

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA
(Associação Ampla entre a UEPG e a UNICENTRO)

CITOGENÉTICA MOLECULAR EM ESPÉCIES DA FAMÍLIA
PARODONTIDAE (PISCES; CHARACIFORMES)

MICHELLE ORANE SCHEMBERGER

Ponta Grossa
2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA
(Associação Ampla entre a UEPG e a UNICENTRO)

CITOGENÉTICA MOLECULAR EM ESPÉCIES DA FAMÍLIA
PARODONTIDAE (PISCES; CHARACIFORMES)

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta Grossa em associação com a Universidade do Centro Oeste do Paraná, como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração em Biologia Evolutiva)

Ponta Grossa
2009

Ficha Catalográfica Elaborada pelo Setor de Processos Técnicos BICEN/UEPG

S323c Schemberger, Michelle Orane
Citogenética molecular em espécies da Família Parodontidae
(PISCES; CHARACIFORMES). / Michelle Orane Schemberger.
Ponta Grossa, 2009.
100f.
Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Área de
Concentração : Biologia Evolutiva) - Universidade Estadual de
Ponta Grossa em associação com a Universidade do Centro Oeste do
Paraná.
Orientadora : Profa. Dra. Mara Cristina de Almeida
Co-orientador : Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari

1. Parodontidae. 2. Dispersão de sítios rDNA .
3. Evolução cariotípica. 4. Microdissecção do cromossomo W.
5. DNA repetitivo pPH2004 . I. Almeida, Mara Cristina de.
II. Vicari, Marcelo Ricardo. III. T.

CDD : 574. 87

**Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva**

Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa (Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética) e a Universidade Estadual do Centro Oeste (Departamento de Ciências Biológicas)

**ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº. 03/2009**

Ata referente à Defesa de Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, uma Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa e a Universidade Estadual do Centro-Oeste, pela candidata **MICHELLE ORANE SCHEMBERGER**.

Aos vinte e oito dias do mês de setembro de dois mil e nove, no Auditório do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa sob a presidência da Dr^a Mara Cristina de Almeida Matiello, em sessão pública, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação do(a) aluno(a) **MICHELLE ORANE SCHEMBERGER**, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-área de concentração Biologia Evolutiva, visando o título de Mestre, constituída pelos: Dr^a Mara Cristina de Almeida Matiello (orientadora), Dr. Marcelo Ricardo Vicari (co-orientador), Dr.^a Marta Margarete Cestari e Dr. Rafael Bueno Noleto. Atestada pela colenda Congregação do Colegiado de Curso do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia Evolutiva. Iniciados os trabalhos a presidência deu conhecimento aos membros da Comissão e ao(a) candidato(a) das normas que regem a defesa de dissertação. A seguir a candidata passou a defesa de sua dissertação intitulada: **Citogenética molecular em espécies da família Paradontidae (Pisces, Characiformes)**. Encerrada a defesa, procedeu-se ao julgamento e a Comissão Examinadora considerou o(a) candidato(a) **APROVADA**. A Presidência ressaltou que a obtenção do título de Mestre está condicionada ao disposto da atual aprovação de outorga do Título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de concentração em Biologia Evolutiva, **com validade de sessenta dias**; o não depósito da versão definitiva de Dissertação, bem como as cópias em CD(PDF) com todas as correções feitas e atestadas pelo(a) orientador(a) neste prazo anulará toda possibilidade de outorga definitiva do Título, recebimento de Certidão e outros documentos, bem como a solicitação do Diploma. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão Examinadora, e por mim Zoli Catarina Zacharias de Oliveira, na qualidade de secretária.

Ponta Grossa, 28 de setembro de dois mil e nove.

Prof^a Dr^a Mara Cristina de Almeida Matiello

Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari

Prof^a Dr^a Marta Margarete Cestari

Dr. Rafael Bueno Noleto

Orientador

Prof^a Dr^a Mara Cristina de Almeida

Co-orientador

Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari

Dedico este trabalho à minha mãe Cleci
Silva Orane pelo total esforço que fez
para eu chegar até aqui, e também por
todo seu amor e incentivo.

“A percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências. O homem que não tem olhos para o misterioso passará pela vida sem ver nada.”

Albert Einstein

Agradecimentos

Este trabalho de dissertação contou com o apoio de diversas pessoas e instituições, as quais neste momento presto meus mais sinceros agradecimentos.

Ao programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva e ao Laboratório de Citogenética da Universidade Estadual de Ponta Grossa pelo apoio e condições oferecidas para a realização deste estudo.

À prof^a Dr^a Mara Cristina Almeida, minha orientadora e amiga, pela confiança depositada em mim, pelos seus ensinamentos teóricos e práticos, pelo apoio e incentivo que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Ao prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari, meu co-orientador e amigo, por seus ensinamentos teóricos e práticos, por seu apoio, por sua atenção e ótimas idéias que foram importantes para a realização deste estudo.

Ao prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni que me deu a oportunidade de estar trabalhando com evolução em genética de peixes, área que despertou o meu interesse e aprimorou meus conhecimentos. Agradeço também pelos seus ensinamentos, idéias, apoio oferecido e amizade.

À minha mãe Cleci Silva Orane, pessoa a qual amo muito, que lutou para dar a melhor educação e que contribuiu para que eu chegasse onde estou agora. Minha grande amiga que sempre tem palavras de incentivo e amor.

À prof^a Dr^a Viviane Nogaroto por sua amizade e auxílio na bancada que foram fundamentais para meu trabalho.

Ao prof. Dr. Rodrigo Matiello pelas sugestões que muito contribuíram para o trabalho.

Aos professores Dr. Orlando Moreira-Filho e Dr. Luiz Antônio Carlos Bertollo e também Dr^a Elisangela Bellafronte, da Universidade Federal de São Carlos, pelos materiais fornecidos dos exemplares da família Parodontidae e pelos seus auxílios.

Ao prof. Dr. Vladimir Pavan Margarido da Universidade Estadual do Oeste do Paraná por ter fornecido materiais da espécie *Apareiodon vladii*.

Ao meu noivo, Adriano Rolfh Sieg, o qual amo muito, por estar presente em todos os momentos da minha vida, pelo apoio, amor, carinho e paciência.

Ao Miguel Airton Carvalho, funcionário do laboratório de citogenética da Universidade Estadual de Ponta Grossa, um grande amigo que me ajudou muito no campo e no laboratório. Agradeço também pelos momentos de descontração.

Aos amigos do laboratório de citogenética Bárbara, Leonardo, Alain, Camila, Cleberson, Paulo, Helena, Americo, João, Tatiana, Ricardo, Tais, Dani Matoso, pelos diversos auxílios, excelente convivência e amizade. Em especial agradeço a Danizinha e Maelin, grandes amigas, que me ajudaram muito no decorrer da realização da minha dissertação de mestrado.

Ao meu irmão Rafael que sempre me deu incentivo e torceu por minhas conquistas.

À funcionária Zoli da Secretaria de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva pelo auxílio e bom atendimento.

Aos amigos Marcinha, Juliana, Carla, Caroline, Taciana, Marcos, Tais e Marcio, pelos bons momentos juntos.

Ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA/MMA/SISBIO n^o: 15117) pelas autorizações de captura de peixes.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Processo: 473448/2007-6) e a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro.

À Fundação Araucária (Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná, Processo: 12938) pela bolsa concedida que muito me auxiliou durante o mestrado.

Resumo

Neste estudo, a fração heterocromática do cromossomo W de *Apareiodon* sp. foi isolado por microdissecção com posterior amplificação por DOP-PCR. As seqüências obtidas foram utilizadas no procedimento de hibridação *in situ* fluorescente em cromossomos de espécies de Parodontidae. Esta sonda foi denominada WAp. Assim, de posse deste marcador e de outros já disponíveis o trabalho apresentou uma análise de citogenética molecular em exemplares da família presentes em diferentes bacias hidrográficas brasileiras. Foram analisadas as espécies: *Apareiodon* sp., *A. ibitiensis*, *A. vladii*, *A. piracicabae*, *A. vittatus*, *A. affinis*, *P. hilarii*, *P. moreirai*, *P. nasus* e *P. pongoensis*. Os resultados evidenciaram a proximidade da localização do marcador do rDNA 18S encontrado em espécies de *Parodon* em comparação ao grupo irmão Anostomidae. Ainda, foi visualizado um alta identidade do par cromossômico portador dos sítios de rDNA 5S em todos Parodontidae estudados. Com o mapeamento dos DNAs repetitivos WAp e pPh2004 por hibridação *in situ* fluorescente nos cromossomos de algumas espécies de Parodontidae foram lançadas hipóteses de origem e diferenciação do sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW a partir de uma inversão alocando sítios WAp em região proximal de um par cromossômico metacêntrico. Esses resultados permitiram inferir também que o sistema de cromossomos sexuais múltiplos ZZ/ZW₁W₂ de *A. affinis* pode ter origem de um sistema ZW similar ao encontrado em populações ancestrais da espécie *P. hilarii*. Assim, este trabalho contribui para o entendimento da evolução e diversificação do genoma de algumas espécies de Parodontidae, principalmente para o esclarecimento da origem e diferenciação dos cromossomos sexuais.

Abstract

In this study, the fraction of the heterochromatin of the *Apareiodon* sp. chromosome W was isolated by microdissection with subsequent amplification by DOP-PCR. The sequences obtained were used in the procedure of the fluorescence *in situ* hybridization in Parodontidae species chromosomes. This probe was named WAp. Then, with this marker and others available, the study presented a molecular cytogenetic analysis in Parodontidae species present in different Brazilian hydrographic basin. The species analyzed were: *Apareiodon* sp., *A. ibitiensis*, *A. vladii*, *A. piracicabae*, *A. vittatus*, *A. affinis*, *P. hilarii*, *P. moreirai*, *P. nasus* and *P. pongoensis*. The results reveal closeness of the location of 18S rDNA marker found in *Parodon* species compared to the sister group Anostomidae. Still, it has been viewed a high identity chromosome pair bearing the rDNA 5S sites in all Parodontidae studied. Mapping of repetitive DNAs WAp and pPh2004 by fluorescence *in situ* hybridization in chromosomes of some species of Parodontidae permitted deduce the origin and differentiation of sex chromosome system ZZ/ZW from a inversion allocating proximal region WAp sites of a chromosome metacentric pair. These results allowed inferring that the sex chromosome system multiple ZZ/ZW₁W₂ of *A. affinis* can originate from one system ZW similar to that found in ancient populations of species *P. hilarii*. Thus, this work contributes to the understanding of development and diversification of the genome of some species of Parodontidae, mainly to the comprehension of the origin and sex chromosome differentiation.

LISTA DE FIGURAS

3.1 Material e Locais de Coleta

Figura 1: Mapa hidrográfico do Brasil, mostrando a distribuição das espécies de Parodontidae. Em (1) rio Passa-Cinco - SP; (2) rio Piumhi – MG; (3) rio Piquiri - PR; (4) rio Tibagi – PR; (5) rio Jordão – PR; (6) Córrego do Porta – MG; (7) Córrego Paiol Grande - SP; (8) rio Paraguai – MT; (9) rio Taquaralzinho – MT. Ao lado as espécies estudadas numeradas de acordo com a sua localização nas bacias. 21

4.1 Mapeamento das seqüências de rDNA 18S e 5S em *Parodon pongoensis* e *Apareiodon vittatus* (Characiformes, Parodontidae)

Figura 1: Metáfases cromossômicas das espécies *Apareiodon vittatus* (A, B) e *Parodon pongoensis* (C) submetidas à dupla FISH com sondas de rDNA 18S (sítios em verde) e 5S (sítios em vermelho) 41

4.2 Marcadores cromossômicos de DNA repetitivo com enfoque na origem e diferenciação dos sistemas de cromossomos sexuais simples e múltiplo de Parodontidae

Figura 1: Localização dos sítios WAp por FISH em peixes da família Parodontidae. Em (A) cariótipo de fêmea de *Apareiodon piracicabae* mostrando sítios WAp terminais e interespaçado a região de RON (par 27); em (B) cariótipo de fêmea de *A. vittatus* evidenciando somente sítios WAp terminais; (C) cariótipo de macho de *A. affinis* mostrando os cromossomos Z marcados em região terminal de ambos os braços e na região proximal do braço longo, além de alguns sítios terminais nos cromossomos e em (D) cariótipo de fêmea de *A. affinis* mostrando o cromossomo Z, W₁ e W₂ marcados, além de alguns sítios terminais no complemento 63

Figura 2: Localização dos sítios WAp por FISH em cariótipo de peixes da família Parodontidae evidenciando alguns sítios terminais em cromossomos do complemento, além de marcações na região terminal e proximal do braço curto do cromossomo Z e na região proximal e terminal do braço longo do cromossomo W. Em (A) cariótipo de macho de *Apareiodon* sp.; (B) fêmea de *Apareiodon* sp.; (C) fêmea de *A. vladii*, (D) fêmea de *A. ibitiensis*, (E) fêmea de *P. moreirai*; (F) fêmea de *P. hilarii*; (G) fêmea de *P. nasus* e (H) fêmea de *P. pongoensis* 64

Figura 3: Localização dos sítios do DNA satélite pPh2004 por FISH em cariótipos de espécies da família Parodontidae. Em (A, B) macho e fêmea, respectivamente, de *A. affinis* mostrando dois pares cromossômicos com sítios pPh2004, um deles com marcações terminais em ambos os braços (par 2), semelhante ao encontrado em *P. hilarii*, além de mais um par metacêntrico marcado (par 13); (C) fêmea de *P. hilarii* com sítios pPh2004 na região terminal do braço longo do cromossomo Z, terminal do braço curto do cromossomo W, além de mais 15 sítios em autossomos; (D)

fêmea de *P. moreirai* com sítios pPh2004 na região terminal do braço longo do cromossomo Z, terminal do braço curto do cromossomo W; (E) fêmea de *P. nasus* evidenciando 4 pares cromossômicos com marcações terminais do braço longo; (F) fêmea de *P. pongoensis* evidenciando apenas 1 par cromossômico metacêntrico marcado em região terminal do braço longo (par 13) 65

Figura 4: Cariótipos de espécies de Parodontidae submetidos à dupla FISH com sondas de DNA repetitivo WAp (sítios em vermelho) e DNA satélite pPh2004 (sítios em verde) evidenciando que o proto-cromossomo Z possui sítios WAp na região proximal e terminal do braço curto e sítio pPh2004 na região terminal do braço longo. Em (A) fêmea de *P. pongoensis*; (B) fêmea de *P. nasus*, ambos os cariótipos com os dois DNAs repetitivos em um par metacêntrico evidenciando um possível sistema ZZ/ZW morfologicamente indiferenciado (par 13); (C, D) macho e fêmea de *A. affinis*, respectivamente demonstrando que o par metacêntrico semelhante ao proto cromossomo Z (par 13) não detém o DNA satélite WAp..... 66

Figura 5: Idiograma representativo mostrando a hipótese de origem do par proto cromossomo sexual em *Apareiodon* e *Parodon*. Em vermelho sítios WAp e em verde sítios do DNA satélite pPh2004..... 67

Figura 6: Idiograma representativo mostrando a hipótese de origem do sistema sexual simples nos gêneros *Apareiodon* e *Parodon*. Em vermelho sítios WAp e em verde sítios de DNA satélite pPh2004 68

Figura 7: Idiograma representativo mostrando a hipótese de origem do sistema sexual múltiplo de *Apareiodon affinis*. Em vermelho sítios WAp e em verde sítios de DNA satélite pPh2004 69

LISTA DE TABELAS

3.1 Material e Locais de Coleta

Tabela I: Pontos de amostragem, distribuição nas bacias hidrográficas e número de espécies estudadas da família Parodontidae 22

4.2 Marcadores cromossômicos de DNA repetitivo com enfoque na origem e diferenciação dos sistemas de cromossomos sexuais simples e múltiplo de Parodontidae

Tabela I: Pontos de amostragem, distribuição nas bacias hidrográficas e número de espécies estudadas da família Parodontidae 61

Tabela II: Marcadores cromossômicos em espécies da família Parodontidae 62

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Considerações gerais sobre a sistemática, distribuição, filogenia e biologia dos representantes da família Parodontidae.....	1
1.2 Citogenética da família Parodontidae.....	5
1.3 DNA repetitivo com enfoque na diferenciação dos cromossomos sexuais	11
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 Material e Locais de Coleta.....	20
3.2 Métodos	23
3.2.1 Obtenção de Cromossomos Mitóticos	23
3.2.2 Detecção da Heterocromatina Constitutiva: Bandas-BSG.	25
3.2.3 Microdissecção de cromossomos submetidos ao bandamento C	26
3.2.4 Iniciador oligonucleotídeo degenerado – reação em cadeia da polimerase (DOP-PCR) ..	26
3.2.5 Hibridação fluorescente in situ (FISH) com sondas de rDNA 18S, rDNA 5S, DNA repetitivo Pph2004 e cromossomo W de <i>Apareiodon</i> sp. (WAp)	27
3.2.6 Análises dos resultados	30
4. RESULTADOS.....	32
4.1 Mapeamento das seqüências de rDNA 18S e 5S em <i>Apareiodon vittatus</i> e <i>Parodon pongoensis</i> (Characiformes, Parodontidae).....	33
4.2 Marcadores cromossômicos de DNAs repetitivos com enfoque na origem e diferenciação dos sistemas de cromossomos sexuais simples e múltiplo de Parodontidae	42
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	70
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
7. ANEXOS	84

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais sobre a sistemática, distribuição, filogenia e biologia dos representantes da família Parodontidae.

A ordem Characiformes é a mais numerosa dentre os Ostariophysis, seus representantes apresentam uma grande diversidade morfológica que tem sido uma fonte valiosa de informações para a filogenia deste grupo. De acordo com BUCKUP (1998), a ordem Characiformes compreende 18 famílias: Chilodontidae, Distichodontidae, Citharinidae, Curimatidae, Parodontidae, Prochilodontidae, Lebiasinidae, Anostomidae, Crenuchidae, Hemiodontidae, Alestiidae, Gasteropelecidae, Characidae, Acestrorhynchidae, Cynodontidae, Erythrinidae, Ctenolucidae e Hepsetidae (NELSON, 2006).

A família Parodontidae (Eigenmann, 1910) constitui um pequeno grupo de peixes neotropicais reunidas em três gêneros (*Parodon* Valenciennes, 1849; *Saccodon* Kner, 1863 e *Apareiodon* Eigenmann, 1916) com 28 espécies válidas sendo destas 15 pertencentes ao gênero *Apareiodon*, 11 ao gênero *Parodon* e 3 ao gênero *Saccodon* (PAVANELLI, 2003; PAVANELLI e BRITSKI, 2003; INGENITO e BUCKUP, 2005; PAVANELLI, 2006, 2007).

São peixes fusiformes com a face ventral do corpo plana, com pouca importância comercial, comumente denominados de “canivetes”, “peixe-charuto” ou “*virolitos*”, que habitam ambientes lóticos de riachos de cabeceira (PAVANELLI, 2003).

A família Parodontidae é mais um grupo de peixes neotropicais com taxonomia confusa. Esta família é formada por um grupo relativamente pequeno,

sustentada por poucos e sutis caracteres morfológicos diagnósticos. As espécies desta família podem ser diferenciadas dos demais Characiformes pela ausência de lábio superior, por apresentar dentes pré-maxilares ligados frouxamente ao osso pré-maxilar, dentes mandibulares quando presentes localizados na região lateral da abertura bucal ângulo - articular, dobrado sobre a margem dorsal da parte posterior do dentário, cobrindo parcialmente suas faces medial e lateral, e abertura dorsal da fossa pós-temporal delimitada somente pelo parietal e epoccipital (INGÊNITO, 2008).

As diferenças morfológicas descritas entre os três gêneros desta família estão relacionadas com a coloração do corpo e o padrão dentário. A presença de dentes mandibulares é uma característica exclusiva do gênero *Parodon*; além disso, o número de cúspides dos dentes pré-maxilares é utilizado para diferenciar os gêneros *Parodon* e *Apareiodon*. O gênero *Saccodon* é caracterizado por apresentar acentuado polimorfismo dentário (ROBERTS, 1974; TRAVASSOS, 1955; PAVANELLI, 2003; 2007).

