, Buthidae). **Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa** 39:55-67.
- Makino D (1956). A review of the chromosome number in animals. Tokyo: Hokurykan.
- Malleret MM, Laborini CA, García GV, Ferro JM, Martí DA, Lanzone C (2016). Chromosomal variation in Argentine populations of *Akodon montensis* Thomas, 1913 (Rodentia, Cricetidae, Sigmodontinae). **Comparative Cytogenetics** 10(1):129-140.
- Mariano CSF, Pompolo SG, Barros LAC, Mariano-Neto E, Campiolo S, Delabie JHC (2008). A biogeographical study of the threatened and *Dinoponera lucida* Emery (Hymenoptera: Formicidae: Ponerinae) using a cytogenetic approach. **Insect Conservation and Diversity** 1:161-168.
- Mattos VF, Carvalho LS, Cella DM, Schneider MC (2014). Location of 45S ribosomal genes in mitotic and meiotic chromosomes of buthid Scorpions. **Zoological Science** 31:603-607.
- Mattos VF, Cella DM, Carvalho LS, Schneider MC (2013). High chromosome variability and the presence of multivalent associations in buthid scorpions. **Chromosome Research** 21:121-136.
- Medrado AS, Figueiredo AVA, Waldschmidt AM, Afonso PRAM, Carneiro PLS (2008). Cytogenetic and morphological diversity in populations of *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae) from Brazilian northeastern river basins. **Genetics and Molecular Biology** 31(1):208-214.

- Neto MF, Vicari MR, Camargo EF, Artoni RF, Moreira-Filho O (2009). Comparative cytogenetics among populations of *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae, *Incertae sedis*). **Genetics and Molecular Biology** 32(4):792-796.
- Newlands G, Martindale CB (1980). The buthid scorpion fauna of Zimbabwe Rhodesia with checklist and keys to the genera and species, distributions and medical importance (Arachnida: Scorpiones). **South African Institute for Medical Research** 67:51-77.
- Nunn GB, Theisen BF, Christensen B, Arctander P (1996). Simplicity-correlated size growth of the nuclear 28S ribosomal RNA D3 expansion segment in the crustacean order isopoda. **Journal of Molecular Evolution** 42:211-223.
- Peixoto MAA, Oliveira MPC, Feio RN, Dergam JA (2016). Karyological study of *Ololygon tripui* (Lourenço Nascimento and Pires, 2009), (Anura, Hylidae) with comments on chromosomal traits among populations. **Comparative Cytogenetics** 10(4): 505-516.
- Pinkel D, Straume T, Gray JW (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America** 83:2934–2938.
- Piza ST (1940). Poliploidia natural em *Tityus bahiensis* (Scorpiones) associada a aberrações cromossômicas espontâneas. **Revista de Biologia e Hygiene**. 10:143-155.
- Piza ST (1947). Notas sobre cromossômios de alguns escorpiões brasileiros. **Anais da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz** 62:169-176.
- Piza ST (1949). “Ouro Preto”, nova e interessante raça cromossômica de *Tityus bahiensis* (Scorpiones – Buthidae). **Scientia Genetica**. 3:147-159.
- Piza ST (1950). Variações cromossômicas do *Tityus bahiensis* de Ribeirão Preto. **Ciência e Cultura**.2:57-59.