Apesar dos caracteres morfológicos estarem sendo utilizados para diferenciar os gêneros pertencentes à família Parodontidae, ROBERTS (1974) relata em seu trabalho que os gêneros *Parodon*, *Apareiodon* e *Saccodon*, são pobremente definidos na literatura e que suas poucas diferenças poderiam ser questionadas. SHULTZ e MILES (1943) já questionavam a validade de *Apareiodon* devido à condição usual da falta de dentes em espécimes juvenis de *Parodon*. De fato existem identificações incorretas na literatura baseados apenas neste caráter morfológico, um exemplo provém de *P. pongoensis*, o qual foi erroneamente incluído no gênero *Apareiodon* e posteriormente alocado para o

gênero *Parodon* por SHULTZ e MILES (1943), baseados na descoberta de dois pequenos dentes mandibulares no holótipo. Diante disso, alguns pesquisadores têm questionado a separação dos gêneros *Parodon* e *Apareiodon* (PAVANELLI e BRITSKI, 2003; INGENITO e BUCKUP, 2005; VICARI et al., 2006). Assim, pode-se dizer que pela falta de caracteres confiáveis há problemas sistemáticos na classificação dessas espécies.

As espécies da família Parodontidae estão distribuídas por todo o Continente Sul Americano e parte do Panamá exceto nos rios costeiros ao sul do estado da Bahia, na Patagônia e no canal do rio Amazonas (PAVANELLI, 2006). O gênero *Saccodon* possui uma distribuição mais restrita presente somente ao norte do Continente Sul Americano, sendo encontrado na bacia costeira no Panamá, Colômbia e Equador (ROBERTS, 1974). Por sua vez, os gêneros *Parodon* e *Apareiodon* estão distribuídos por todo o continente sul americano, com exceção das bacias do Atlântico Sul, Patagônia e canal do rio Amazonas (PAVANELLI e BRITSKI, 2003).

Estudos sobre relações de parentesco na família Parodontidae capazes de analisar todos ou quase a totalidade de seus representantes são escassos. Apenas recentemente, INGÊNITO (2008), utilizando o método cladístico de parcimônia para análise filogenética, analisou caracteres osteológicos e de morfologia externa das 28 espécies válidas de Parodontidae, uma espécie não descrita de *Parodon*, e 17 espécies de Characiformes como grupo externo. Considerou *Saccodon* como um grupo irmão dos demais Parodontidae, sendo o gênero *Apareiodon* sinônimo júnior de *Parodon*. Além disso, mostrou que a presença de dentes mandibulares para diagnosticar grupos monofiléticos é

ineficaz, pois grupos definidos por este caractere são polifiléticos. Ainda, relata que nas espécies *P. davisii*, *P. ibitiensis*, *P. moreirai*, *P. tigrinus* e *Parodon* sp. a ocorrência de dentes mandibulares varia intra-especificamente.

Por outro lado, estudos preliminares realizados por SILVA (2009) com sequência de DNA mitocondrial D-loop das espécies *P. nasus*, *P. moreirai*, *A. piracicabae*, *A. vladii* e *Apareiodon* sp. utilizando análise de parcimônia, mostrou a ocorrência de dois clados, um com espécies do gênero *Apareiodon* subdividida em dois subclados bem apoiados, e outro com apenas espécies do gênero *Parodon* sem subdivisões internas com valores de suporte significativo, sugerindo uma especiação recente entre as espécies *P. moreirai* e *P. nasus*.

As espécies da família Parodontidae habitam geralmente rios de água corrente e de fundo rochoso, especialmente corredeiras e cachoeiras, onde permanecem sob o fundo, raspando e ingerindo os organismos que ali se desenvolvem (NAKATANI et al., 2001).

Caracteres merísticos e dados biológicos realizados por NOMURA et al. (1978) com a espécie *Apareiodon affinis* do rio Mogi Guaçu (SP) revelaram que sua alimentação é composta principalmente por algas. Demonstrou também que as fêmeas apresentaram crescimento e pesos totais maiores que os machos dentro de cada classe de comprimento.

O comportamento reprodutivo das espécies de Parodontidae é pouco conhecido e as informações na literatura relatam uma variação de comportamento entre as espécies. BARBIERI et al. (1983) estudaram o comportamento reprodutivo das espécies *Apareiodon ibitiensis*, *Apareiodon affinis* e *Parodon hilarii* presentes no rio Passa Cinco, município de Ipeúna (SP). Verificaram que

estas espécies apresentam desova parcelada com variações significativas na extensão do período reprodutivo. Em outro estudo, *Parodon tortuosos* também apresentou desova parcelada, com estádios de maturação gonadal estendendo-se por um longo período, porém com maior incidência de fêmeas maduras ocorrendo no período novembro/dezembro (AZEVEDO et al., 1988).

MOREIRA-FILHO et al. (1985) estudaram dados biológicos e citogenéticos das espécies simpátricas e sintópicas *P. nasus* (citado como *P. tortuosos*), *A. ibitiensis*, *A. affinis* e *A. piracicabae* coletadas no rio Passa Cinco, SP. Visualizaram diferenças tanto em relação à abundância relativa das espécies, quanto na variação cariotípica interespecífica. Diante disto, correlacionaram estes dados com outras análises de comportamento reprodutivo na família Parodontidae. Assim, demonstraram também diferenças interespecíficas no crescimento, na fecundidade e diâmetro do ovócito. A análise em conjunto destas informações permitiu aos autores inferir que a soma de todos estes fatores contribuem para redução do potencial competitivo e atuam no isolamento reprodutivo, possibilitando assim, a convivência simpátrica e sintópica entre estas espécies de forma aparentemente equilibrada.

1.2 Citogenética da família Parodontidae

Análises citogenéticas em Parodontidae tem indicado um número diplóide conservado de 54 cromossomos. Entretanto, uma grande diversidade tem sido observada entre os marcadores cromossômicos de fórmula cariotípica, polimorfismos e cromossomos supranumerários, atividade das regiões

organizadoras de nucléolo (Ag-RONs), número e localização de sítios de rDNA 18S e 5S, heterocromatina, localização e número de sítios do DNA satélite pPh2004, e presença ou ausência de cromossomos sexuais morfologicamente diferenciados (MOREIRA-FILHO et al., 1993; JESUS e MOREIRA-FILHO, 2000a; 2000b; VICENTE et al., 2001; CENTOFANTE et al., 2002; VICENTE et al., 2003; BELLAFRONTE et al., 2005; ROSA et al., 2006; VICARI et al., 2006). Embora a maior parte das espécies estudadas na família sejam cromossomicamente homomórficas em relação ao sexo, dois sistemas distintos de cromossomos sexuais heteromórficos foram descritos na família Parodontidae: um sistema de cromossomos sexuais múltiplo do tipo ZZ/ZW₁W₂ em *Apareiodon affinis* (MOREIRA-FILHO et al., 1980) e um sistema simples do tipo ZZ/ZW para *Parodon hilarii* (MOREIRA-FILHO et al., 1993), *P. moreirai* (citado como *Parodon* sp. por CENTOFANTE et al., 2002), *Apareiodon vladii* (citado como *Apareiodon* sp. por ROSA et al., 2006), *Apareiodon* sp. da bacia do alto rio Tibagi, PR (VICARI et al., 2006) e *A. ibitiensis* (SILVA, 2009).

Citogeneticamente, os gêneros *Parodon* e *Apareiodon* possuem características macro-cariotípicas muito semelhantes: o número diplóide é de 54 cromossomos compostos basicamente por cromossomos meta-submetacêntricos (m-sm) e a presença de um a três pares subtelocêntricos (st) variáveis entre as espécies. No entanto, exceções ocorrem em populações de *A. affinis* do baixo rio Paraná (Argentina), a qual apesar de apresentar número diplóide de 2n=54 possui cromossomos do tipo acrocêntrico (a) (JORGE e MOREIRA-FILHO, 2000; JORGE e MOREIRA-FILHO, 2004). Variações de número cromossômico em Parodontidae também foram visualizadas em *A. piracicabae* coletados no rio

Passa Cinco – SP, desta vez, devido à presença de cromossomos B adicionais (FALCÃO et al., 1984).

A análise de mapeamento dos sítios de rDNA é uma importante ferramenta cromossômica que permite inferir sobre a evolução cariotípica das populações e contribui com a citotaxonomia. Os sítios de rDNA 45S, detectados por Ag-RONs e sonda de rDNA 18S, localizam-se na região telomérica do braço longo de um par cromossômico subtelocêntrico grande, em todas as espécies de *Apareiodon* já estudadas (MOREIRA-FILHO et al., 1984; MOREIRA-FILHO et al., 1985; JESUS e MOREIRA-FILHO, 2000a; ROSA et al., 2006; VICARI et al., 2006). No entanto, SILVA (2009) utilizando hibridação *in situ* com a sonda 18S, além deste par subtelocêntrico marcado encontrou sítios adicionais de rDNA 45S em cariótipos de *A. ibitiensis* nas populações do rio São Francisco e do alto rio Paraná. Por outro lado, no gênero *Parodon*, as RONS têm se mostrado como caracteres espécie - específicos (JESUS e MOREIRA-FILHO, 2000b; VICENTE et al., 2001; BELLAFRONTE et al., 2005).

No que se refere ao rDNA 5S, a localização próxima a região centromérica de um par submetacêntrico é a mais comumente verificada entre os parodontídeos (CENTOFANTE et al., 2002; VICARI et al., 2006). Entretanto sítios adicionais com localizações variáveis podem ocorrer em algumas espécies do gênero *Parodon*, além da provável correspondência entre os sítios de rDNA 18S e 5S com heterocromatina GC-rica em alguns representantes da família (VICENTE et al., 2001; BELLAFRONTE et al., 2005; VICARI et al., 2006).

Dados obtidos a partir de DNA satélite de Parodontidae mostraram a utilidade desse marcador em estudos evolutivos no grupo. VICENTE et al. (2003),

isolaram e identificaram uma família de DNA satélite utilizando o método de restrição genômica do DNA de *P. hilarii*. Este DNA, denominado pPh2004, foi identificado como uma sequência monomérica de 200pb e 60% rico em bases AT. A hibridação *in situ* fluorescente, utilizando sonda deste satélite, evidenciou 14 sítios em autossomos, além de um sítio na região terminal do braço longo do cromossomo Z e um sítio na região terminal do braço curto do cromossomo W de *P. hilarii* (VICENTE et al, 2003). A sonda pPh2004 também foi localizada sobre os cromossomos de *Parodon moreirai* (CENTOFANTE et al., 2002) onde foram evidenciados os mesmos sítios encontrados nos cromossomos Z e W de *P. hilarii*, além de dois pequenos sítios adicionais nos autossomos. SILVA (2009) realizou um mapeamento da sonda pPh2004 por FISH sobre os cromossomos de alguns representantes da família Parodontidae, entre eles, *P. nasus*, *A. ibitiensis*, *A. affinis*, *A. vladii*, *A. piracicabae*, e *Apareiodon* sp. do alto rio Tibagi. Além de *P. hilarii* e *P. moreirai* as espécies *P. nasus* e *A. affinis* também apresentaram o DNA satélite pPh2004 em seus cariótipos.

A heterocromatina constitutiva nos cromossomos de Parodontidae localiza-se nas regiões centroméricas e pericentromérica e se apresenta como blocos bem evidentes, sendo também observadas marcações terminais (MOREIRA-FILHO et al., 1984; MOREIRA-FILHO et al., 1993, JESUS et al., 1999; JESUS e MOREIRA-FILHO, 2000; JORGE e MOREIRA-FILHO, 2004; VICARI et al., 2006). A localização da heterocromatina constitutiva é imprescindível para identificação do sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW entre os parodontídeos. Nas espécies que possuem sistema ZZ/ZW o cromossomo Z apresenta pequenos blocos heterocromáticos, sendo um proximal e outro terminal no braço curto. O

cromossomo W, por sua vez, sofreu um processo de heterocromatinização e acúmulo de seqüências repetitivas na diferenciação em relação ao cromossomo Z. A heterocromatinização e o acúmulo de seqüências do W ocorreram a partir de uma pequena região heterocromática proximal do braço curto presente no cromossomo Z, a qual, no cromossomo W diferenciado é maior e corresponde ao braço longo deste cromossomo. Esta hipótese de diferenciação é utilizada para explicar a origem evolutiva do sistema ZZ/ZW presente em *P. moreirai* citado como *Parodon* sp., *P. hilarii*, *A. vladii* citado como *Apareiodon* sp., *Apareiodon* sp. do rio Verde, e *A. ibitiensis* (CENTOFANTE et al., 2002; VICENTE et al., 2003; ROSA et al., 2006; VICARI et al., 2006; SILVA, 2009).

Desta forma, em relação às espécies mencionadas com o sistema ZZ/ZW e mecanismo semelhante de diferenciação do W, *P. hilarii* apresenta o cromossomo W subtelocêntrico e o maior do complemento (MOREIRA-FILHO et al., 1993; JESUS e MOREIRA-FILHO, 2000b; VICENTE et al., 2003); *P. moreirai* apresenta o W correspondente, em tamanho, ao segundo par do cariótipo (CENTOFANTE et al., 2002); *Apareiodon vladii* apresenta o cromossomo W submetacêntrico, sendo o segundo em tamanho do complemento (ROSA et al., 2006); em *Apareiodon* sp. o W é subtelocêntrico e também corresponde ao segundo cromossomo em tamanho do complemento (VICARI et al., 2006). Já em *A. ibitiensis* o cromossomo W é submetacêntrico estando entre os maiores cromossomos do complemento (SILVA, 2009). Em todos os casos, o cromossomo Z corresponde a um meta/submetacêntrico menor em tamanho que o W.

Outro mecanismo evolutivo possivelmente originou o sistema múltiplo ZZ/ZW₁W₂ restrito a espécie *A. affinis*, onde uma fissão cêntrica seguido de uma

inversão pericêntrica teria ocorrido no par número um originando os cromossomos W_1 e W_2 (MOREIRA-FILHO et al., 1980; MOREIRA-FILHO et al., 1984; MOREIRA-FILHO et al., 1985; JESUS et al., 1999; JORGE e MOREIRA-FILHO, 2000; LEITE et al., 2004). Essa hipótese é reforçada pela análise do padrão de bandamento C, onde o cromossomo W_1 possui uma pequena banda heterocromática na região pericentromérica e uma banda mais conspícua na região terminal do braço longo, sendo que o inverso ocorre com o cromossomo W_2 (JESUS et al., 1999).

Na família Parodontidae o sistema ZZ/ZW parecia até recentemente, estar restrito ao gênero *Parodon* (MOREIRA-FILHO et al., 1993; JESUS e MOREIRA-FILHO, 2000b; CENTOFANTE et al., 2002; VICENTE et al., 2003); entretanto a descrição de três casos de sistema ZZ/ZW em *Apareiodon* (ROSA et al., 2006; VICARI et al., 2006; SILVA, 2009) suscitou novas considerações sobre a evolução cariotípica nessa família. É provável que os cromossomos sexuais ZZ/ZW não sejam um sistema recorrente para *Parodon* e *Apareiodon*, visto que tanto em um gênero como no outro, os cromossomos sexuais possuem um processo de heterocromatinização similar e um provável mecanismo idêntico de diferenciação do cromossomo W. Dessa forma, o agrupamento taxonômico do gênero *Parodon*, assim como do gênero *Apareiodon*, pode não corresponder à realidade, onde as espécies que apresentam o sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW poderiam formar um grupo monofilético, possuindo este caráter com exclusividade entre os demais parodontídeos. Esta hipótese ganha força uma vez que a distinção entre os gêneros *Parodon* e *Apareiodon* é sustentada por poucos e sutis caracteres diagnósticos (PAVANELLI e BRITSKI, 2003; PAVANELLI, 2003; 2007) e baseia-

se em aspectos morfológicos da presença e ausência de poucos e pequenos dentes mandibulares.

1.3 DNA repetitivo com enfoque na diferenciação dos cromossomos sexuais

As seqüências de DNA repetitivo estão presentes em grande parte do genoma dos eucariotos (CHARLESWORTH et al., 1994) e aparecem no genoma na forma consecutiva (repetidos em tandem) ou como seqüência dispersa (JURKA et al., 2007).

O DNA satélite é uma seqüência altamente repetitiva em tandem e forma a maior parte da heterocromatina constitutiva (YUNIS e YASMINEB, 1971; PLOHL et al., 2008), as unidades de repetição variam de 10-100 pb que são os minissatélites, a 2-6 pb que são os microsatélites (SUMNER, 2003). Estão localizados em regiões que são consideradas geneticamente inertes e compactadas do genoma (BERIDZE, 1986). Estes DNAs, por característica, apresentam uma localização padronizada nos cromossomos geralmente presentes em regiões centroméricas/pericentroméricas; ocasionalmente em regiões intersticiais e terminais dos cromossomos (CHARLESWORTH et al., 1994). A composição deste DNA repetitivo pode variar de AT ricos ou GC ricos, e o comprimento da unidade de repetição também varia de dois pares de bases até cerca de um ou dois mil pares de base (BERIDZE, 1986).

Apesar do DNA satélite estar freqüentemente relacionado à inatividade transcricional (BERIDZE, 1986), tem sido sugerido sua importância juntamente com proteínas específicas, nos processos da estabilidade da estrutura genômica,

efeito de regulação gênica (ex. efeito de posição de variação), pareamento cromossômico e segregação, assim como na investigação de variabilidade e diversidade genética envolvendo aspectos evolutivos (HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ et al., 2008; BUSSIEK et al., 2009; MONOD et al., 2002; KURENOVA et al., 1998; O'CONNELL e WRIGTH, 1997).

Os mecanismos para explicar a origem do DNA satélite tem sido diversos, entre eles estão descritos na literatura a replicação saltatória (BRITTEN e KOHNE, 1966; 1968), o *crossing-over* desigual (SMITH, 1974) e origem por elementos transponíveis (HEIKKINEN et al., 1995). Na realidade, sabe-se atualmente que todos esses procedimentos acima considerados podem atuar na origem e diversificação de famílias de DNA satélite.

Outra peculiaridade dos DNAs satélites é que estes podem estar organizados em sítios específicos de um par cromossômico. No entanto, na maioria das vezes, estas unidades de repetição evoluem em paralelo (DOVER, 1986), levando a uma homogeneização intra-específica entre as unidades repetitivas (UGARKOVIC e PLOHL, 2002). Esta distribuição cromossômica é, na realidade, um reflexo do modo de evolução em concerto de seqüências entre cromossomos não homólogos (PLOHL et al., 1992). Nestes casos, a dispersão intercromossômica seria mais rápida que as taxas de mutação e/ou homogeneização intracromossômica. Diante da dinâmica evolutiva extremamente variável dos DNAs satélites estes podem, de fato, prover informações úteis tanto para estudos microevolutivos (no caso de DNAs satélites espécie específicos ou cromossomo específicos) (UGARKOVIC e PLOHL, 2002), como para estudos filogenéticos (onde um DNA satélite é compartilhado por algumas espécies em

um determinado grupo) (PONS et al., 2002; PONS e GILLESPIE, 2003; KANTEK et al., 2009). No entanto, famílias de DNA satélite podem, paralelamente, permanecer conservadas ao longo do tempo por terem evolução lenta, mantidas por baixas taxas de mutação, com reflexo na homogeneização das seqüências (DE LA HERRÁN et al., 2001).

Em peixes, DNAs satélites cromossomo específicos podem tornar-se marcadores citogenéticos úteis (SAITO et al., 2007), utilizados algumas vezes para compreender as relações filogenéticas entre diferentes táxons (DE LA HERRÁN et al., 2001; SAITO et al., 2007), esclarecer a citotaxonomia em complexos de espécies (MANTOVANI et al., 2004; VICARI et al., 2008; KANTEK et al., 2009), evidenciar as prováveis origens de cromossomos supranumerários (MESTRINER et al., 2000; ZIEGLER et al., 2003; JESUS et al., 2003; ARTONI et al., 2006) e na caracterização dos cromossomos sexuais (DEVLIN et al., 1998; 2001).

O método utilizado tradicionalmente para isolar os DNAs repetitivos é por digestão de DNA genômico utilizando enzimas de restrição, e após sua localização cromossômica em uma grande soma de espécies podem ser utilizados como marcadores moleculares na perspectiva de entender os processos de evolução do DNA destas espécies. No entanto, atualmente, regiões cromossômicas específicas, braços cromossômicos ou mesmo cromossomos inteiros podem ser obtidos por microdissecção seguido por uma reação de amplificação por reação da cadeia polimerase (PCR) utilizando iniciadores degenerados (para uma revisão ver PHILLIPS e REED, 1996).

A localização de seqüências repetitivas (TTAGGG)_n tem sido amplamente utilizada em peixe na busca por indícios de fusões cromossômicas. Embora a localização cromossômica dessas repetições em diversas espécies de peixes mostre sua distribuição primária nos telômeros (MEYNE et al., 1990; CHEW et al., 2002), alguns sítios não teloméricos também tem sido observados (REED e PHILLIPS, 1995). Nos cromossomos supranumerários (ou Bs), seqüências de DNAs repetitivos também já foram identificadas em algumas espécies de peixes, como por exemplo, *Astyanax scabripinnis* (MESTRINER et al., 2000), *Prochilodus lineatus* (JESUS et al., 2003) e no ciprinídeo *Alburnos alburnos* (ZIEGLER et al., 2003).