- Ramalho MAOF, Santos RM, Fernandes TT, Morini MSC, Bueno OC (2016). "Cytochrome c oxidase I DNA sequence of *Camponotus* ants with diferente nesting strategies is a tool for distinguishing between morphologically similar species. **Genetica** 144(4):375-383.
- Riquelme F, Villegas-Guzmán G, González-Santillán E, Córdova-Tavares V, Francke OF, Piedra-Jiménez D, Estrada-Ruiz E, Luna Castro B (2015). New fossil scorpion from the Chiapas Amber lagerstätte. **PLoS ONE** 10(8):e0133396.
- Schneider MC, Carraro BP, Cella DM, Matiello RR, Artoni RF, Almeida MC (2007). *Astylus variegatus* (Coleoptera, Melyridae): Cytogenetic study of a population exposed to agrochemical products. **Genetics and Molecular Biology** 30(3):640-645.
- Schneider MC, Cella DM (2010). Karyotype conservation in 2 populations of the parthenogenetic scorpion *Tityus serrulatus* (Buthidae): rDNA and its associated heterochromatin are concentrated on only one chromosome. **Journal of Heredity** 101:491-496.
- Schneider MC, Mattos VF, Cella DM (2017). The scorpion cytogenetic database. Disponível em: <http://www.arthropodcytogenetics.bio.br/scorpionsdatabase/index.html>
- Schneider MC, Zacaro AA, Pinto-da-Rocha R, Candido DM, Cella DM (2009a). Complex meiotic configuration of the holocentric chromosomes: the intriguing case of the scorpion *Tityus bahiensis*. **Chromosome Research** 17:883-898.
- Shanahan CM (1989). Cytogenetics of Australian scorpions. I. Interchange polymorphism in the family Buthidae. **Genome** 32:882-889.
- Shanahan CM, Hayman DL (1990). Synaptonemal complex formation in male scorpions exhibiting achiasmatic meiosis and structural heterozygosity. **Genome** 33: 914–926.

- Sharp HE, Rowell DM (2007). Unprecedented chromosomal diversity and behaviour modify linkage patterns and speciation potential: structural heterozygosity in a Australian spider. **Journal of Evolutionary Biology** 20:2427-2439.
- Silva AA, Braga LS, Guedes RN, Tavares MG (2015). Cytogenetic analyses using C-banding and DAPI/CMA3 staining of four populations of the maize weevil *Sitophilus zeamais* Motschulsky, 1855 (Coleoptera, Curculionidae). **Comparative Cytogenetics** 9(1): 89-102.
- Sumner AT (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research** 75:304-306.
- Tsurusaki N (1993). Geographic variation of the number of B chromosome in *Metagrella tenuipes* (Opiliones, Phalangidae, Gagrellinae). **Memoirs of the Queensland Museum** 33(2):659-665.
- Tsurusaki N, Shimada T (2004). Geographic and seasonal variations of the number of B chromosomes and external morphology in *Psathyropus tenuipes* (Arachnida: Opiliones). **Cytogenetic and Genome Research** 106:365-375.
- Vicari MR, Artoni RF, Bertollo LAC (2005). Comparative cytogenetics of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae): A population analysis in adjacent hydrographic basins. **Genetics and Molecular Biology** 28(1):103-110.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos com a análise citogenética de seis espécies brasileiras pertencentes ao subgênero *Archaeotityus* permitiram constatar:

- Presença de cromossomos holocêntricos, meiose sináptica e aquiasmática e associações multivalentes na meiose I.
- Variabilidade de número diploide e de cadeias cromossômicas dentro e entre as espécies e populações.
- O número diploide descrito para as seis espécies de *Archaeotityus* variou de $2n=16$ a $2n=24$.
- *Tityus clathratus* revelou até 11 configurações meióticas, sendo a espécie que apresentou maior variabilidade em células pós-paquitênicas. Adicionalmente, *Tityus pusillus* revelou células poliploides na meiose I.
- Rearranjos cromossômicos do tipo fissão/fusão e translocação recíproca foram os responsáveis pela formação das associações multivalentes e variabilidade do número diploide observados em células meióticas e mitóticas, respectivamente.
- Características cariotípicas similares com diferenças tênues em relação ao comportamento dos cromossomos em células pós-paquitênicas revelaram o baixo fluxo gênico entre as diferentes populações de *T. mattogrossensis*.
- A baixa quantidade de heterocromatina constitutiva localizada apenas na região terminal de um par de cromossomos é uma característica comum para as espécies de *Archaeotityus*.
- O número de localização de sítios de rDNA 28S na região terminal de um par de cromossomos parece ser uma característica conservada para a família Buthidae apesar dos altos índices de rearranjos.