Em relação aos sistemas de cromossomos sexuais é sabido que estes surgem a partir de um par autossômico que passa por intensa diferenciação. Na hipótese de Müller para origem de cromossomos sexuais XY a degeneração do Y é a consequência de sua permanente heterozigosidade (MÜLLER, 1932). A degeneração do Y é caracterizada por dois principais fenômenos: (1) a mudança de regiões eucromáticas em estrutura de heterocromatina, e (2) a erosão da atividade gênica do Y. Por sua vez, na grande maioria dos sistemas de cromossomos sexuais ZW, o cromossomo heteromórfico W sofre modificações de acúmulo de seqüências heterocromáticas e erosão da atividade gênica. Os cromossomos sexuais múltiplos por sua vez, segundo estudos com invertebrados, são obrigatoriamente derivados de cromossomos sexuais simples (WHITE, 1973; SMITH e VIRKK, 1978; SCHNEIDER et. al., 2006).

Os cromossomos sexuais não ocorrem na base da filogenia dos peixes e tem origem independente dentro de cada gênero ou família, muito possivelmente,

em cada uma destas, a partir de um par cromossômico idêntico denominado de protosex cromossomo, a exemplo do que foi descrito para a origem dos cromossomos sexuais em cobras (ARTONI e BERTOLLO, 2002; MATSUBARA et al., 2006).

Em peixes os mecanismos cromossômicos de diferenciação do sexo são variados e incluem sistemas de cromossomos sexuais simples (XX/XY e ZZ/ZW) somados aos sistemas de cromossomos sexuais múltiplos originados através de vários mecanismos, como por exemplo, de translocação X-autossomo, Y-autossomo e fissão cêntrica, tais como: XX/XY_1Y_2 , $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ e ZZ/ZW_1W_2 , respectivamente (MOREIRA-FILHO et al., 1993; ALMEIDA-TOLEDO et al., 2000; ALMEIDA-TOLEDO e FORESTI, 2001). A maioria das espécies de peixes não apresenta cromossomos sexuais diferenciados citogeneticamente (VICENTE et al., 2003). Segundo CENTOFANTE et al. (2002) 55 ocorrências de cromossomos sexuais heteromórficos tem sido caracterizados em peixes neotropicais, sendo que 64 % deles mostram heterogametia feminina e 36 % heterogametia masculina. Oitenta por cento dos casos correspondem a sistemas simples de cromossomos sexuais, sendo desses 77 % ZZ/ZW e 23 % são XX/XY. Os 20 % restantes correspondem aos que possuem sistemas múltiplos de cromossomos sexuais.

Seqüências repetitivas sexo-específicas têm sido isoladas e mapeadas nos cromossomos de diversas espécies de peixes, incluindo *Leporinus elongatus* (NAKAYAMA et al, 1994), *Chionodraco hamatus* (CAPRIOLIONE et al., 1994), *Poecilia reticulata* (NANDA et al., 1990), *Oncorhynchus tshawytscha* (DEVLIN et al., 1991; STEIN et al., 2001), *Hoplias malabaricus* (BORN e BERTOLLO, 2000),

gênero *Triportheus* (ARTONI e BERTOLLO, 2002), *Salvelinus namaycush* (STEIN et al., 2002) e *Oreochromis niloticus* (HARVEY et al., 2002; EZAZ et al., 2004).

Os guarus, família Poeciliidae, representam um grupo interessante em relação à determinação sexual, onde algumas espécies apresentam heterogametia feminina enquanto espécies próximas apresentam heterogametia masculina. Com o emprego do bandamento C e FISH demonstraram a ocorrência de um grande bloco heterocromático na região telomérica dos cromossomos W e Y, rico em DNA repetitivo e reduzido nos respectivos Z e X, sugerindo que o surgimento e o desenvolvimento dessa heterocromatina tenha sido o primeiro passo na diferenciação citológica desses cromossomos (HAAF e SCHIMID, 1984; NANDA et al., 1990).

Cromossomos sexuais ZW claramente diferenciados na morfologia ocorrem no gênero *Leporinus* (GALLETTI et al., 1995). Duas famílias de DNAs satélite sexo-específicas foram isoladas de *L. elongatus* (NAKAYAMA et al., 1994). Pelo método FISH, uma dessas famílias foi localizada em ambos os cromossomos Z e W, enquanto a outra parece específica do cromossomo W. As seqüências dessas duas famílias não mostram homologia clara com qualquer outra seqüência conhecida. No entanto, três indivíduos atípicos, um deles antes reconhecido como macho foi considerado como fêmea ZW pela sonda W-específica e dois machos não usuais ZW, um deles apresentando padrões de hibridização de machos, foram detectados nessas análises.

Na família Parodontidae há estudos com DNA satélite obtido por digestão do DNA genômico com *Eco* RI de *Parodon hilarii* (VICENTE et al., 2003). A hibridação fluorescente *in situ* evidenciou sítios em *P. hilarii* (VICENTE et al.,

2003) e em *P. moreirai*, citado como *Parodon* sp. (CENTOFANTE et al., 2002), *P. nasus* e *A. affinis* (SILVA, 2009) presentes na região terminal de alguns cromossomos do complemento, incluindo os cromossomos sexuais das espécies *Parodon hilarii* e *Parodon moreirai*.

Em alguns grupos de peixes neotropicais a presença de genes de rDNA em domínios heterocromáticos GC ricos podem estar atuando na diferenciação citológica dos cromossomos sexuais. O citótipo B de *Hoplias malabaricus* mostra um número diplóide de $2n=42$ cromossomos e um sistema de cromossomos sexuais XX/XY apresentando um cromossomo X grande e um Y pequeno devido a um bloco de rDNA 45S funcional associado à heterocromatina na porção distal do braço longo do X (BORN e BERTOLLO, 2000). VICARI et al. (2003), estudando uma população do citótipo A de *H. malabaricus* (sem a presença de cromossomos sexuais heteromórficos) discutiram o possível papel desta classe de rDNA, associado à heterocromatina GC, na diferenciação do cromossomo X do citótipo B. No gênero *Triportheus* o sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW também apresenta o rDNA associado à heterocromatina GC como fator preponderante da diferenciação dos cromossomos W (ARTONI e BERTOLLO, 2002).

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Os peixes neotropicais apresentam uma grande diversidade quanto a mecanismos cromossômicos de determinação do sexo. Tais sistemas de cromossomos sexuais podem evoluir independentemente dentro de gêneros ou

famílias ao lado de um grande número de espécies homomórficas em relação a estes cromossomos. Estas características fazem dos peixes neotropicais um excelente modelo de investigação evolutiva do ponto de vista cromossômico, o qual não é encontrado em nenhum local do mundo. Todas as espécies de Parodontidae com um sistema ZW apresentam, aparentemente, o mesmo mecanismo de diferenciação do cromossomo W. Um bloco heterocromático presente no braço curto do protosex, parece ter sofrido uma amplificação em tamanho, em um dos homólogos ancestral (primitivo W), originando o braço longo do cromossomo W atual, o qual se mostra acentuadamente maior que o cromossomo Z. Assim sendo, considerando que as espécies de Parodontidae que possuem cromossomos sexuais diferenciados ZW formam um grupo derivado em relação às espécies homomórficas, é possível inferir que: (1) o DNA satélite pPh2004 não é o único componente do genoma implicado na diferenciação do cromossomo W dessas espécies; (2) este DNA satélite teve, provavelmente, uma origem posterior à diferenciação do sistema ZW nos Parodontidae; e (3) outros marcadores cromossômicos como a localização dos sítios de rDNA auxiliam o agrupamento filogenético de Parodontidae. Embora estes dados sejam ainda incipientes, fica claro que um estudo mais abrangente sobre a origem e dispersão do DNA pPh2004 e de outros DNAs satélites entre as espécies, além da localização dos sítios de rDNA 18S e 5S possibilitará conclusões mais robustas sobre a evolução do sistema ZW, assim como sobre as relações de parentesco entre as espécies de Parodontidae.

Assim foram objetivos do presente estudo:

a) Obter uma sonda da região heterocromática do cromossomo W de Parodontidae, amplificar por reação de DOP-PCR (*Degenerated Oligonucleotide Primer - Polymerase Chain Reaction*) e realizar sua localização *in situ* em diferentes representantes da família Parodontidae;

b) Realizar uma análise comparativa da diferenciação do cromossomo W entre diferentes espécies de Parodontidae portadoras do sistema ZZ/ZW;

c) Verificar possível homeologia, considerando a hibridação cromossômica entre o cromossomo W diferenciado e os cromossomos de espécies de Parodontidae que não são portadoras de sistema de cromossomos sexuais heteromórficos;

d) Verificar se o sistema ZZ/ZW₁W₂ de *A. affinis* seria derivado de um sistema ZW não diferenciado;

e) Localizar as sondas já existentes de DNA satélite pPh2004 e dos rDNA 18S e 5S em diferentes representantes da família Parodontidae com finalidade de análises cromossômicas evolutivas comparadas;

h) Utilizar os marcadores cromossômicos em questão com intuito de obter possíveis relações filogenéticas entre os representantes da família Parodontidae.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material e Locais de Coleta

Foram estudadas citogeneticamente espécies de peixes da família Parodontidae das bacias do alto rio Paraná, São Francisco, Iguaçu, Araguaia e Paraguai (Figura 1). O material cromossômico foi obtido via preparação de espécimes coletados na natureza, ou a partir do banco de preparações cromossômicas dos laboratórios de citogenética de peixes das Universidades Federal de São Carlos; Universidade Estadual do Oeste do Paraná; e Universidade Estadual de Ponta Grossa. Os procedimentos estão de acordo com o Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Ponta Grossa (Protocolo: 04741/08 – Anexo I). As espécies de Parodontidae estudadas estão listadas na Tabela I.

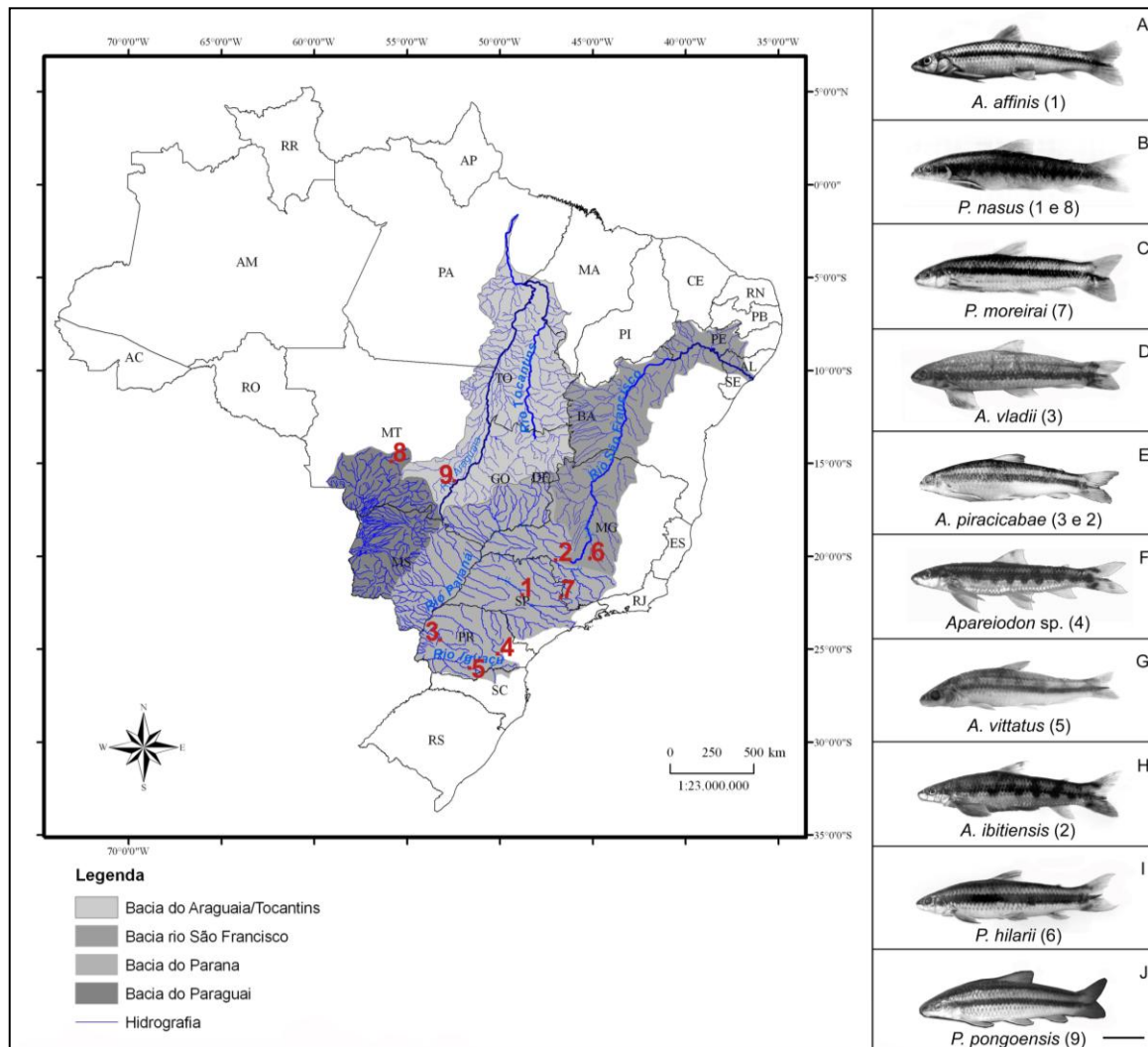


Figura 1: Mapa hidrográfico do Brasil, mostrando a distribuição das espécies de Parodontidae. Em (1) rio Passa-Cinco - SP; (2) rio Piumhi – MG; (3) rio Piquiri - PR; (4) rio Tibagi – PR; (5) rio Jordão – PR; (6) Córrego do Porta – MG; (7) Córrego Paiol Grande - SP; (8) rio Paraguai – MT; (9) rio Taquaralzinho – MT. Ao lado as espécies estudadas numeradas de acordo com a sua localização nas bacias. Fotos: (A) JESUS et al., 1999; (B) e (C) CENTOFANTE et al., 2002; (D) ROSA et al., 2006; (E) PAVANELLI, 2006; (F) VICARI et al., 2006; (G) presente estudo; (H) JESUS, 1996; (I) VICENTE, et al., 2003; (J) HOOKER. Barra= 2cm

Tabela I: Pontos de amostragem, distribuição nas bacias e número de espécies estudadas da família Parodontidae.

Espécies (Família Parodontidae)	Ponto de amostragem	Bacia hidrográfica	Nº de machos	Nº de fêmeas	Total
<i>Apareiodon affinis</i>	Rio Passa-Cinco (SP)	Alto Paraná	2	3	5
<i>Apareiodon ibitiensis</i>	Rio Piumhi (MG)	São Francisco	1	2	3
<i>Apareiodon piracicabae</i>	Rio Piquiri (PR)	Alto Paraná	4	2	6
<i>Apareiodon piracicabae</i>	Rio Piumhi (MG)	São Francisco	3	1	2
<i>Apareiodon sp.</i>	Rio Tibagi (PR)	Alto Paraná	19	27	46
<i>Apareiodon vittatus</i>	Rio Jordão (PR)	Iguaçu	2	2	4
<i>Apareiodon vladii</i>	Rio Piquiri (PR)	Alto Paraná	13	19	32
<i>Parodon hilarii</i>	Córrego do Porta (MG)	São Francisco	11	14	25
<i>Parodon moreirai</i>	Córrego Paiol Grande (SP)	Alto Paraná	9	7	16
<i>Parodon nasus</i>	Rio Paraguai (MT)	Paraguai	1	1	2
<i>Parodon nasus</i>	Rio Passa-Cinco (SP)	Alto Paraná	1	1	2
<i>Parodon pongoensis</i>	Rio Taquaralzinho (MT)	Araguaia	1	1	2

3.2 Métodos

3.2.1 Obtenção de Cromossomos Mitóticos

A. Preparações Diretas (BERTOLLO et al., 1978)

Foi injetado intra-abdominalmente no animal uma solução aquosa de colchicina 0,025 %, na proporção de 1 ml/100 g de peso. Os peixes então foram mantidos em aquário bem aerado durante 50-60 minutos, posteriormente foram anestesiados com benzocaína diluída a 0,01%, e sacrificados. A porção do rim anterior foi retirada e dissociada com uma seringa desprovida de agulha em cerca de 10 ml de solução hipotônica (KCl 0,075 M). O tecido dissociado foi incubado em estufa a 37°C durante 25-30 minutos, que depois foi re-suspendido com auxílio de uma pipeta Pasteur e colocado em tubo de centrífuga. Foi adicionado neste tubo algumas gotas de fixador (3 partes de metanol para 1 de ácido acético glacial), o material foi novamente re-suspendido repetidas vezes, foi centrifugado durante 10 minutos, a 900 rpm e depois foi descartado o sobrenadante. Após a centrifugação foi adicionado 5-7 ml do mesmo fixador, re-suspendido e centrifugado por mais 10 minutos a 900 rpm, este passo foi repetido mais uma vez. Foi então descartado o sobrenadante e adicionado uma quantidade de fixador para que se obtivesse uma suspensão celular moderadamente concentrada (geralmente de 0,5 a 1,0 ml), re-suspendido e adicionado em freezer para posterior utilização.

Para confecção de lâminas foi pingado de 1-2 gotas da suspensão celular, com uma pipeta Pasteur. A lâmina estava limpa, levemente inclinada, com uma película d'água a 60°C, de tal forma que a água escorresse e permitisse que

o material ficasse aderido sobre a lâmina. O material foi então deixado secar ao ar e corado com solução de Giemsa a 5 %, em tampão fosfato pH=6,8 durante 6-8 minutos.

B. Cultura Celular de Curta Duração (FENOCCHIO et al., 1991 com pequenas adaptações)

O animal foi anestesiado com benzocaína diluída a 0,1 % e posteriormente morto. A porção do rim anterior foi retirada e colocada em cuba de vidro contendo meio de cultura RPMI 1640 e soro fetal bovino – Cultilab (proporção de 7:3) e antibióticos (5 mg de penicilina/litro; 10 mg de estreptomicina/litro). O tecido foi dissociado com uma seringa sem agulha, até obter uma suspensão celular homogênea e foi adicionado 2 gotas de solução de colchicina a 0,017 %. O material foi incubado em uma estufa a 37°C, durante aproximadamente 45 minutos, e posteriormente foi re-suspendido com uma pipeta Pasteur e transferido para um tubo de centrifuga. Foi centrifugado durante 10 minutos a 900 rpm e eliminado o sobrenadante. Após a centrifugação foi acrescentado 10 ml de solução de KCl a 0,075 M e levar a estufa a 36-37°C, durante 25-30 minutos. Após a incubação foi adicionado neste tubo algumas gotas de fixador (3 partes de metanol para 1 de ácido acético glacial), o material foi re-suspendido repetidas vezes e centrifugado durante 10 minutos, a 900 rpm. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 5-7 ml do mesmo fixador. A solução foi re-suspendida e centrifugado por mais 10 minutos a 900 rpm. Este passo foi repetido mais uma vez. Foi então descartado o sobrenadante e adicionado uma quantidade de fixador para que se obtivesse uma

suspensão celular moderadamente concentrada (geralmente de 0,5 a 1,0 ml), re-suspendido e adicionado em freezer para posterior utilização.

Para confecção de lâminas foi pingado de 1-2 gotas da suspensão celular, com uma pipeta Pasteur. A lâmina estava limpa, levemente inclinada, com uma película d'água a 60°C, de tal forma que a água escorresse e permitisse que o material ficasse aderido sobre a lâmina. O material foi então deixado secar ao ar e corado com solução de Giemsa a 5 %, em tampão fosfato pH=6,8 durante 6-8 minutos.

3.2.2 Detecção da Heterocromatina Constitutiva: Bandas-BSG (SUMNER, 1972, com pequenas adaptações).

As lâminas contendo o material celular foram tratadas com ácido clorídrico (HCl) 0,2 N, a 37°C, durante 10 minutos e posteriormente lavadas com água destilada. Elas então foram incubadas a 28°C em solução de bário (Ba (OH)_2) durante 1 a 2 minutos. Depois as lâminas foram submergidas em solução de ácido clorídrico 0,2 N e lavadas com água destilada. O material foi então imerso em solução salina 2x SSC, a 60°C, durante 40 minutos, lavado em água destilada e secado ao ar. As lâminas foram coradas com solução de Giemsa a 2 %, em tampão fosfato pH=6,8 durante 15 minutos.