- A presença da sequência telomérica (TTAGG)_n apenas nas regiões distais dos cromossomos, sem evidência de ITS, indicam que apesar dos altos índices de rearranjos observados essa sequência é mantida.
- Padrões de modificação de histonas, tais como, acetilação, metilação e fosforilação revelaram modificações sequenciais relacionadas à transcrição, condensação, coesão e segregação dos cromossomos holocêntricos de *T. paraguayensis*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adilardi RS, Ojanguren-Affilastro AA, Mola LM (2016). Sex-linked chromosome heterozygosity in males of *Tityus confluens* (Buthidae): a clue about the presence of sex chromosomes in scorpions. **PLoS ONE** 11(10):1-18.
- Albertson DG, Thomson JN (1982). The kinetochore of *Caenorhabditis elegans*. **Chromosoma** 86:409-482.
- Albuquerque CM, Santana Neto PL, Amorim ML, Pires SC (2013). Pediatric epidemiological aspects of scorpionism and report on fatal cases from *Tityus stigmurus* stings (Scorpiones: Buthidae) in State of Pernambuco, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 46:484-489.
- Almeida BRR, Milhomem-Paixão SSR, Noronha RCR, Nagamachi CY, Costa MJR, Pardal PPO, Coelho JS, Pieczarka JC (2017). Karyotype diversity and chromosomal organization of repetitive DNA in *Tityus obscurus* (Scorpiones, Buthidae). **BMC Genetics** 18:35.
- Almeida, RB (2010). Atlas das espécies de *Tityus* C. L. Koch, 1836 (Scorpiones, Buthidae) do Brasil. Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo 161pp.
- Altiero T, Rebecchi L (2003). First evidence of achiasmatic male meiosis in the water bears *Richtersius coronifer* and *Macrobius richtersi* (Eutardigrada, Macrobiotidae). **Hereditas** 139:116-120.
- Bongiorno S, Fiorenzo P, Pippoletti D, Prantera G (2004). Inverted meiosis and meiotic drive in melybugs. **Chromosoma** 112:331-341.
- Brasil e Ministério da Saúde (2009). Manual de Controle de Escorpiões. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, Brasília, DF. Disponível: ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/zoo/manu09_escorpioes.pdf.

- Bucarechi F, Fernandes LCR, Fernandes CB, Branco MM, Prado CC, Vieira RJ, DeCapitani EM, Hyslop S (2014). Clinical consequences of *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus* scorpion stings in the region of Campinas, southeastern Brazil. **Toxicon** 89:17-25.
- Candido DM (1999). Escorpiões, p. 22-34. In: Joly CA, Bicudo CEM. Biodiversidade do Estado de São Paulo. Invertebrados terrestres. São Paulo. **FAPESP**.
- Carnoy JB (1885). La cytogiérèse chez les arthropods. **Cellule** 1:189-440.
- Cioffi MB, Bertollo LAC, Villa MA, Oliveira EA, Tanomtong A, Yano CF, Supiwong W, Chaveerach (2015). Genomic organization of repetitive DNA elements and its implications for the chromosomal evolution of channid fishes (Actinopterygii, Perciformes). **PLoS ONE** 10(6): e0130199.
- Cronk QCB (1998). The ochlopecies concept. In: Huxley CR, Lock JM, Cutler DF. Chorology, taxonomy and ecology of the floras of Africa and Madagascar. Pp 155-170.
- Cruz EFS (1994). Biologia de escorpiões, p. 135-150. In: Barraviera B. Venenos animais – uma visão integrada. Rio de Janeiro. **Editora de Publicações Científicas Ltda**.
- Cunha AB, Pavan C (1954). Duas novas configurações cromossômicas em *Tityus bahiensis* (Scorpiones, Buthidae). **Ciência e Cultura** 6:18-20.
- Cupo P, Herling SE (2002). Cardiac troponin I release after severe scorpion envenoming by *Tityus serrulatus*. **Toxicon** 40:823-830.
- Dernburg AF (2001). Here, there, and everywhere: kinetochore function on holocentric chromosomes. **The Journal of Cell Biology** 153(6):33-38.
- Escudero M, Márquez-Corro IM, Hipp AL (2016). The phylogenetic origins and evolutionary history of holocentric chromosomes. **Systematic Botany** 41(3):580-585.