3.2.3 Microdissecção de cromossomos submetidos ao bandamento C

(VICARI et al., submetido)

Os cromossomos W de *Apareiodon* sp. (rio Verde, PR) depois de submetidos ao bandamento C foram microdissectados em microscópio invertido (Olympus) equipado com micromanipulador mecânico (Eppendorf). A microdissecção foi realizada com agulhas de vidro, capilar, com pontas de aproximadamente 0,7 μm . Após a microdissecção, a ponta da agulha contendo o material cromossômico foi quebrada no interior de um microtubo. Um total de oito cromossomos W com banda C extremamente visível e contrastante foram microdissectados.

3.2.4 Iniciador oligonucleotídeo degenerado – reação em cadeia da polimerase (DOP-PCR) (TELENIUS et al., 1992 com pequenas adaptações)

A reação de polimerização consistiu de tampão 1x (*ThermoSequenase* - GE healthcare), 400 μM de dNTP, 2 μM do primer DOP– 5' CCGACTCGAGNNNNNNATGTGG - 3'. As reações de PCR foram realizadas em termociclador Biocycler Gradient System (Biosystems ®). O microtubo foi aquecido a 95°C por 10 min., seguido da adição de 10 U de *ThermoSequenase*. A primeira amplificação é realizada via RAMP-PCR: 3 min. a 94°C; 12 ciclos de baixa estrigência (1 min. e 30 s a 94°C, 2 min. a 32°C aumentando 0,2°C/s até 72°C e 2 min. a 72°C), seguidos por 30 ciclos de alta estrigência (1 min. e 30 s a 94°C, 1 min. e 30 s a 52°C e 1 min. e 30 s a 72°C). Os produtos obtidos foram corridos em

gel de agarose 1 %, onde o tamanho esperado foi corresponde a um arrasto entre 100 – 600pb.

A segunda reação de amplificação foi feita com 2 µl do primeiro produto de PCR realizando-se uma nova reação de amplificação num volume final de 50 µl. A reação foi composta de tampão 1X da *Taq* polimerase (Invitrogen); 2 mM MgCl₂; 400 µM de dNTP, 2µM de primer DOP = 5'-CCGACTCGAGNNNNNNATGTGG-3' e 2 U de *Taq* polimerase. As reações de polimerização foram constituídas por: 3min a 94°C; 35 ciclos de 1 min. e 30 s a 90°C, 1 min. e 30 s a 52°C e 1 min. e 30 s a 72°C.

3.2.5 Hibridação fluorescente *in situ* (FISH) com sondas de rDNA 18S, rDNA 5S, DNA repetitivo Pph2004 e cromossomo W de *Apareiodon* sp. (WAp)

A. Preparação das sondas

Foram empregados quatro tipos de sondas para a localização dessas seqüências nos cromossomos metafásicos das espécies de Parodontidae estudadas: (1) uma sonda de rDNA 18S, com aproximadamente 1.800 pb, obtida por PCR a partir do DNA nuclear da espécie de peixe *Prochilodus argenteus* (HATANAKA e GALETTI., 2004); (2) uma sonda de rDNA 5S, obtida a partir da espécie de peixe *Leporinus elongatus* (MARTINS e GALETTI Jr., 1999); (3) uma sonda de DNA repetitivo, isolada a partir de digestão enzimática do peixe *Parodon hilarii* denominada pPh2004 (VICENTE et al., 2003); e (4) a sonda da fração repetitiva do cromossomo W de *Apareiodon* sp. (rio Verde, PR), isolada por

microdissecção cromossômica seguida de amplificação DOP-PCR neste trabalho, agora denominada de DNA satélite WAp.

B. Marcação das sondas

As sondas do DNA ribossômico 18S e do DNA satélite pPh2004 foram marcadas com biotina 16 dUTP por meio da reação de “Nick Translation” (Biotin *Nick translation* – Roche) seguindo as instruções do fabricante. A sonda do rDNA 5S também foi marcada por reação de “Nick Translation”, desta vez utilizando a digoxigenina 11 dUTP (Dig Nick Translation, Roche).

A sonda WAp foi marcada por nova reação de DOP-PCR, semelhante à última, desta vez utilizando na reação de PCR 120 μ M de dUTP digoxigenina 11 dUTP juntamente com tampão 1X da *Taq* polimerase (Invitrogen); 2 mM MgCl₂; 400 μ M dATP; dGTP e dCTP; 280 μ M de dTTP; 2 μ M DOP primer = 5'-CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G-3' e 2 U de *Taq* polimerase.

Os produtos das reações de marcação de sonda, tanto por “nick translation”, quanto por DOP-PCR foram precipitados com acetato de potássio e etanol *overnight* a -20°C. Posteriormente, as sondas foram centrifugadas por 15 minutos a 13000 rpm, sendo descartado o sobrenadante, na sequência o DNA marcado foi submetido à secagem completa em estufa a 37°C.

C. Preparação da solução de hibridação

Em todas as FISH, a mistura de hibridação consistiu de: 200 μ l Formamida (50% de Formamida); 80 μ l Sulfato de Dextrano 50% (concentração final de 10%); 40 μ l de 20x *Saline salt citrate* - SSC (concentração final 2x SSC);

80 µl de H₂O qsp., perfazendo um volume total de 400 µl, aos quais foram adicionados 1 µg da sonda 1 (DNA marcado com biotina) + 1 µg da sonda 2 (DNA marcado com digoxigenina 11dUTP), (Double FISH). A estringência destas misturas de hibridação foi de 77 %. Em seguida, a solução de hibridação foi transferida para um banho fervente, durante 10 minutos, para desnaturação do DNA e, imediatamente após, para um recipiente com gelo, impedindo a renaturação por choque térmico.

D. Preparação das lâminas (lavagens pré-hibridação)

As lâminas, contendo as preparações cromossômicas, foram lavadas em *phosphate buffer saline* (PBS), por 5 minutos, em temperatura ambiente e desidratadas em uma série de etanol a 70 %, 85 % e 100 %, 5 minutos em cada banho. A seguir, foram tratadas com solução de RNase (100 µg/ml) durante 1 hora, em câmara úmida a 37°C, lavadas duas vezes em solução de 2xSSC, por 10 minutos e em PBS, por 5 minutos. Em seguida a fixação com formaldeído 1 %/ PBS 1x / MgCl₂ 50mM, por 10 minutos, à temperatura ambiente, lavagem em PBS 1x por 5 minutos e desidratação em série de etanol a 70 %, 85 % e 100 %, 5 minutos cada banho, à temperatura ambiente. As lâminas foram então tratadas com formamida 70 % dissolvida em 2x SSC, a 70°C, por 5 minutos e novamente desidratadas em série de etanol a 70 %, 85 % e 100 %, 5 minutos cada banho.

E. Hibridação e detecção dos sinais correspondentes

Foram aplicados, sobre as lâminas, cerca de 50 µl da solução de hibridação permanecendo “overnight” a 37°C, em câmara úmida contendo

solução de 2x SSC pH 7,0. Decorrido este tempo, as lâminas foram lavadas com solução de formamida 15 % em 0,2x SSC pH 7,0 por 20 minutos, a 42°C e, em seguida, lavadas com 0,1x SSC a 60°C, por 15 minutos. Em seguida foram lavadas em Tween 20, por 5 minutos, incubação em 90 µl de tampão *non fat dry milk* (NFDM) a 5 %, por 15 minutos em câmara úmida e duas lavagens com Tween 20, cinco minutos cada. Para a detecção das sondas, foram colocados sobre as lâminas uma mistura de 100 µl de tampão NFDM contendo 1:1000 de avidina-FITC (Fluoresceína Isotil Cianato-avidina conjugada) a 0,25 µg/ml e; 5:1000 de anti digoxigenina rodamina a 1 µg/ml; permanecendo por 1 h a 37°C, em câmara úmida. As lâminas foram então lavadas 3 vezes em Tween 20, cinco minutos cada. Em seguida a desidratação em série de etanol a 70 %, 85 % e 100 % à temperatura ambiente, 5 minutos em cada banho. Os cromossomos foram então contra corados com DAPI (0,2 µg/ml) diluído em uma solução “antifade” (Fluka).

3.2.6 Análises dos resultados

Os cromossomos foram organizados em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm) e subtelocêntricos (st), dependendo da razão de braços (LEVAN et al., 1964), e arranjados em decréscimo de tamanho nos respectivos cariótipos.

Os sinais de FISH foram visualizados de acordo com PINKEL et al. (1986) e analisados em microscópio de epifluorescência (Olympus BX50). As imagens

dos cromossomos foram capturadas usando o software Image Pro Plus – CoolSNAP-pro (Media Cybernetic).

4. RESULTADOS

Os resultados estão organizados em dois capítulos correspondentes aos artigos científicos:

Capítulo I

Nota científica “*brief report*”

Mapeamento das seqüências de rDNA 18S e 5S em *Apareiodon vittatus* e *Parodon pongoensis* (Characiformes, Parodontidae)

Capítulo II

Artigo científico “*original manuscript*”

Marcadores cromossômicos de DNAs repetitivos com enfoque na origem e diferenciação dos sistemas de cromossomos sexuais simples e múltiplo de Parodontidae

Capítulo I

Nota científica “Brief report”

4.1 Mapeamento das seqüências de rDNA 18S e 5S em *Apareiodon vittatus* e *Parodon pongoensis* (Characiformes, Parodontidae)

Resumo

Dupla hibridação *in situ* fluorescente (FISH) foram realizadas com sondas de rDNA 18S e 5S nas espécies *Apareiodon vittatus* e *Parodon pongoensis*. A espécie *A. vittatus* apresentou localização do marcador rDNA 18S em um par subtelocêntrico permitindo inferir a proximidade deste marcador cromossômico com as demais espécies de *Apareiodon*, que pode ser considerado um caráter sinapomórfico quando comparada com o grupo irmão. Por outro lado, na espécie *P. pongoensis* a localização do marcador rDNA 18S foi em um par submetacêntrico. O compartilhamento da localização do rDNA 5S em posição proximal do braço curto de um par submetacêntrico por todos Parodontidae estudados, pode ser considerado conservado na família. Ainda sítios adicionais de rDNA 18S como encontrado na espécie *Apareiodon vittatus* podem ser considerados derivados e originados por rearranjos cromossômicos ou mecanismos de dispersão de rDNAs.

Palavras chave: FISH; dispersão de sítios rDNA; Parodontidae

Em eucariotos superiores, os genes de DNA ribossomal estão organizados em duas famílias gênicas distintas (rDNA 45S e rDNA 5S). A família gênica do rDNA 45S é composta por agrupamentos de múltiplas cópias de

unidades repetidas em tandem que consistem em regiões dos genes 18S, 5.8S e 28S, separados por espaçadores transcritos (ITS1 e ITS2) e interespaçados por seqüências não transcritas (NTS) (LONG e DAVID, 1980; PENDAS et al., 1993). Por sua vez, a família do rDNA 5S compreende uma seqüência altamente conservada formada por 120 pb, interespaçadas por seqüências não transcritas (NTS) (PENDAS et al., 1994).

A família Parodontidae é um grupo de peixes neotropicais com taxonomia confusa. Esta família é formada por um grupo relativamente pequeno, sustentada por poucos e sutis caracteres morfológicos diagnósticos (PAVANELLI, 2003) com distribuição por rios de quase toda a América do Sul. É representada por três gêneros: *Parodon* Valenciennes, 1850; *Apareiodon* Eigenmann, 1916 e; *Saccodon* Kner, 1964. Análises citogenéticas em Parodontidae tem indicado um número diplóide conservado de 54 cromossomos. Entretanto, uma grande diversidade tem sido observada entre os marcadores cromossômicos de fórmula cariotípica, polimorfismos e cromossomos supranumerários, atividade das regiões organizadoras de nucléolo (Ag-RONs), número e localização de sítios de rDNA 18S e 5S, heterocromatina, localização e número de sítios do DNA satélite pPh2004, e presença ou ausência de cromossomos sexuais morfológicamente diferenciados (MOREIRA-FILHO et al., 1993; JESUS e MOREIRA-FILHO, 2000a; 2000b; VICENTE et al, 2001; CENTOFANTE et al., 2002; VICENTE et al., 2003; BELLAFRONTE et al., 2005; ROSA et al., 2006; VICARI et al., 2006).

Em relação aos DNAs ribossômicos, os sítios de rDNA 45S mostraram localização variável nas diferentes espécies de Parodontidae já estudadas (MOREIRA-FILHO et al. 1984; JESUS e MOREIRA-FILHO 2000a; 2000b;

VICENTE et al. 2001; BELLAFRONTE et al. 2005; ROSA et al. 2006; VICARI et al. 2006). Estes resultados têm sido utilizados na citotaxonomia de Parodontidae e no entendimento da dispersão deste marcador cromossômico nas diferentes espécies da família. Já a localização dos sítios de rDNA 5S sobre os cromossomos de Parodontidae tem mostrado preferencialmente apenas um par submetacêntrico de tamanho médio marcado em região proximal do braço curto (VICENTE et al 2001; CENTOFANTE et al., 2002; ROSA et al., 2006; VICARI et al. 2006; SILVA, 2009). No entanto, alguns sítios rDNA 5S adicionais no genoma de algumas espécies de Parodontidae também já foram identificados (VICENTE et al., 2001; ROSA et al., 2006).

Assim, o presente estudo tem como objetivo mapear os sítios de rDNA 18S e 5S sobre os cromossomos das espécies *Apareiodon vittatus* e *Parodon pongoensis*, discutir de forma comparativa a dispersão destes marcadores cromossômicos em relação às demais espécies de Parodontidae.

Duas espécies da família Parodontidae foram estudadas citogeneticamente: *Apareiodon vittatus*, coletados na foz do rio Jordão, município de Manguaerinha, PR e *Parodon pongoensis*, coletados no córrego Taquaralzinho, afluente do rio Araguaia, no município de Barra do Garças, MT. As metáfases mitóticas foram obtidas através do método direto descrito por BERTOLLO et al. (1978). Estes procedimentos estão de acordo com o Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Ponta Grossa (Protocolo: 04741/08 – Anexo I). Para a localização cromossômica dos sítios de rDNA 18S e 5S foi realizada a técnica de dupla FISH - fluorescent *in situ* hibridization - com sondas de rDNA 18S obtidas de *Prochilodus argenteus* (HATANAKA e GALETTI Jr., 2004) e de rDNA

5S isolada a partir de *Leporinus elongatus* (MARTINS e GALETTI, 1999). As sondas foram marcadas por reações de *nick translation*, sendo a sonda rDNA 18S marcada com biotina 16-dUTP (Roche) e a sonda de rDNA 5S marcada com digoxigenina 11-dUTP (Roche). Para o reconhecimento do sinal foram utilizados os anticorpos avidina-FITC (Sigma) e anti digoxigenina rodamina (Roche). O procedimento de hibridação seguiu o protocolo descrito por PINKEL et al. (1986), sob condição de alta estringência (2,5 ng/μL de cada sonda, 50 % de formamida deionizada, 10% sulfato dextrano, 2X SSC a 37°C por 18 horas). Os cromossomos foram contracorados com DAPI em meio de montagem Vectashield (Vector). As preparações foram analisadas em microscópio de epifluorescência Olympus BX41 acoplado a câmera CCD DP-71 (Olympus). Para a captura das imagens foi utilizado o software DP controler (Olympus).

As espécies *A. vittatus* e *P. pongoensis* estudadas citogeneticamente apresentaram o número diplóide $2n=54$ cromossomos, sem heteromorfismo de cromossomos sexuais. A utilização de sondas de rDNA 18S para a localização dos sítios de RONS sobre os cromossomos de *A. vittatus* evidenciou sítios localizados na região terminal do braço longo do par de cromossomos subtelocêntricos (par 27) em todos os espécimes analisados, a espécie *P. pongoensis* por sua vez apresentou marcações deste sítio em região terminal do braço longo de um par submetacêntrico (par 2) (Figura 1). Adicionalmente, alguns exemplares de *A. vittatus* também apresentaram sítios na região terminal de um cromossomo (par 14) submetacêntrico de tamanho médio no cariótipo (Figura 1B). Os sítios de rDNA 5S foram localizados em região proximal do braço curto de um par de cromossomos submetacêntricos de tamanho médio no cariótipo,

correspondente ao par cromossômico 9, nas duas espécies analisadas. Estas regiões de rDNA 5S foram independentes daqueles portadores dos sítios de rDNA 18S (Figura 1).

A localização das seqüências de rDNA por hibridação *in situ* fluorescente (FISH), sobre os cromossomos tem sido amplamente utilizada em inferências de diversificação dos genomas, citotaxonomia e estudos de relação de parentesco em peixes neotropicais. Na família Parodontidae os sítios de rDNA 45S, detectados por Ag-RONs e sonda de rDNA 18S, localizam-se na região telomérica do braço longo de um grande par cromossômico subtelocêntrico, em todas as espécies de *Apareiodon* já estudadas (MOREIRA-FILHO et al., 1984; MOREIRA-FILHO et al., 1985; JESUS e MOREIRA-FILHO, 2000a; ROSA et al., 2006; Vicari et al., 2006; SILVA, 2009). Por outro lado, no gênero *Parodon*, as RONS têm se mostrado como caracteres espécie específicos (JESUS e MOREIRA-FILHO, 2000b; VICENTE et al., 2001), evidenciando os sítios de rDNA 45S em cromossomos diferentes no cariótipo. Em Anostomidae, grupo irmão a Parodontidae, o sítio das RONS se localiza, na maioria das espécies, em região terminal de um par meta/submetacêntrico (GALETTI et al., 1991). Essa condição é similar ao encontrado para as espécies do gênero *Parodon*, com exceção de *P. nasus* e todas as espécies de *Apareiodon* estudadas, as quais apresentam sítios de rDNA 18S possivelmente em localização derivada para este marcador na família Parodontidae.

A ocorrência de sítios de rDNA 18S adicionais àqueles encontrados no par subtelocêntrico, como visualizado neste estudo em *A. vittatus*, também é uma condição já verificada em Parodontidae. SILVA (2009) encontrou sítios adicionais

de rDNA 45S em cariótipos de populações de *A. ibitiensis* do rio São Francisco e do alto rio Paraná. Considerando que a espécie *A. vittatus* manteve o sítio de rDNA terminal em um par de cromossomos subtelocêntricos, eventos de dispersão das RONS por transposições ou em associações com a movimentação da heterocromatina podem ter originado os sítios adicionais no genoma (MOREIRA-FILHO et al., 1984; SCHWEIZER e LOID 1987; VICARI et al., 2008). No que se refere ao rDNA 5S, a localização próxima à região centromérica de um par submetacêntrico é a mais comumente verificada entre os parodontídeos (CENTOFANTE et al., 2002; VICARI et al., 2006; SILVA, 2009), marcação que é homeóloga a encontrada em um par cromossômico da família Anostomidae (MARTINS e GALETTI Jr., 1999). Entretanto, sítios adicionais com localizações variáveis podem ocorrer em algumas espécies do gênero *Parodon*, além da provável correspondência entre os sítios de rDNA 18S e 5S com a heterocromatina GC-rica em alguns representantes da família (VICENTE et al., 2001; BELLAFRONTE et al., 2005; VICARI et al., 2006). No presente estudo, apenas o par submetacêntrico com sítios rDNA 5S em posição proximal do braço curto foi visualizado em *A. vittatus* e *P. pongoensis*, demonstrando ser esse marcador compartilhado entre as duas espécies de Parodontidae estudadas citogeneticamente. Ainda, apesar da localização das famílias de rDNA 18S e 5S serem cromossomo independente na maioria dos Parodontidae, em *P. nasus* estas seqüências são sintênicas (BELLAFRONTE et al., 2005). Neste estudo, a dupla FISH com sondas rDNA 18S e 5S também evidencia a distribuição independente para este marcador nas espécies *A. vittatus* e *P. pongoensis*. Diante destes dados, é possível inferir que a sintenia rDNA 18S e 5S é um caráter

apomórfico para *P. nasus* gerada por um evento de rearranjo cromossômico do tipo translocação não-robertsoniana.

Diante dos resultados encontrados, verificou-se que a espécie *P. pongoensis* apresentou marcações de rDNA 18S em um par submetacêntrico, entretanto *A. vittatus* assim como todas as outras espécies de *Apareiodon* possuem o sítio do rDNA 18S no par subtelocêntrico, inferindo-se que esta localização pode ser considerada sinapomórfica para a família quando comparada ao grupo irmão. É constatado também que todas as espécies de Parodontidae analisadas citogeneticamente apresentam o rDNA 5S localizado na região proximal do braço curto de um par submetacêntrico, o qual pode ser considerado conservado na família. Ainda, sítios adicionais de rDNA 18S ou 5S e localizações diferentes destas relatadas acima podem ser considerados derivados e originadas por rearranjos cromossômicos ou mecanismos de dispersão dos rDNAs.