- Fet V, Gantenbein B, Gromov AV, Lowe G, Lourenço WR (2003). The first molecular phylogeny of Buthidae. **Euscorpius**. 4:1-10.
- Fet V, Sissom WD, Lowe G, Braunwalder ME (2000). Catalog of the scorpions of the world (1758-1998). **New York Entomological Society** 690p.
- Fossey A, Liebenberg H, Jacobs DH (1989). Karyotype and meiosis studies in three south African *Pyrgomorpha* species (Orthoptera: Pyrgomorphidae). **Genetica** 78:179-183.
- Gallão JE, Bichuette ME (2016). On the enigmatic troglobitic scorpion *Throglorhopalurus translucidus*: distribution, description of adult females, life history and comments on *Rhopalurus lacrau* (Scorpiones: Buthidae). **Zoologia** 33(6):e20150193.
- Gama V, Landim CC, Ferreira A (1981). Estudos morfológicos da estrutura dos cinetochores de *Enallagma chelifera* (Odonata). **Naturalia** 6:75-87.
- Guénin HA (1961). Contribution a la connaissance cytologique des scorpions: les chromosomes de *Buthus occitanus* Amor (I). **Vie et Milieu** 12:89-96.
- Howell WM, Black DA (1980). Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia** 36:1014-1015.
- Ituarte S, Papeschi AG (2004). Achiasmatic male meiosis in *Tenagobia* (*Fuscagobia*) *fuscata* (Stal) (Heteroptera, Corixoidea, Micronectidae). **Genetica** 122:199-206.
- John B (1990). Meiosis. Cambridge University Press, Melbourn.
- Kingswood SC, Kumamoto AT, Sudman PD, Fletcher KC, Greenbaum IF (1994). Meiosis in chromosomally heteromorphic goitered gazelle, *Gazella subgutturosa* (Artiodactyla, Bovidae). **Chromosome Research** 2:37-46.
- Kovarík F, Stahlavsky F, Korinková T, Kral J, Ende T (2009). *Tityus ythieri* Lourenço, 2007 is a synonym of *Tityus magnimanus* Pocock, 1897 (Scorpiones: Buthidae):

a combined approach using morphology, hybridization experiments, chromosomes, and mitochondrial DNA. **Euscorpium** 77:1-12.

Lima JF (2017). Análise citogenética de escorpiões da fauna brasileira com ênfase nas sequências de DNA repetitivo. Dissertação apresentada pelo Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução da Universidade Federal de São Paulo 83pp.

Lira AFA, DeSouza AM (2014). Microhabitat use by scorpion species (Arachnida:Scorpiones) in the montane Atlantic Rain Forest, Brazil. **Revista Ibérica de Aracnología** 24:107-108.

Lira AFA, Souza AM, Filho AACs, Albuquerque CMR (2013). Spatio-temporal microhabitat use by to co-occurring species of scorpions in Atlantic rainforest in Brazil. **Zoology** 116(3):182-185.

Lourenço W (1984). Analyse taxonomique de scorpions du groupe *Tityus clathratus* Koch, 1845 (Scorpiones, Buthidae). **Bulletin du Muséum National D'Histoire Naturelle** 6:439-360.

Lourenço W (1992). Biogéographie des espèces du groupe naturel *Tityus clathratus* (Chelicerata, Scorpiones, Buthidae). **Bulletin du Muséum National D'Histoire Naturelle** 14:473-481.

Lourenço W (2012). Further considerations on *Tityus (Archaeotityus) clathratus* C. L. Koch, 1844 and description of two associated new species (Scorpiones, Buthidae). **Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa** 50:277-283.

Lourenço WR (2006). Nouvelle proposition de découpage sous-générique du genre *Tityus* C. L. Koch, 1836 (Scorpiones, Buthidae). **Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa** 39:55-67.

Lourenço WR, Baptista RLC, Giupponi APL (2004). Troglobitic scorpions: a new genus and species from Brazil. **Comptes Rendus Biologies** 327:1151-1156.

- Lourenço WR, Eickstedt VR (2009). Escorpiões de Importância Médica. In: CARDOSO, J. L. C. et al. *Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. São Paulo: **Sarvier** 198-213.
- Lourenço, WR (2002). Amazonian Arachnida and Myriapoda: Identification keys to all classes, orders, families, some genera and lists of known terrestrial species. In: J. Adis (org.). Moscow: Pensoft Publishes. **Scorpiones** 399-438.
- Luceño M, Guerra M (1996). Numerical variations in species exhibiting holocentric chromosomes: a nomenclatural proposal. **Caryologia** 49:301-309.
- Makino D (1956). A review of the chromosome number in animals. Tokyo: Hokurykan.
- Mattos VF, Carvalho LS, Cella DM, Schneider MC (2014). Location of 45S ribosomal genes in mitotic and meiotic chromosomes of buthid Scorpions. **Zoological Science** 31:603-607.
- Mattos VF, Cella DM, Carvalho LS, Schneider MC (2013). High chromosome variability and the presence of multivalent associations in buthid scorpions. **Chromosome Research** 21:121-136.
- Melters PD, Paliulius LV, Korf IF, Chan SWL (2012). Holocentric chromosomes: convergent evolution, meiotic adaptations, and genomic analysis. **Chromosome Research** 20:579-593.
- Newlands G, Martindale CB (1980). The buthid scorpion fauna of Zimbabwe Rhodesia with checklist and keys to the genera and species, distributions and medical importance (Arachnida: Scorpiones). **South African Institute for Medical Research** 67:51-77.
- Nunn GB, Theisen BF, Christensen B, Arctander P (1996). Simplicity-correlated size growth of the nuclear 28S ribosomal RNA D3 expansion segment in the crustacean order isopoda. **Journal of Molecular Evolution** 42:211-223.

- Perez R, Rufas JS, Suja JA, Page J, Panzera F (2000). Meiosis in holocentric chromosomes orientation and segregation of an autosome and sex chromosomes in *Triatoma infestans* (Heteroptera). **Chromosome Research** 8:17-25.
- Pimpinelli S, Goday C (1989). Unusual kinetochores and chromatin diminution in *Parascaris*. **Trends in Genetics** 5:310-315.
- Pinkel D, Straume T, Gray JW (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America** 83:2934–2938.
- Piza ST (1947a). Notas sobre cromossômios de alguns escorpiões brasileiros. **Anais da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz** 62:169-176.
- Piza ST (1947b) Interessante comportamento dos cromossômios na espermatogênese do escorpião *Isometrus maculatus* De Geer. **Anais da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”** 62:177-182.
- Piza ST (1949). “Ouro Preto”, nova e interessante raça cromossômica de *Tityus bahiensis* (Scorpiones – Buthidae). **Scientia Genetica** 3:147-159.
- Piza ST (1950a). Variações cromossômicas do *Tityus bahiensis* de Ribeiro Preto. **Ciência e Cultura** 2:57-59.
- Piza ST (1950b). Observações cromossômicas em escorpiões brasileiros. **Ciência e Cultura** 2:202-206.
- Piza ST (1952). Primeiras observações sobre os cromossômios de *Tityus metuendus* Pocock. **Scientia Genetica** 4:162-167.
- Piza ST (1955). Notable geographical expansion of a peculiar type of chromosomal constitution of the cosmopolitan scorpion *Isometrus maculatus*. **Arquivos do Museu Nacional** 42:611-612.