Agradecimentos

Os autores são gratos ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA/MMA/SISBIO nº: 15117). Este trabalho teve apoio financeiro do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico Processo: 473448/2007-6), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e Fundação Araucária (Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná, Processo: 12938). Somos gratos também ao Sr. Miguel Airton Carvalho pela assistência nas atividades de campo e laboratório.

Referências

As referências bibliográficas encontram-se no final desta dissertação.

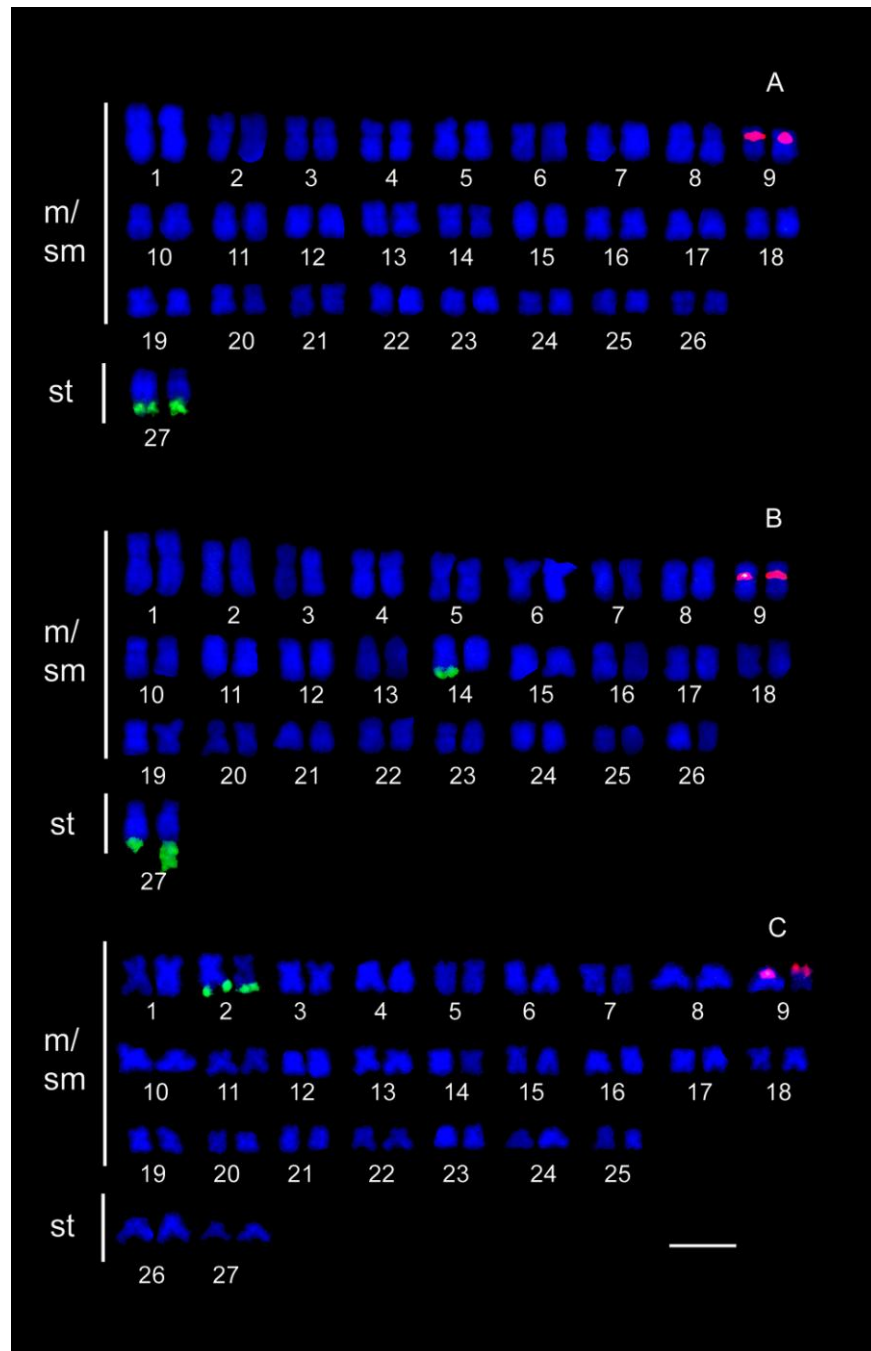


Figura 1: Metáfases cromossômicas das espécies *Apareiodon vittatus* (A, B) e *Parodon pongoensis* (C) submetidas à dupla FISH com sondas de rDNA 18S (sítios em verde) e 5S (sítios em vermelho). Barra = 5 μm.

Capítulo II

Artigo científico “original manuscript”

4.2 Marcadores cromossômicos de DNAs repetitivos com enfoque na origem e diferenciação dos sistemas de cromossomos sexuais simples e múltiplo de Parodontidae

Resumo

A família Parodontidae apresenta espécies homomórficas em relação ao sexo enquanto outras com sistema cromossômicos sexuais dos tipos ZZ/ZW heteromórficos e ZZ/ZW₁W₂. Neste estudo foi isolada uma sonda do cromossomo W da espécie *Apareiodon* sp. (denominada WAp) por microdissecção. Em seguida foi realizada a localização *in situ* nos cromossomos juntamente com a sonda do DNA satélite pPh2004 em diferentes espécies da família Parodontidae. Os resultados demonstraram que o sistema de cromossomos sexuais simples ZZ/ZW podem ter se originado por uma inversão paracêntrica de um sítio terminal da sonda WAp para a região proximal do braço curto de um par cromossômico metacêntrico e, posterior amplificação desta seqüência levando a diferenciação do cromossomo sexual W em algumas espécies. Ainda, o mapeamento em conjunto dos DNAs repetitivos WAp e satélite pPh2004 permitiram sugerir que o sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW₁W₂ de *A. affinis* pode ter apresentado origem a partir do sistema ZW encontrado em um cariótipo ancestral similar ao verificado em *P. hilarii*. A dispersão dos marcadores cromossômicos de fórmula cariotípica e rDNA 5S e 18S também é discutida. Esses resultados podem ser úteis no entendimento da diversificação dos genomas de espécies de

Parodontidae e contribuir com o agrupamento filogenético de seus representantes.

Palavras chave: evolução cariotípica; sonda WAp; microdissecção cromossômica; DNA repetitivo; DOP-PCR.

Introdução

A família Parodontidae é um grupo de peixes neotropicais relativamente pequeno e com taxonomia confusa, sustentada por poucos e sutis caracteres morfológicos diagnósticos (PAVANELLI, 2003). É representada por três gêneros: *Parodon* Valenciennes, 1850; *Apareiodon* Eigenmann, 1916 e; *Saccodon* Kner, 1964. PAVANELLI e BRITSKI (2003) reconheceram 21 espécies válidas para a família. Posteriormente, outras duas espécies foram descritas com base em caracteres morfológicos e cromossômicos, *Parodon moreirai* (INGENITO e BUCKUP, 2005) e *Apareiodon vladii* (PAVANELLI, 2006). Paralelamente a estas recentes descrições, novos questionamentos surgiram quanto à sistemática dessa família diante da falta de caracteres diagnósticos fortes para um correto agrupamento filogenético de seus representantes. Ainda, uma análise para caracteres osteológicos e morfológicos em Parodontidae, utilizando o método cladístico de parcimônia, considerou o gênero *Apareiodon* sinônimo júnior de *Parodon* (INGENITO, 2008). Dessa forma, com a análise filogenética deste grupo não encontrando evidências filogenéticas que sustentassem a separação cladística destes dois gêneros, *Parodon*, em sua nova delimitação, seria

sustentado por pelo menos nove sinapomorfias exclusivas dentro de Parodontidae (INGENITO, 2008).

Análises citogenéticas em Parodontidae tem indicado um número diplóide conservado de 54 cromossomos. Entretanto, tem sido observado polimorfismos, presença de cromossomos supranumerários em algumas espécies, diversidade na fórmula cariotípica, variação no número e localização de sítios de rDNA 18S e 5S, diferenças no padrão de heterocromatina e na localização e número de sítios do DNA satélite pPh2004, e presença/ausência de cromossomos sexuais morfologicamente diferenciados (MOREIRA-FILHO et al., 1993; JESUS e MOREIRA-FILHO, 2000a; 2000b; VICENTE et al., 2001; CENTOFANTE et al., 2002; VICENTE et al., 2003; BELLAFRONTE et al., 2005; ROSA et al., 2006; VICARI et al., 2006). Embora a maior parte das espécies estudadas na família sejam cromossomicamente homomórfica em relação ao sexo, dois sistemas distintos de cromossomos sexuais heteromórficos foram descritos em Parodontidae: (1) sistema de cromossomos sexuais múltiplo do tipo ZZ/ZW₁W₂ em *Apareiodon affinis* (MOREIRA-FILHO et al., 1980) e (2) sistema simples do tipo ZZ/ZW para *Parodon hilarii* (MOREIRA-FILHO et al., 1993), *P. moreirai* (citado como *Parodon* sp. por CENTOFANTE et al., 2002), *Apareiodon vladii* (citado como *Apareiodon* sp. por ROSA et al., 2006), *Apareiodon* sp. da bacia do alto rio Tibagi, PR (VICARI et al., 2006) e *A. ibitiensis* (SILVA, 2009). VICARI et al. (2006) consideram uma provável origem comum para os cromossomos sexuais diferenciados em Parodontidae e que a atual separação dos gêneros *Parodon* e *Apareiodon* poderia não constituir um agrupamento natural.

Marcadores cromossômicos têm sido ferramentas úteis em inferências filogenéticas em Parodontidae, auxiliando inclusive a descrição de espécies (INGENITO e BUCKUP, 2005; PAVANELLI, 2006). Em peixes, além da localização física das seqüências de rDNA sobre os cromossomos por hibridação *in situ* fluorescente (FISH), mais recentemente, o mapeamento de seqüências de DNA satélite em gêneros ou famílias têm sido utilizado para compreender relações de parentesco (SAITO et al., 2007; VICARI et al., 2008; KANTEK et al., 2009). Entre os Parodontidae, o DNA satélite pPh2004, isolado de *Parodon hilarii* por VICENTE et al. (2003), foi localizado por FISH sobre os cromossomos de *P. hilarii*, *P. moreirai*, *P. nasus*, *P. pongoensis* e *A. affinis* e, ausente em *A. piracicabae*, *A. vitattus*, *A. ibitiensis*, *A. vladii* e *Apareiodon* sp. (SILVA, 2009). Diante destes dados, SILVA (2009) inferiu que as espécies que compartilham o DNA satélite pPh2004 são mais estritamente relacionadas em relação aos demais Parodontidae.

Diante deste cenário, este trabalho teve por objetivo obter uma sonda da fração heterocromática do cromossomo W de Parodontidae (*Apareiodon* sp.), mapeá-la sobre os cromossomos das espécies da família e utilizá-los em conjunto com marcadores cromossômicos já disponíveis, propondo aspectos evolutivos da diversificação cariotípica bem como evolução dos cromossomos sexuais neste grupo de peixes.

Material e métodos

Espécies analisadas e preparações cromossômicas

Para este estudo foram utilizadas preparações cromossômicas de 10 diferentes taxa da família Parodontidae: *Apareiodon* sp., *A. ibitiensis*, *A. vladii*, *A. piracicabae*, *A. vittatus*, *A. affinis*, *P. hilarii*, *P. moreirai*, *P. nasus* e *P. pongoensis* (Tabela I).

As preparações cromossômicas foram obtidas das células do rim anterior usando o procedimento de “air drying” (BERTOLO et al., 1978) ou por cultura celular segundo FENOCHIO et al. (1991). As preparações cromossômicas foram submetidas à coloração convencional por Giemsa para a determinação do número diplóide, fórmula cromossômica, heteromorfismo de cromossomos sexuais e posterior utilização em ensaios de hibridação *in situ* fluorescente.

Obtenção das sondas de DNAs repetitivos para a FISH

Essencialmente, foram utilizadas duas sondas de DNA repetitivos para mapeamento destas regiões sobre os cromossomos das espécies de Parodontidae: (1) a sonda do DNA satélite pPh2004, isolada a partir do DNA genômico de *P. hilarii* (VICENTE et al., 2003) e (2) a sonda da fração heterocromática do cromossomo W de *Apareiodon* sp., isolada neste trabalho pelo método de microdissecção de cromossomos submetidos ao bandamento C (VICARI et al., submetido), aqui denominada de sonda WAp.

Microdissecção do cromossomo W de Apareiodon sp. e reação de DOP-PCR

Cromossomos W de fêmeas de *Apareiodon* sp. foram microdissectados a partir de metáfases submetidas ao bandamento C para a identificação precisa do cromossomo e obtenção apenas da fração heterocromática. As microdissecções cromossômicas foram realizadas em microscópio invertido IX51 (Olympus) equipado com micromanipulador mecânico Transferrman (Eppendorf). Para a microdissecção foram utilizados capilares de vidro de diâmetro de aproximadamente 0,7 μm , os quais foram preparados utilizando o micropipette puller (Narishige). Foram microdissectados 12 cromossomos W de *Apareiodon* sp. previamente submetidos ao bandamento C.

Os fragmentos de cromossomos foram transferidos para um microtubo e utilizados na reação de “Degenerated Oligonucleotide Primer – Polymerase Chain Reaction” (DOP-PCR). As reações de DOP-PCR seguiram o procedimento geral descrito por TELENIUS et al. (1992), com algumas modificações. A reação de polimerização consistiu de tampão 1x (*ThermoSequenase* – GE healthcare), 400 μM de dNTP, 2 μM do primer DOP– 5' CCGACTCGAGNNNNNNATGTGG - 3'. As reações de PCR foram realizadas em termociclador Biocycler Gradient System (Biosystems ®). O microtubo foi aquecido a 95°C por 10 min., seguido da adição de 10 U de *ThermoSequenase*. A primeira amplificação é realizada via RAMP-PCR: 3 min. a 94°C; 12 ciclos de baixa estrigência (1 min. e 30 s a 94°C, 2 min. a 32°C aumentando 0,2°C/s até 72°C e 2 min. a 72°C), seguidos por 30 ciclos de alta estrigência (1 min. e 30 s a 94°C, 1 min. e 30 s a 52°C e 1 min. e 30 s a 72°C). Os produtos obtidos foram corridos em gel de agarose 1%, onde o tamanho esperado foi corresponde a um arrasto entre 100 – 600pb.

A segunda reação de amplificação foi feita com 2 µl do primeiro produto de PCR realizando-se uma nova reação de amplificação num volume final de 50 µl. A reação foi composta de tampão 1X da *Taq* polimerase (Invitrogen); 2 mM MgCl₂; 400 µM de dNTP, 2 µM de primer DOP = 5'-CCGACTCGAGNNNNNNATGTGG-3' e 2 U de *Taq* polimerase. As reações de polimerização foram constituídas por: 3min a 94°C; 35 ciclos de 1 min. e 30 s a 90°C, 1 min. e 30 s a 52°C e 1 min. e 30 s a 72°C.

Hibridação in situ fluorescente (FISH)

Foram realizadas FISH nos representantes da família Parodontidae analisados utilizando as sondas do DNA satélite pPh2004 e do cromossomo W de *Apareiodon* sp., denominada sonda WAp. A sonda pPh2004 foi marcada com biotina pela técnica de *nick translation*, utilizando o composto biotina 16 - dUTP (Nick Translation Biotin - Roche). A sonda WAp foi marcada em reação de DOP-PCR utilizando o nucleotídeo modificado digoxigenina 11-dUTP (Roche). A reação da PCR consistiu de: tampão 1X da *Taq* polimerase (Invitrogen), 2 mM MgCl₂, 400 µM dATP, dGTP e dCTP, 280 µM de dTTP, 120 µM de dUTP 11- digoxigenina, 2 µM DOP primer e 2 U de *Taq* polimerase. O procedimento geral da FISH sob alta condição de estringência (2,5 ng/µL sonda, 50 % formamida, 2X SSC, 10 % sulfato dextrano) seguiu o procedimento geral descrito por PINKEL et al. (1986). A detecção do sinal foi realizada com os anticorpos Avidina FITC (Sigma) e anti digoxigenina rodamina (Roche). Os cromossomos foram contracolorados com DAPI (0,2 µg/mL) em meio de montagem Vectashield (Vector), e analisados em

microscópio de epifluorescência Olympus BX41 acoplado ao sistema de captura de Imagens DP 71 (Olympus).

Os cromossomos foram organizados em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm) e subtelocêntricos (st), dependendo da razão de braços (LEVAN et al., 1964), e arranjados em decréscimo de tamanho nos respectivos cariótipos.

Resultados

A análise citogenética das 10 espécies da família Parodontidae (*Apareiodon* sp., *A. ibitiensis*, *A. vladii*, *A. piracicabae*, *A. vittatus*, *A. affinis*, *P. hilarii*, *P. moreirai*, *P. nasus* e *P. pongoensis*) mostrou um número diplóide conservado de $2n=54$ cromossomos, no entanto, foram observadas fórmulas cromossômicas diferenciadas, principalmente em relação ao número de pares cromossômicos subtelocêntricos (Tabela II). A análise convencional dos cariótipos permitiu evidenciar a ocorrência de heteromorfismo de cromossomos sexuais com heterogametia feminina do tipo ZZ/ZW nas espécies *Apareiodon* sp., *A. ibitiensis*, *A. vladii*, *P. hilarii* e *P. moreirai*. Ainda, um sistema de cromossomos sexuais múltiplo do tipo ZZ/ZW₁W₂ foi visualizado na espécie *A. affinis*, onde os machos apresentam $2n=54$ e as fêmeas $2n=55$ cromossomos (Tabela II). A análise convencional não evidenciou heteromorfismo de cromossomos sexuais nas espécies *A. piracicabae*, *A. vittatus*, *P. nasus* e *P. pongoensis* (Tabela II). A localização e número dos sítios de rDNA 18S e 5S nas espécies de Parodontidae

estudadas foram baseados nos dados disponíveis na literatura e estão sumarizados na Tabela II.

A reação de DOP-PCR a partir dos cromossomos W de *Apareiodon* sp. submetidos ao bandamento C evidenciou um arrasto em gel de agarose entre 100 a 500 pb, com uma intensidade maior na região de 250 pb. A utilização desta sonda WAp localizou sítios positivos em regiões terminais de alguns cromossomos dos cariótipos de todas as espécies estudadas (Figuras 1 e 2). Na espécie *A. piracicabae*, além dos vários sítios terminais nos cromossomos a sonda WAp foi localizada interespaçada aos sítios de RONS (par cromossômico 27) (Figura 1A). Em *A. vittatus* somente sítios WAp terminais aos cromossomos foram mapeados (Figura 1B). *A. affinis* evidenciou um sítio intersticial no braço longo e sítios terminais em ambos os braços do cromossomo Z, marcações nos cromossomos W₁ e W₂, além dos vários sítios terminais em autossomos (Figura 1C, 1D, 4C, 4D). Além dos sítios terminais, machos das espécies *Apareiodon* sp., *A. ibitiensis*, *A. vladii*, *P. hilarii*, *P. moreirai*, *P. nasus* e *P. pongoensis* submetidos à FISH com sonda WAp evidenciou um sítio terminal e um proximal ao braço curto de um par de cromossomos metacêntricos, correspondente ao par 13. Por sua vez, nas fêmeas de *Apareiodon* sp., *A. ibitiensis*, *A. vladii*, *P. hilarii* e *P. moreirai*, este par cromossômico foi heteromórfico, evidenciando um sítio terminal e um proximal ao braço curto do cromossomo Z e, sítios WAp também no braço longo de cromossomo W (Figura 2). As fêmeas de *P. nasus* e *P. pongoensis* não apresentaram heteromorfismo do par cromossômico metacêntrico portador de sítios WAp em região proximal (Figura 2G, 2H respectivamente). A FISH com sonda WAp evidenciou também que a espécie *P. hilarii* possui o cromossomo W

com maior acúmulo de seqüências deste DNA repetitivo, seguido pelas espécies *P. moreirai*, *Apareiodon* sp., *A. vladii* e *A. ibitiensis* (Figura 2).