- Porto TJ, Brazil TK (2010a). Quem são os escorpiões? p. 15-32. In: Brazil TK, Porto TJ. Os escorpiões. Bahia. **EDUFBA** 83pp.
- Porto TJ, Brazil TK (2010b). Os escorpiões de importância médica e seus venenos, p. In: Brazil TK, Porto TJ. Os escorpiões. Bahia. **EDUFBA** 83pp.
- Porto TJ, Brazil TK, Souza CAR (2010). Diversidade de escorpiões do Brasil, p. 43-63. In: Brazil TK, Porto TJ. Os escorpiões. Bahia. **EDUFBA** 83pp.
- Prendini L (2006). Why study scorpions? <http://scorpion.amnh.org/page3/page3.html>
- Prendini L, Wheeler WC (2005). Scorpion higher phylogeny and classification, taxonomy anarchy, and standards for peer review in online publishing. **Cladistics** 21:446-494.
- Reed KM, Sites JW Jr, Greenbaum IF (1992). Synapsis, recombination, and meiotic segregation in the mesquite lizard, *Sceloporus grammicus*, complex. I. Pericentric inversion heteromorphism of the F5 cytotype. *Cytogenetic and Cell Genetic* 61:40–45.
- Rein JO. (2017). The Scorpion files. Disponível em: [http:// www.ntnu.no/scorpion-files](http://www.ntnu.no/scorpion-files).
- Riquelme F, Villegas-Guzmán G, González-Santillán E, Córdova-Tavares V, Francke OF, Piedra-Jiménez D, Estrada-Ruiz E, Luna Castro B (2015). New fossil scorpion from the Chiapas Amber lagerstätte. **PLoS ONE** 10(8):e0133396.
- Schneider MC, Cella DM (2010). Karyotype conservation in 2 populations of the parthenogenetic scorpion *Tityus serrulatus* (Buthidae): rDNA and its associated heterochromatin are concentrated on only one chromosome. **Journal of Heredity** 101:491-496.
- Schneider MC, Mattos VF, Carvalho LS, Cella DM (2015). Organization and behaviour of the synaptonemal complex during achiasmatic meiosis of four buthid scorpions. **Cytogenetic and Genome Research** 144(4): 341-347.

- Schneider MC, Mattos VF, Cella DM (2017). The scorpion cytogenetic database. Disponível em: <http://www.arthropodcytogenetics.bio.br/scorpionsdatabase/index.html>
- Schneider MC, Zacaro AA, Pinto-da-Rocha R, Candido DM, Cella DM (2009a). Complex meiotic configuration of the holocentric chromosomes: the intriguing case of the scorpion *Tityus bahiensis*. **Chromosome Research** 17:883-898.
- Schneider MC, Zacaro AA, Pinto-da-Rocha, Candido DM, Cella DM (2009b). A comparative cytogenetic analysis of 2 Bothriuridae species and overview of the chromosome data of Scorpiones. **Journal of Heredity** 100:545-555.
- Shanahan CM, Hayman DL (1990). Synaptonemal complex formation in male scorpions exhibiting achiasmatic meiosis and structural heterozygosity. **Genome** 33: 914–926.
- Shanahan CM (1989). Cytogenetics of Australian scorpions. I. Interchange polymorphism in the family Buthidae. **Genone** 32:882-889.
- Sharma PP, Fernández R, Esposito LA, González-Santillán E, Monod L (2015). Phylogenomic resolution of scorpions reveals multilevel discordance with morphological phylogenetic signal. **Proceedings of the Royal Society of London** 282:20142953.
- Soleglad ME, Fet V (2003). High level systematics and phylogeny of the extant scorpions (Scorpiones:Orthosterni). **Euscorpius** 11:1-175.
- Sumner AT (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research** 75:304-306.
- Viera A, Page J, Rufas JS (2009). Inverted meiosis: the true bugs as a model to study, p. 137-156. In: Meiosis. Editores: Benavente R, Volff JN. **Karger**.

Wolf KW (1996). The structure of condensed chromosomes in mitosis and meiosis of insects. **International Journal of Insect Morphology and Embryology** 25:37–62.

Wolf KW, Nova KK, Marec F (1992). Chromosome structure in spermatogenesis of *Anabolia furcata* (Trichoptera). **Genome** 35:46-52.