A análise da composição e alinhamento da família de DNA satélite pPh2004 identificou uma seqüência monomérica de 200pb, 60% rico em bases AT com identidade molecular e alinhamento parcial de 87% com cromossomo X de *Homo sapiens*, 92% com BAC de grupos de ligação do Zebrafish e 100% com clone de cromossomo X de *Mus musculus* (Anexo II). O mapeamento dos sítios pPh2004 sobre os cromossomos evidenciou que este DNA satélite é compartilhado pelas espécies *A. affinis*, *P. hilarii*, *P. moreirai*, *P. nasus* e *P. pongoensis* (Figura 3). Na espécie *A. affinis* foram localizados sítios pPh2004 em um par metacêntrico com marcações terminais em ambos os braços (par 2), além de outro par metacêntrico com marcação terminal no braço longo (par 13) (Figura 3A, 3B, 4C, 4D). A espécie *P. hilarii* mostrou marcações na região terminal do braço curto do cromossomo W, na região terminal do braço longo do cromossomo Z, além de 14 a 16 marcações terminais em autossomos (Figura 3C). Em *P. moreirai*, os sítios pPh2004 foram localizados na região terminal do braço curto do cromossomo W, na região terminal do braço longo do cromossomo Z, além da ocorrência adicional de um par autossômico submetacêntrico portando estes sítios na região terminal do braço longo (par 9) (Figura 3D). Na espécie *P. nasus* foram observadas marcações em quatro pares de cromossomos, todos com marcações terminais no braço longo (Figura 3E). Por sua vez, *P. pongoensis* mostrou apenas um par metacêntrico com marcações pPh2004 em região terminal do braço longo (par 13) (Figura 3F).

A dupla FISH com sondas pPh2004 e WAp sobre os cromossomos de *P. nasus* e *P. pongoensis* mostrou que o par metacêntrico (par 13) portador dos sítios WAp em posição terminal e proximal do braço curto, também possui sítios pPh2004 em região terminal do braço longo (Figura 4 A, 4B).

Discussão

Nos Parodontidae, a validade taxonômica dos gêneros *Parodon* e *Apareidon* têm sido amplamente questionadas na última década devido à falta de evidências filogenéticas que sustentem a separação dos gêneros (PAVANELLI e BRITSKI, 2003, VICARI et al., 2006; INGENITO, 2008). Em seu estudo, INGENITO (2008) propõe *Apareiodon* sendo sinônimo júnior de *Parodon* e relata também que a utilização da ocorrência de dentes mandibulares não é um caráter robusto para diagnosticar grupos monofiléticos em Parodontidae, visto que a análise de outros caracteres morfológicos não corroboram com as inferências obtidas pela análise de dentes. Além disto, em *P. davisii*, *P. ibitiensis*, *P. moreirai*, *P. tigrinus* e *Parodon* sp. este caráter varia intra-especificamente.

Estudos citogenéticos demonstram que a família Parodontidae apresenta um número diplóide conservado de $2n=54$ cromossomos. No entanto, a utilização de marcadores cromossômicos tem demonstrado uma enorme diversidade citogenética para as espécies desta família, possibilitando inferir sobre a diversificação dos genomas e agrupamento filogenético (VICARI et al., 2006; SILVA, 2009). Neste estudo, todas as espécies mostraram número cromossômico basal $2n=54$, no entanto, variações nas fórmulas cromossômicas puderam ser

detectadas (Tabela II). Esta diversidade de fórmulas cromossômicas é atribuída à razão entre o número de cromossomos do tipo meta ou submetacêntrico em relação aos subtelocêntricos, os quais variam de 48 m-sm/6st em *P. nasus* e *Apareiodon* sp., a 54 m-sm em *P. hilarii* e *P. moreirai*. Essa variação de fórmula cromossômica pode ser explicada por rearranjos não-robertsonianos nos cariótipos. Grupos irmão a Parodontidae, tais como Anostomidae e Chilodontidae apresentam $2n=54$ cromossomos meta/submetacêntrico (GALETTI et al., 1981; MARTINS et al., 2000), além de, na maioria das vezes, a posição das RONS estar presente em região terminal de um único par meta/submetacêntrico (GALETTI et al., 1991). Considerando estas condições basais, as espécies *P. hilarii* e *P. moreirai* teriam as fórmulas cromossômicas 54 meta/submetacêntrico e a localização do sítio de rDNA 18S em maior proximidade com as dos grupos irmão.

Diante deste cenário, o rearranjo estrutural alocando o sítio de RON em posição terminal de um par subtelocêntrico em todas as espécies de *Apareiodon* analisadas foi um evento cariotípico importante na diferenciação da fórmula cromossômica e posição da RON. Além deste, eventos estruturais em outros pares cromossômicos estariam diversificando as fórmulas cromossômicas na família Parodontidae. Ainda, a presença de sítios de rDNA 18S adicionais em *A. ibitiensis* e *A. vittatus* também são condições derivadas (SILVA, 2009). No entanto, é importante destacar a característica saltatória do rDNA 45S e seus mecanismos de heteromorfismo por *crossing-over* desigual e/ou rearranjos cromossômicos (GOLD, 1980; VICARI et al., 2006). Desta forma, o caráter de localização do sítio de rDNA 45S pode ter evolução independente, e alguns cuidados são necessários para as inferências de proximidade filogenética.

O sítio rDNA 5S é encontrado preferencialmente em região intersticial do braço curto de um par submetacêntrico em Parodontidae (VICENTE, et al., 2001; CENTOFANTE et al., 2002; ROSA et al., 2006; VICARI et al., 2006; SILVA, 2009). Este cromossomo se mostra similar ao encontrado em Anostomidae (MARTINS, et al., 1999) sugerindo ser altamente conservado em relação ao ancestral comum. *Parodon nasus* é a única espécie a apresentar sintonia dos sítios rDNA 18S e 5S (BELLAFRONTTE et al., 2005). Este evento pode ter ocorrido por translocação envolvendo o par submetacêntrico portador do rDNA 18S em *Parodon* em posição terminal e o par submetacêntrico portador do rDNA 5S, sendo uma condição exclusiva da espécie.

Estudos de citogenética convencional tem demonstrado a ocorrência de heteromorfismo de cromossomos sexuais ZZ/ZW em *P. hilarii*, *P. moreirai*, *Apareiodon* sp., *A. vladii* e *A. ibitiensis*, além do sistema múltiplo ZZ/ZW₁W₂ em *A. affinis* (MOREIRA-FILHO et al., 1993; JESUS e MOREIRA-FILHO, 2000; CENTOFANTE et al., 2002; VICENTE et al., 2003; ROSA et al., 2006; VICARI et al. 2006, SILVA, 2009). Assim, enquanto em algumas espécies de *Parodon* e *Apareiodon* não há nenhum heteromorfismo de cromossomos sexuais aparente entre os sexos, as espécies que apresentam cromossomos sexuais diferenciados poderiam estar mais relacionadas filogeneticamente. Diante destas condições VICARI et al. (2006) já consideravam que o sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW presentes em espécies de *Parodon* e *Apareiodon* teriam uma origem comum e, a separação dos gêneros *Parodon* e *Apareiodon*, em sua atual delimitação, não poderia refletir uma condição natural.

A obtenção da sonda WAp e seu mapeamento sobre os cromossomos das espécies de Parodontidae evidenciou sítios terminais de alguns cromossomos em todas as espécies estudadas. Dessa forma, é possível inferir que o cromossomo sexual W de *Apareiodon* sp. detém DNAs repetitivos não exclusivos dos cromossomos sexuais. STEINEMANN e STEINEMANN (2005) propuseram a hipótese de origem e diversificação de cromossomos sexuais a partir do acúmulo de retroelementos em regiões não recombinantes. No entanto, outros autores consideram que o heteromorfismo de cromossomos sexuais é gerado por acúmulo ou amplificação de DNAs repetitivos em tandem (REED e PHILLIPS, 1997; DEVLIN et al., 1998; ARTONI e BERTOLLO, 2002). Em Parodontidae, duas hipóteses podem ser consideradas para origem do DNA repetitivo WAp: (1) ser derivado de famílias de DNA repetitivo disperso, ou ainda (2) compor uma classe de DNA satélite. Na hipótese de Müller para origem de cromossomos sexuais XY a degeneração do Y é a consequência de sua permanente heterozigosidade (MÜLLER, 1932). A degeneração do Y é caracterizada por dois principais fenômenos: (1) a mudança de regiões eucromáticas em estrutura de heterocromatina, e (2) a erosão da atividade gênica do Y. Por sua vez, na grande maioria dos sistemas de cromossomos sexuais ZW, o cromossomo heteromórfico W sofre modificações de acúmulo de seqüências heterocromáticas e erosão da atividade gênica.

Nas espécies estudadas *P. hilarii*, *P. moreirai*, *Apareiodon* sp., *A. vladii* e *A. ibitiensis* a presença de sítios WAp em região proximal do braço curto de um par metacêntrico em machos, e em fêmeas este sítio apresentar um heteromorfismo de tamanho desta região para o mesmo par cromossômico, está

de acordo com o acúmulo de seqüências repetitivas para a derivação do cromossomo W de Parodontidae (CENTOFANTE et al., 2002; VICENTE et al., 2003; ROSA et al., 2006; VICARI et al., 2006). Ainda, a seqüência WAp também foi verificada na mesma região do par cromossomo metacêntrico em *P. nasus* e *P. pongoensis*, porém sem nenhum heteromorfismo de tamanho aparente entre machos e fêmeas nestas espécies. Por sua vez, *A. piracicabae* e *A. vittatus* não apresentaram sítios WAp em região proximal de cromossomos metacêntricos.

Diante destes dados, pode-se propor inferências evolutivas para explicar a origem do sistema de determinação sexual em Parodontidae. Assim, a ocorrência somente de sítios WAp terminais, como visualizado em *A. piracicabae* e *A. vittatus*, pode representar a condição plesiomórfica para o caractere. Deste modo, um mecanismo de inversão paracêntrica poderia rearranjar sítios WAp na posição proximal do braço curto do par cromossômico metacêntrico correspondente ao cromossomo Z (proto cromossomo sexual) (Figura 5). A amplificação deste sítio WAp proximal poderia ter originado os cromossomos sexuais W das espécies *P. hilarii*, *P. moreirai*, *Apareiodon* sp., *A. vladii* e *A. ibitiensis* (Figura 6). Em outros casos, como em *P. nasus* e *P. pongoensis* esses sítios WAp permaneceriam em condição homomórfica, sendo imperceptível a visualização dos cromossomos sexuais com a citogenética convencional (Figura 5).

Com relação à proposta de origem do sistema sexual ZZ/ZW₁W₂ em *A. affinis*, MOREIRA-FILHO et al. (1993) consideraram a origem deste através de um processo de fissão cêntrica do primeiro par metacêntrico seguido de uma inversão pericêntrica, originando os cromossomos W₁ e W₂ de fêmeas, em condição

independente do sistema de cromossomos sexuais simples. Em muitas espécies de invertebrados como por exemplo coleóptera e gafanhoto, onde há uma diversificação de sistemas de cromossomos sexuais, as ocorrências de sistemas múltiplos são obrigatoriamente derivados de sistemas de cromossomos sexuais simples (WHITE, 1973; SMITH e VIRKK, 1978; SCHNEIDER et. al., 2006). Diante da evidência de sítios sonda WAp nos cromossomos sexuais Z, W₁ e W₂ de *A. affinis*, é possível inferir a ocorrência de rearranjos cromossômicos para a origem do sistema múltiplo a partir do sistema de cromossomos sexual ZZ/ZW verificado em outros Parodontidae.

A classe de DNA satélite pPh2004 é compartilhada pelas espécies *P. hilarii*, *P. moreirai*, *P. nasus*, *P. pongoensis* e *A. affinis*, corroborando a hipótese de SILVA (2009) que estas espécies são mais estritamente relacionadas em relação aos demais *Apareiodon*. A origem deste caráter pode ser postulada posterior aos cromossomos sexuais devido sua ausência em *Apareiodon* sp., *A. vladii*, *A. ibitiensis* e *A. piracicabae*. Todas as espécies analisadas sob este aspecto apresentam marcações do DNA satélite pPh2004 em regiões terminais no braço longo de um par metacêntrico comparável, sendo este correspondente ao cromossomo Z nas espécies portadoras de sistema de cromossomos sexuais simples, sugerindo a origem deste DNA satélite neste par cromossômico. São evidências para esta afirmação: *P. pongoensis* é a única espécie a apresentar apenas este par cromossômico com o DNA satélite localizado; ainda, em todas as espécies portadoras de pPh2004, a exceção de *A. affinis*, o mesmo par cromossômico apresenta sítios WAp em sítio proximal e terminal do braço cromossômico oposto.

Diante dos resultados obtidos pelos marcadores pPh2004 e WAp nos cromossomos das espécies *P. hilarii*, *P. moreirai*, *P. nasus*, *P. pongoensis* e *A. affinis* é possível hipotetizar que o sistema de cromossomos sexuais múltiplos ZZ/ZW₁W₂ de *A. affinis* deve ter origem por translocação cromossômica entre os elementos cromossômicos de um par autossômico grande portador de sítios WAp terminal, possivelmente o primeiro par do cariótipo, e o cromossomos sexuais Z e W portadores de sítios pPh2004 e WAp, a partir de uma forma ancestral semelhante à encontrada em *P. hilarii* (Figura 7). Somente nestas duas espécies, o satélite pPh2004 é encontrado também em um par metacêntrico homeólogo com marcações em ambos os telômeros (par cromossômico 2), tornando-as estritamente relacionadas. Nesse modelo, uma translocação recíproca entre os cromossomos autossômicos e os cromossomos sexuais originaria um par de cromossomos portadores de sítios de DNA satélite pPh2004 na região terminal, sendo correspondente ao par 13 metacêntrico de *A. affinis*, e o outro par corresponderiam aos cromossomos Z e W sem a presença de seqüências de DNA satélite pPh2004. Este W ancestral por sua vez sofreria rearranjos do tipo fissão cêntrica, seguido de inversão pericêntrica originando os cromossomos W₁ e W₂, como proposto por MOREIRA-FILHO et al. (1993), porém de acordo com a origem de sistemas múltiplos a partir de sistemas simples (WHITE, 1973; SMITH e VIRKK, 1978; SCHNEIDER et al., 2006).

A amplificação e movimento de DNA satélite nos cromossomos é um fato bem documentado em alguns organismos (HAMILTON et al., 1990; MODI, 1993) e suspeita-se que estes eventos exerçam um papel importante na evolução cariotípica (WICHMAN et al., 1991; HAMILTON, 1992; YANG et al., 1997;

GARAGNA et al. 2001). LI et al. (2000) demonstraram que dois DNAs satélites do genoma do cervo muntjac estão envolvidos com fusões em tandem dos cromossomos, resultando numa drástica redução do número diplóide. Este e outros estudos estão de acordo com a hipótese de WICHMAN et al. (1991), que sugere que o movimento intragenômico de seqüências repetitivas pode promover ou acelerar a evolução cromossômica. Em Parodontidae, a distribuição e expansão do DNA satélite pPh2004 também parece exercer papel fundamental na diversificação dos cromossomos, porém, este DNA satélite, embora presente no cromossomo sexual de algumas espécies, não esteja envolvido com quebras ou com a diferenciação dos cromossomos sexuais Z e W, fato este atribuído ao DNA repetitivo denominado WAp.

Os resultados deste estudo apresentam novas hipóteses para a origem e diversificação de caracteres cromossômicos na família Parodontidae. A obtenção e localização in situ da sonda WAp permitiu evidenciar uma possível origem dos cromossomos sexuais por um evento de inversão de seqüências WAp para a região proximal do braço curto de um par metacêntrico, seguido de acúmulo destas seqüências na origem do cromossomo W heteromórfico. O mapeamento desta seqüência em conjunto com o DNA satélite pPh2004 nos cromossomos de Parodontidae propiciou também inferências de relacionamento filogenético na família e origem do sistema de cromossomos sexuais múltiplo ZZ/ZW₁W₂ de *A. affinis*. Estas análises demonstram que os DNAs repetitivos WAp e pPh2004 propiciam uma intensa diversificação cariotípica em Parodontidae.

Agradecimentos

Os autores são gratos ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA/MMA/SISBIO nº: 15117). Este trabalho teve apoio financeiro do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico Processo: 473448/2007-6), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e Fundação Araucária (Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná, Processo: 12938). Somos gratos também ao Sr. Miguel Ailton Carvalho pela assistência nas atividades de campo e laboratório.

Referências

As referências bibliográficas encontram-se no final desta dissertação.

Tabela I: Pontos de amostragem, distribuição nas bacias e número de espécies estudadas da família Parodontidae.

Espécies (Família Parodontidae)	Ponto de amostragem	Bacia hidrográfica	Nº de machos	Nº de fêmeas	Total
<i>Apareiodon affinis</i>	Rio Passa-Cinco (SP)	Alto Paraná	2	3	5
<i>Apareiodon ibitiensis</i>	Rio Piumhi (MG)	São Francisco	1	2	3
<i>Apareiodon piracicabae</i>	Rio Piquiri (PR)	Alto Paraná	4	2	6
<i>Apareiodon piracicabae</i>	Rio Piumhi (MG)	São Francisco	3	1	2
<i>Apareiodon</i> sp.	Rio Tibagi (PR)	Alto Paraná	19	27	46
<i>Apareiodon vittatus</i>	Rio Jordão (PR)	Iguaçu	2	2	4
<i>Apareiodon vladii</i>	Rio Piquiri (PR)	Alto Paraná	13	19	32
<i>Parodon hilarii</i>	Córrego do Porta (MG)	São Francisco	11	14	25
<i>Parodon moreirai</i>	Córrego Paiol Grande (SP)	Alto Paraná	9	7	16
<i>Parodon nasus</i>	Rio Paraguai (MT)	Paraguai	1	1	2
<i>Parodon nasus</i>	Rio Passa-Cinco (SP)	Alto Paraná	1	1	2
<i>Parodon pongoensis</i>	Rio Taquaralzinho (MT)	Araguaia	1	1	2

Tabela II: Marcadores cromossômicos em espécies da família Parodontidae

Espécies (Família Parodontidae)	Local	2n		Fórmula Cromossômica		Sistema sexual	Sítio WAp terminal	Sítio WAp intersticial	DNA satélite pPh2004	Sítio 18S	Sítio 5S	Referências
		macho	fêmea	macho	fêmea							
<i>Apareiodon affinis</i>	Rio Passa-Cinco (SP)	54	55	50m/sm, 4st	51m/sm, 4st	ZZ/ZW ₁ W ₂	Presente	Presente nos cromossomos Z, W ₁ e W ₂	1 par m em ambas regiões terminais e na região terminal de um par m	Região terminal 1 par st	Região pericentromérica de 1 par m	1,2,3,4, 5,13 e PE
<i>Apareiodon ibitiensis</i>	Rio Piumhi (MG)	54	54	50 m/sm, 4st	50 m/sm, 4st	ZZ/ZW	Presente	Presente nos cromossomos sexuais Z e W	Ausente	Região terminal 1 par st mais sítios adicionais	Região pericentromérica de 1 par m	13 e PE
<i>Apareiodon</i> sp.	Rio Verde (PR)	54	54	48 m/sm, 6st	47 m/sm, 7st	ZZ/ZW	Presente	Presente nos cromossomos sexuais Z e W	Ausente	Região terminal 1 par st	Região pericentromérica de 1 par m	7 e PE
<i>Apareiodon vladii</i> (citado como <i>Apareiodon</i> sp.)	Rio Piquiri (PR)	54	54	50m/sm, 4st	50m/sm, 4st	ZZ/ZW	Presente	Presente nos cromossomos sexuais Z e W	Ausente	Região terminal 1 par st	Região pericentromérica de 1 par m, mais sítios adicionais	8 e PE
<i>Parodon hilarii</i>	Rio Porta (MG)	54	54	54m/sm	53m/sm, 1st	ZZ/ZW	Presente	Presente nos cromossomos sexuais Z e W	10 sítios em região terminal, 1 par m em ambas regiões terminais, mais região terminal do braço longo do cromossomo Z e braço curto do W	Região terminal 1 par m/sm	Região pericentromérica de 1 par m, mais sítios adicionais	9, 10 e PE
<i>Parodon moreirai</i> (citado como <i>Parodon</i> sp.)	Córrego Paiol Grande (SP)	54	54	54m/sm	54m/sm	ZZ/ZW	Presente	Presente nos cromossomos sexuais Z e W	2 sítios em região terminal, mais região terminal do braço longo do cromossomo Z e braço curto do W	Região terminal 1 par m/sm	Região pericentromérica de 1 par m	11 e PE
<i>Parodon nasus</i> (citado como <i>Parodon tortuosus</i>)	Rio Passa-Cinco (SP)	54	54	48m/sm, 6st	48m/sm, 6st	ausente	Presente	Presente nos cromossomos m semelhante aos sexuais Z e W	6 sítios em região terminal, mais região terminal do braço longo do par m correspondente ao cromossomo Z	1 par st sintenico ao 5S	1 par st sintenico ao 18S	2,3,10, 12 e PE
<i>Parodon pongoensis</i>	Córrego Taquaralzinho (MT)	54	54	50m/sm, 4st	50m/sm, 4st	ausente	Presente	Presente nos cromossomos m semelhante aos sexuais Z e W	Presente na região terminal do braço longo do par m correspondente ao cromossomo Z	Região terminal 1 par sm	Região pericentromérica de 1 par m	10 e PE
<i>Apareiodon piracicabae</i>	Rio Passa-Cinco (SP)	54	54	52m/sm, 2st	52m/sm, 2st	ausente	Presente	Ausente	Ausente	Região terminal 1 par st	Região pericentromérica de 1 par m	2, 3, 6, 13 e PE
<i>Apareiodon piracicabae</i>	Rio Piquiri (PR)	54	54	52m/sm, 2st	52m/sm, 2st	ausente	Presente	Ausente	Ausente	Região terminal 1 par st	Região pericentromérica de 1 par m	2, 3, 6, 13 e PE
<i>Apareiodon vittatus</i>	Rio Jordão (PR)	54	54	52m/sm, 2st	52m/sm, 2st	ausente	Presente	Ausente	Ausente	Região terminal 1 par st, mais sítios adicionais	Região pericentromérica de 1 par m	6 e PE

Referências: 1 - Moreira-Filho *et al* (1980); 2- Moreira-Filho *et al* (1984); 3- Moreira-Filho *et al* (1985); 4-Jesus *et al* (1999); 5- Jorge & Moreira-Filho (2000); 6- Jesus & Moreira-Filho (2000a); 7- Vicari *et al* (2006); 8- Rosa *et al* (2006); 9-Moreira-Filho *et al* (1993);10- Jesus & Moreira-Filho (2000b); 11 - Centofante *et al* (2002); 12- Bellafronte *et al* (2005); 13 - Silva (2009); PE = Presente estudo

Legenda: m-metassêntrico, sm-submetacêntrico e st -subtelocêntrico

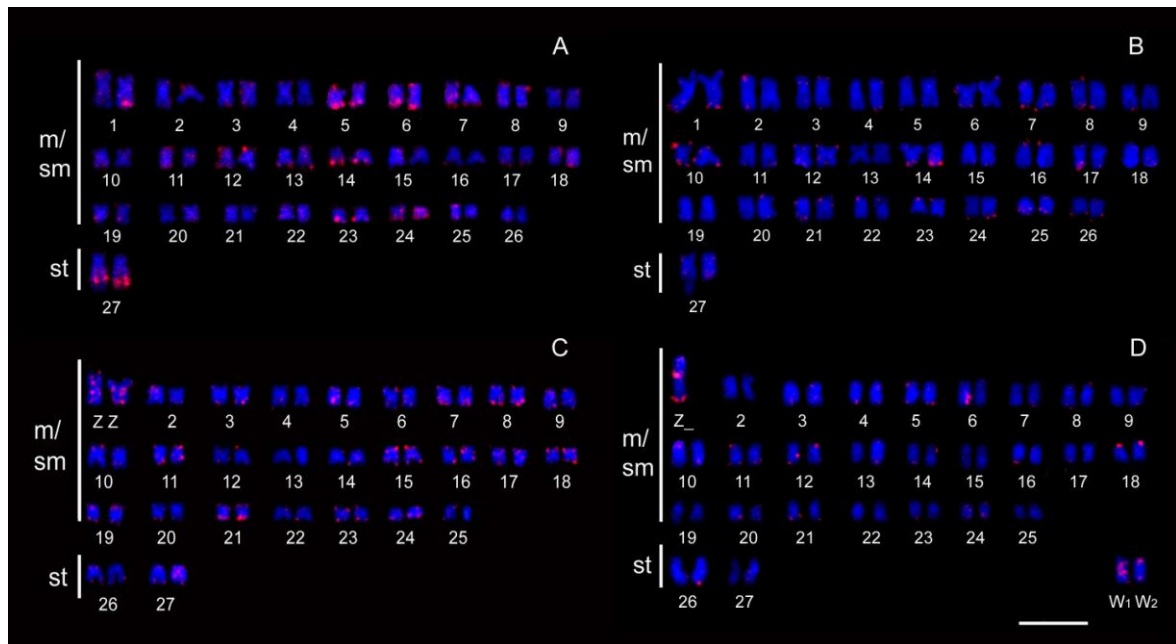


Figura 1: Localização dos sítios WAp por FISH em peixes da família Parodontidae. Em (A) cariótipo de fêmea de *Apareiodon piracicabae* mostrando sítios WAp terminais e interespaçado a região de RON (par 27); em (B) cariótipo de fêmea de *A. vittatus* evidenciando somente sítios WAp terminais; (C) cariótipo de macho de *A. affinis* mostrando os cromossomos Z marcados em região terminal de ambos os braços e na região proximal do braço longo, além de alguns sítios terminais nos cromossomos e; em (D) cariótipo de fêmea de *A. affinis* mostrando o cromossomo Z, W₁ e W₂ marcados, além de alguns sítios terminais no complemento. Barra = 5μm.

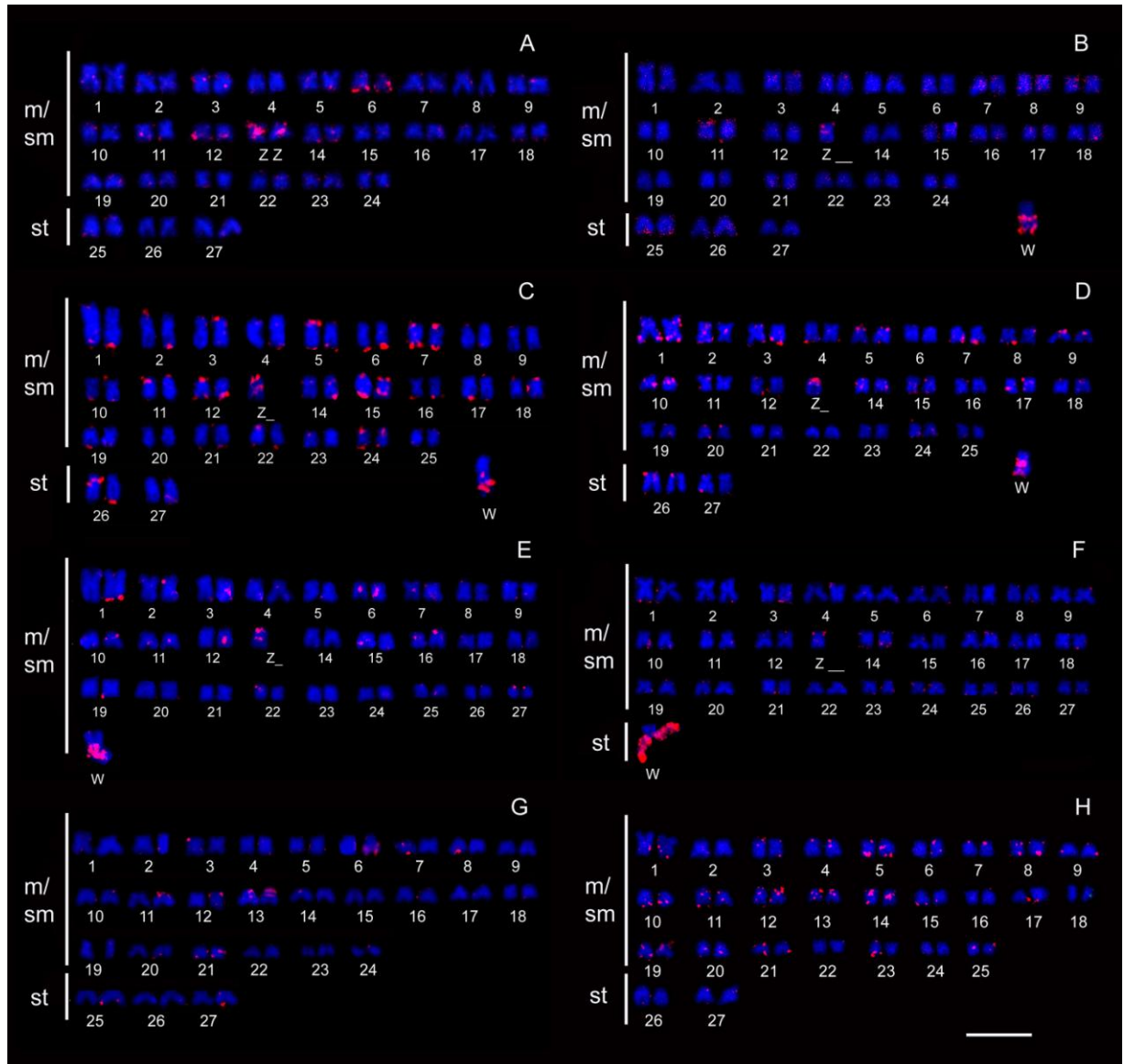


Figura 2: Localização dos sítios Wap por FISH em cariótipo de peixes da família Parodontidae evidenciando alguns sítios terminais em cromossomos do complemento, além de marcações na região terminal e proximal do braço curto do cromossomo Z e na região proximal e terminal do braço longo do cromossomo W. Em (A) cariótipo de macho de *Apareiodon* sp.; (B) fêmea de *Apareiodon* sp.; (C) fêmea de *A. vladii*, (D) fêmea de *A. ibitiensis*, (E) fêmea de *P. moreirai*; (F) fêmea de *P. hilarii*; (G) fêmea de *P. nasus*; (H) fêmea de *P. pongoensis*. Barra = 5µm.

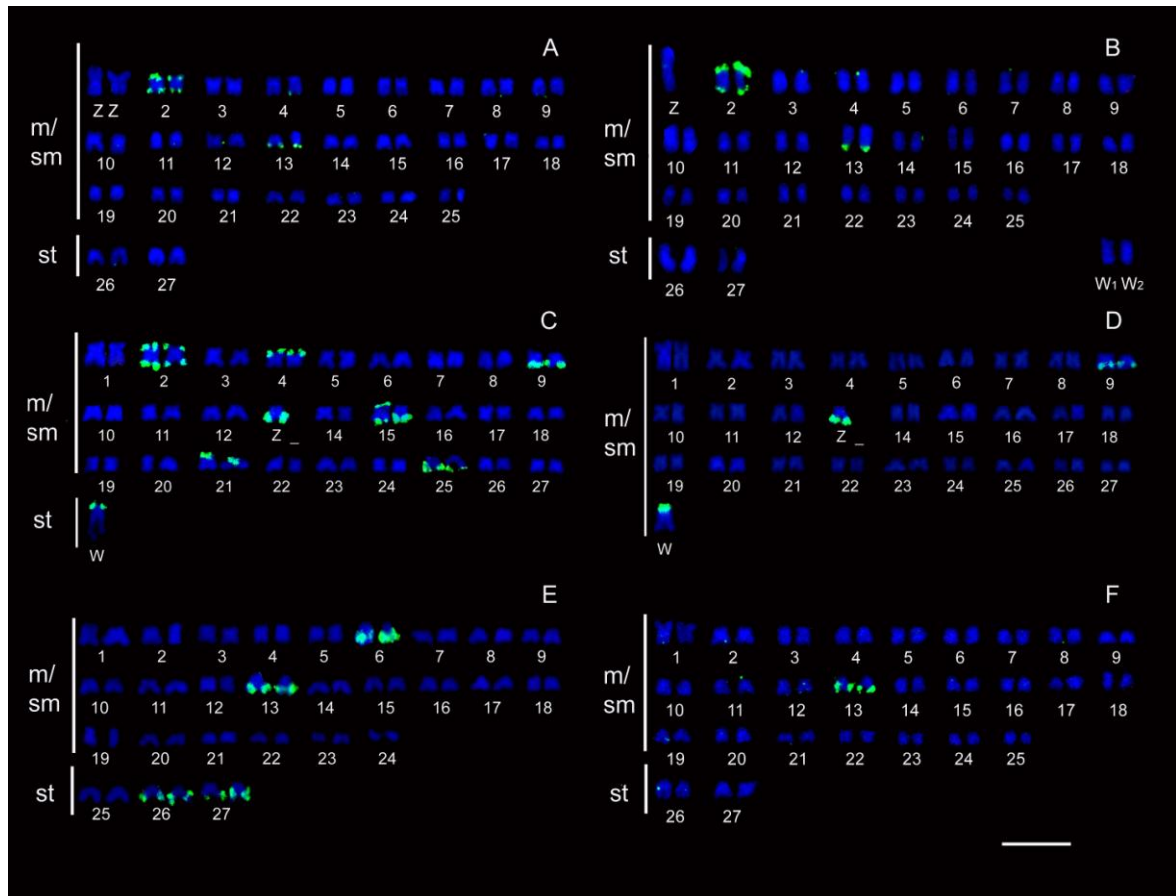


Figura 3: Localização dos sítios do DNA satélite pPh2004 por FISH em cariótipos de espécies da família Parodontidae. Em (A, B) macho e fêmea, respectivamente, de *A. affinis* mostrando dois pares cromossômicos com sítios pPh2004, um deles com marcações terminais em ambos os braços (par 2), semelhante ao encontrado em *P. hilarii*, além de mais um par metacêntrico marcado (par 13); (C) fêmea de *P. hilarii* com sítios pPh2004 na região terminal do braço longo do cromossomo Z, terminal do braço curto do cromossomo W, além de mais 15 sítios em autossomos; (D) fêmea de *P. moreirai* com sítios pPh2004 na região terminal do braço longo do cromossomo Z, terminal do braço curto do cromossomo W; (E) fêmea de *P. nasus* evidenciando 4 pares cromossômicos com marcações terminais do braço longo; (F) fêmea de *P. pongoensis* evidenciando apenas 1 par cromossômico metacêntrico marcado em região terminal do braço longo (par 13). Barra = 5µm.

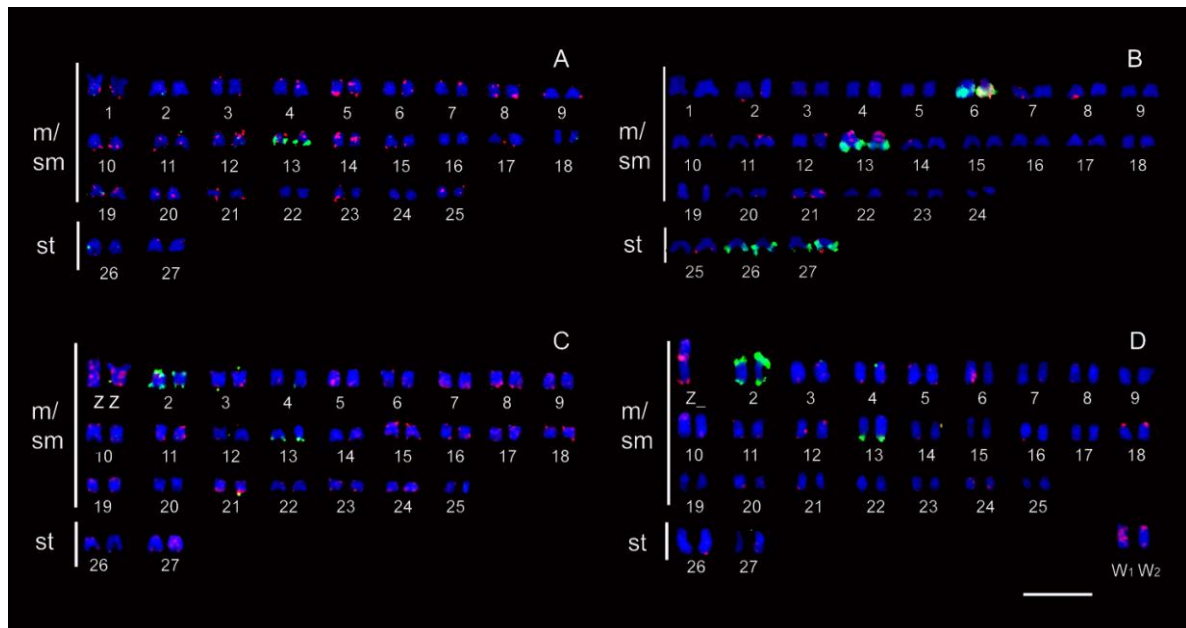


Figura 4: Cariótipos de espécies de Parodontidae submetidos à dupla FISH com sondas de DNA repetitivo WAp (sítios em vermelho) e DNA satélite pPh2004 (sítios em verde) evidenciando que o proto cromossomo Z possui sítios WAp na região proximal e terminal do braço curto e sítio pPh2004 na região terminal do braço longo. Em (A) fêmea de *P. pongoensis*; (B) fêmea de *P. nasus*, ambos os cariótipos com os dois DNAs repetitivos em um par metacêntrico evidenciando um possível sistema ZZ/ZW morfologicamente indiferenciado (par 13); (C, D) macho e fêmea de *A. affinis*, respectivamente demonstrando que o par metacêntrico semelhante ao proto cromossomo Z não detém o DNA satélite WAp (par 13). Barra = 5µm

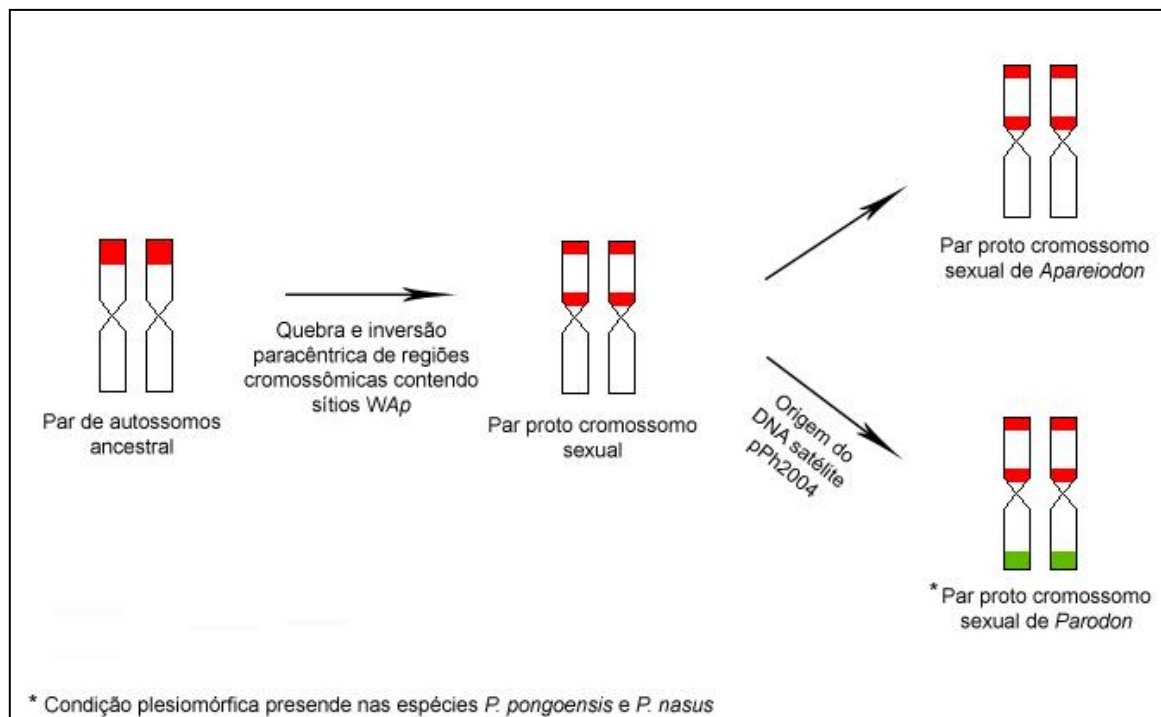


Figura 5: Idiograma representativo mostrando a hipótese de origem do par proto cromossomo sexual em *Apareiodon* e *Parodon*. Em vermelho sítios WAp e em verde sítios do DNA satélite pPh2004.

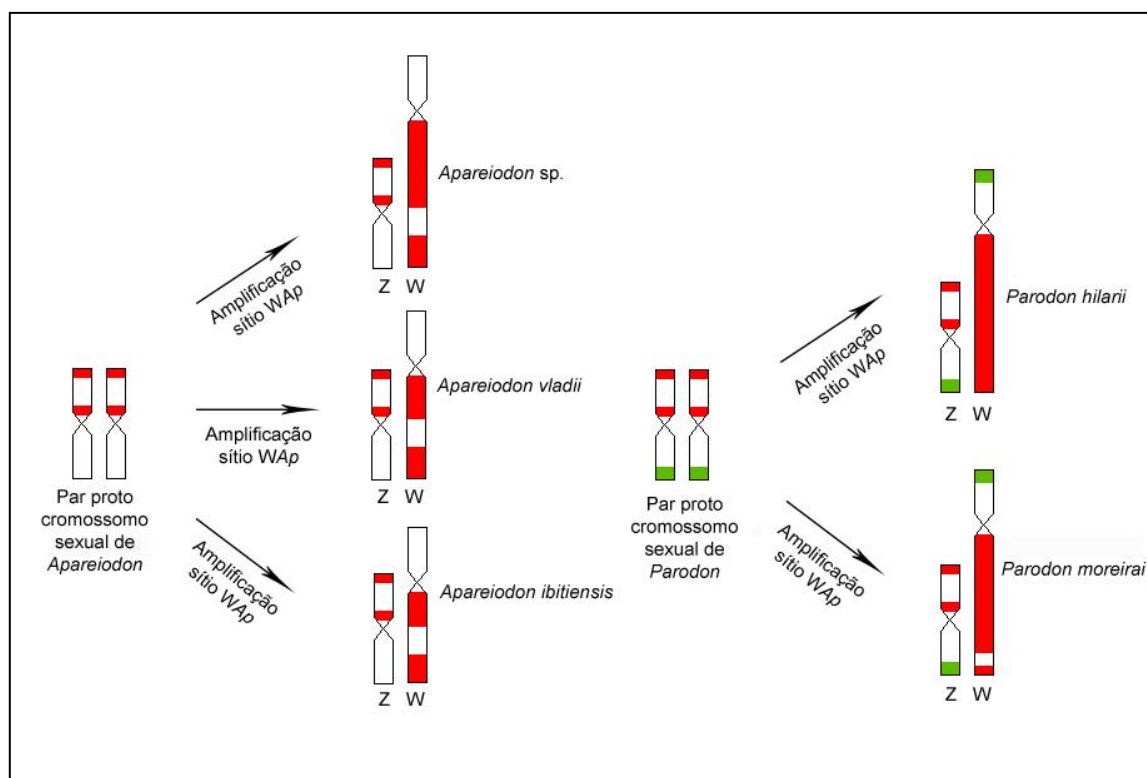


Figura 6: Idiograma representativo mostrando a hipótese de origem do sistema sexual simples nos gêneros *Apareiodon* e *Parodon*. Em vermelho sítios WAp e em verde sítios de DNA satélite pPh2004.

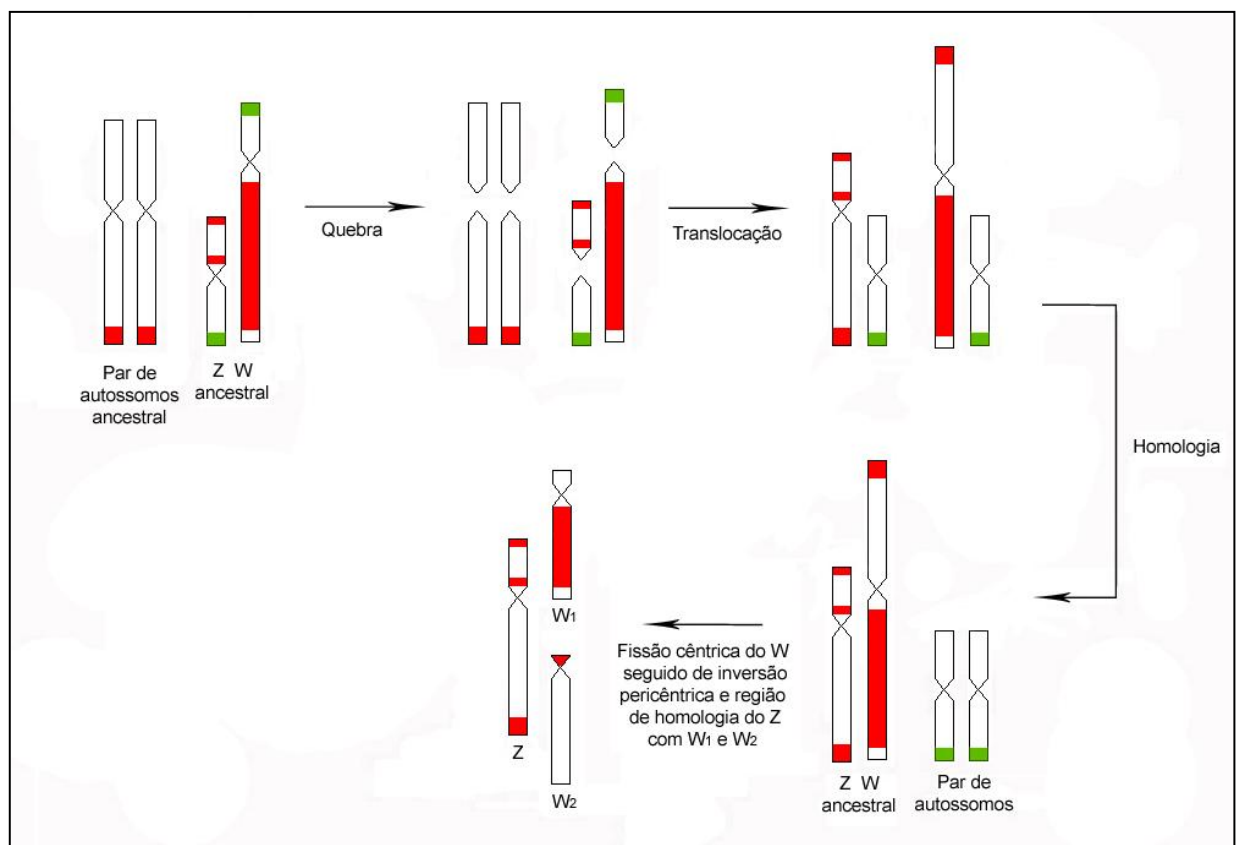


Figura 7: Idiograma representativo mostrando a hipótese de origem do sistema sexual múltiplo de *Apareiodon affinis*. Em vermelho sítios WAp e em verde sítios de DNA satélite pPh2004.

5. Considerações finais

Neste estudo, a fração heterocromática do cromossomo W de *Apareiodon* sp. (Ponta Grossa, PR) foi isolado por microdissecção, após ter sido submetido ao bandamento C, com posterior amplificação por DOP-PCR. As seqüências obtidas foram marcadas com digoxigenina 11 dUTP e utilizadas no procedimento de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) em cromossomos mitóticos em diferentes espécies da família Parodontidae. Esta sonda foi denominada neste trabalho de WAp.

Assim, de posse deste marcador e de outros já disponíveis o trabalho apresentou uma análise de citogenética molecular em exemplares da família Parodontidae. Foram realizados estudos relacionados à dispersão dos rDNAs, evolução dos cromossomos sexuais, assim como do DNA repetitivo WAp e do DNA satélite pPh2004 nas espécies: *Apareiodon* sp. (Ponta Grossa, PR), *Apareiodon ibitiensis* (Piumhi, MG), *Apareiodon vladii* (Nova Laranjeiras, PR), *Apareiodon piracicabae* (Piumhi, MG), *Apareiodon piracicabae* (Nova Laranjeiras, PR), *Apareiodon vittatus* (Mangueirinha, PR), *Apareiodon affinis* (Rio Claro, SP), *Parodon hilarii* (Piumhi, MG), *Parodon moreirai* (Campos do Jordão, SP), *Parodon nasus* (Cuiabá, MT) e *Parodon pongoensis* (Barra do Garças, MT).

O mapeamento dos DNAs ribossômicos 18S e 5S por FISH nas espécies de Parodontidae foram comparados a descrição da localização destes sítios no grupo irmão Anostomidae. Esses resultados indicam que a localização do rDNA 18S em região terminal do braço longo de um par m-sm pode ser a condição plesiomórfica no grupo. Assim, as espécies que portam este sítio em pares

subtelocêntricos teriam este caráter derivado em relação ao ancestral comum. No entanto, o rDNA 18S tem características saltatórias e mecanismos de amplificação independentes nas espécies. Desta forma, o caráter de localização do sítio de rDNA 45S pode ter evolução independente, e alguns cuidados são necessários para as inferências de proximidade filogenética. Por sua vez, os sítios de rDNA 5S se apresentam conservados na região proximal de um par submetacêntrico em todas as espécies da família Parodontidae. Tanto na localização do rDNA 18S, quanto na do 5S, sítios adicionais foram observados nos cromossomos de algumas espécies, condição esta apomórfica para o grupo.

Na família Parodontidae há espécies sem sistema de cromossomos sexuais morfologicamente diferenciados, com sistema simples de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW ou com sistema múltiplo de sistema sexual do tipo ZZ/ZW₁W₂. As seqüências repetitivas presente no cromossomo W são conservadas em regiões terminais dos cromossomos de todas as espécies da família Parodontidae analisadas neste estudo. No entanto, o sistema simples ZZ/ZW parece ter surgido por uma inversão de região WAp para a região proximal do braço curto de um par cromossômico m. As espécies *Apareiodon* sp., *A. ibitiensis*, *A. vladii*, *P. hilarii*, *P. moreirai*, *P. nasus* e *P. pongoensis* apresentam estas marcações WAp neste par metacêntrico. No entanto, em *P. nasus* e *P. pongoensis* nenhum heteromorfismo de tamanho destes sítios foi observado entre machos e fêmeas, enquanto que fêmeas de *Apareiodon* sp., *A. ibitiensis*, *A. vladii*, *P. hilarii* e *P. moreirai* apresentam uma amplificação desta região originando o cromossomo W. Por sua vez, nenhum sítio WAp foi observado em região intersticial de cromossomos metacêntricos semelhantes ao proto Z nas espécies

A. piracicabae e *A. vittatus*, os quais podem apresentar a condição plesiomórfica do caráter.

O mapeamento dos sítios do DNA repetitivo WAp em conjunto com o DNA satélite pPh2004 nos representantes da família permitiu inferir que o sistema ZZ/ZW₁W₂ de *A. affinis* pode ter sido derivado de um sistema ZW em um ancestral comum com a espécie *P. hilarii*. Ainda, este DNA satélite pPh2004 tem origem posterior aos sítios WAp nos proto cromossomos Z e é compartilhado pelas espécies *P. hilarii*, *P. moreirai*, *P. nasus*, *P. pongoensis* e *A. affinis*.

Os cromossomos sexuais das espécies de Parodontidae provavelmente surgiram em exemplares presentes na bacia do alto rio Paraná e bacia do rio São Francisco (escudo cristalino do sul-sudeste do Brasil). Na bacia do alto rio Paraná são descritas as espécies: *A. piracicabae*, que não possui sistema de cromossomos sexuais; *P. nasus* que possui um provável sistema de proto cromossomos sexuais; *Apareiodon* sp., *A. vladii* e *P. moreirai* que possuem sistema ZZ/ZW e *A. affinis* que possui sistema ZZ/ZW₁W₂. Na bacia do rio São Francisco a espécie *P. hilarii* é considerada endêmica (PAVANELLI, 2003) e apresenta sistema simples de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW, já *A. ibitiensis* (com sistema ZZ/ZW) e *A. piracicabae* (homomórfico em relação ao sexo) são consideradas invasoras pela quebra de barreira geográfica, onde ocorreu a transposição do rio Piumhi que fez com que fossem conectadas as bacias hidrográficas do rio Paraná e do rio São Francisco (MOREIRA-FILHO, 2006; SILVA, 2009). A espécie *A. vittatus* que pela extinção do Salto Sete quedas (Guaíra, PR) após a construção da barragem de Itaipu em 1982, permaneceu na bacia do rio Iguaçu e apresenta características plesiomórficas de cromossomos

sexuais indiferenciados. Provavelmente dispersões das espécies *P. nasus* e *P. pongoensis*, ocasionaram a presença destes na bacia do rio Paraguai e na bacia do rio Araguaia respectivamente, ambas as espécies possuem um provável sistema de proto cromossomos sexuais.

Assim, este trabalho contribui para o entendimento da evolução e diversificação do genoma de algumas espécies de Parodontidae, principalmente para o esclarecimento da origem e diferenciação dos cromossomos sexuais. Os próximos passos consistem em testar as sondas WAp e pPh2004 em um número maior de representantes da família, bem como, isolar outros marcadores cromossômicos que possam ser resolutivos no entendimento da evolução cariotípica da família, bem como, contribuir com suas relações filogenéticas.

6. Referências Bibliográficas

- ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; FORESTI, F.; DANIEL, M. F. Z.; TOLEDO-FILHO, S. A. Sex chromosome evolution in fish: the formation of the neo-Y chromosome in *Eigenmannia* (Gymnotiformes). **Chromosoma**, v. 109, p. 197-200, 2000.
- ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; FORESTI, F. Morphologically differentiated sex chromosomes in neotropical fish. **Genetica**, v. 111, p. 91-100, 2001.
- ARTONI, R. F.; VICARI, M. R.; ENDLER, A. L.; CAVALLARO, Z. I.; JESUS, C. M.; ALMEIDA, M. C.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. Banding pattern of A and B chromosomes of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae), with comments on B chromosomes evolution **Genetica**, v. 127, p. 277-284, 2006.
- ARTONI, R. F.; BERTOLLO, L. A. C. Evolutionary aspects of the ZZ/ZW sex chromosome system in the Characidae fish, genus *Triportheus*. A monophyletic state and NOR. **Heredity**, v. 89, p. 15-19, 2002.
- AZEVEDO, C. O.; BABIERI, M. C.; BABIERI, G. Ciclo reprodutivo de *Parodon tortuosus* (Eigenmann and Norris, 1900) do rio Passa Cinco, Ipeúna-SP. II. Etádios de Maturação do ovário. Época de reprodução. **Rev. Brasil. Biol**, v. 48 (3), p. 573-575, 1988.
- BARBIERI, G.; VERANI, J. R.; BABIERI, M. C. Análise do comportamento reprodutivo das espécies *Apareiodon affinis* (Steindachner, 1979), *Apareiodon ibitiensis* Campos, 1944 e *Parodon tortuosus* Eigenmann & Norris, 1900 do rio Passa Cinco, Ipeúna, SP (Pisces, Parodontidae). **An. Sem. Ecol**, v. III, p. 189-199, 1983.
- BELLAFRONTE, E.; MARGARIDO, V. P.; MOREIRA-FILHO O. Cytotaxonomy of *Parodon nasus* and *Parodon tortuosus* (Pisces, Characiformes). A case of synonymy confirmed by cytogenetic analyses. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, p. 710-716, 2005.
- BERIDZE, T. **Satellite DNA**. Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1986. 149p.
- BERTOLLO, L. A. C.; TAKAHASH, C. S.; MOREIRA-FILHO, O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Rev. Bras. Genet.**, v. 1(2), p. 103-120, 1978.
- BORN G. G.; BERTOLLO, L. A. Comparative cytogenetics among allopatric populations of the fish, *Hoplias malabaricus*. Cytotypes with 2n=42 chromosomes. **Genetica**, v. 110(1), p.1-9, 2000.
- BRITTEN, R. J.; KOHNE, D. E. Nucleotide sequence repetition in DNA. **Carnegie Inst Wash Year Book**, v. 65, p. 78-106, 1966.

BRITTEN, R. J.; KOHNE, D. E. Repeat sequences in DNA. **Science**, v. 161, p. 529-540, 1968.

BUCKUP, P. A. **Relationships of the Characidiinae and phylogeny of characiform fishes (Teleostei: Ostariophysi)**, p. 123-144. *In*: Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. MALABARBA, L. R.; REIS, R. E.; VARI, R. P.; LUCENA, Z. M.; LUCENA, C. A. S. (eds). Edipucrs, Porto Alegre, Brasil, 1998.

BUSSIEK, M.; HOISCHEN, C.; DIEKMANN, S.; BENNINK, M. L. Sequence-specific physical properties of African green monkey alpha-satellite DNA contribute to centromeric heterochromatin formation. **J. Struct. Biol.**, 2009.

CAPRIGLIONE, T.; MORESCALCHI, A.; OLMO, E.; ROCCO, L.; STINGO, L.; MANZO S. Satellite DNAs heterochromatin and sex chromosomes in *Channodraco hamatus* (Channichthyidae, Perciformes). **Polar. Biol.**, v. 14, p. 285-290, 1994.

CENTOFANTE, L.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. ZZ/ZW sex chromosome system in new species of the genus *Parodon* (Pisces, Parodontidae). **Caryologia**, v. 54, p. 139-150, 2002.

CHARLESWORTH, B.; SNIEGOWSKI, P.; WOLFGANG, S. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature**, v. 371, p. 215-220, 1994.

CHEW, J. S.; OLIVEIRA, C.; WRIGHT, J. M.; DOBSON, M. J. Molecular and cytogenetic analysis of the telomeric (TTAGGG)_n repetitive sequences in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae). **Chromosoma**, v. 111(1), p. 45-52, 2002.

DE LA HERRÁN, R.; FONTANA, F.; LANFREDI, M.; CONGIU, L.; LEIS, M.; ROSSI, R.; RUIZ REJÓN, C.; RUIZ REJÓN, M.; GARRIDO-RAMOS, M. A. Slow rates of evolution and sequence homogenization in an ancient satellite DNA family of sturgeons. **Molecular Biology of Evolution**, v. 18, p. 432–436, 2001.

DOVER, G. A. Molecular drive in multigene families: how biological novelties arise, spread and are assimilated. **Trends Genet.**, v. 2, p. 159–165, 1986.

DEVLIN, R. H.; McNEIL, B. K.; DONALDSON, E. M. Isolation of a Y-chromosomal DNA probe capable of determining sex in chinook salmon. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, v.48, p. 1606-1612, 1991.

DEVLIN, R. H.; Stone, G. W.; SMAILUS, D. E. Extensive Direct-Tandem Organization of a Long Repeat DNA Sequence on the Y Chromosome of Chinook Salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). **Journal of Molecular Evolution**, v. 46, p. 277–287, 1998.

DEVLIN, R. H.; BIAGI, C. A.; SMAILUS, D. E. Genetic mapping of Y-chromosomal DNA markers in Pacific salmon. **Genetica**, v.111(1-3), p. 43-58, 2001.

EZAZ, M. T.; MYERS, J. M.; POWELL, S. F.; MCANDREW, B. J.; PENMAN, D. J. Sex ratios in the progeny of androgenetic and gynogenetic YY male Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture**, v. 232, p. 205–214, 2004.

FALCÃO, J. N.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. An additional chromosome in two fish species. **Brazil J Genet**, v.1, p. 109-118, 1984.

FENOCCHIO, A. S.; VENERE, P. C.; CESAR, A. C. G.; DIAS, A. L.; BERTOLLO, L. A. C. Short term culture from solid tissues of fishes. **Caryologia**, v.44, p. 161-166, 1991.

GALETTI Jr., P. M.; FORESTI F.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA FILHO, O. Karyotypic similarity in three genera (*Leporinus*, *Leporellus*, *Schizodon*) of the family Anostomidae (Pisces, Teleostei). **Brazil. J. Genet.**, v. 4, p. 11–15, 1981.

GALETTI Jr, P. M.; CESAR, A. C. G.; VENERE, P. C. Heterochromatin and NORs variability in *Leporinus* Fish (Anostomidae, Characiformes). **Caryologia**, v. 44(3-4), p. 287-292, 1991.

GALETTI, Jr. P. M.; LIMA, N. R. W.; VENERE, P. C. A monophyletic ZW chromosome system in *Leporinus* (Anostomidae, Characiformes). **Cytologia**, v. 60, p. 375-382, 1995.

GALETTI, P. M.; MARTINS, C. **Contribuição da hibridização *in situ* para o conhecimento dos cromossomos de peixes.** In: Guerra M (Ed.) FISH - conceitos e aplicações na citogenética. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, SP, 2004.

GOLD, J. R.; KAREL, W. J.; STRAND, M. R. Chromosomal formulae of North American fishes. **The Progressive Fish-Culturist**, v. 43, p. 10-23, 1980.

HAAF, T.; SCHMID, M. An early stage of ZW/ZZ sex chromosome differentiation in *Poecilia sphenops* var. *melanistica* (Poeciliidae, Cyprinodontiformes). **Chromosoma**, v. 89, p. 37–41, 1984.

HARVEY, S. C.; MASABANDA, J.; CARRASCO, L. A. P.; BROMAGE, N. R.; PENMAN, D. J.; GRIFFIN, D. K. Molecular-cytogenetic analysis reveals sequence differences between the sex chromosomes of *Oreochromis niloticus*: evidence for an early stage of sex-chromosome differentiation. **Cytogenet. Gen. Res.**, v. 97, p. 76-80, 2002.

HATANAKA, T.; GALETTI, Jr. P. M. Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). **Genetica**, v. 122, p. 239-244, 2004.

HEIKKINEN, E.; LAUNONEN, V.; MÜLLER, E.; BACHMANN, L. The pvB370 BamHI satellite DNA family of the *Drosophila virilis* group and its evolutionary relation to mobile dispersed genetic pDv elements. **J. Mol. Evol.**, v. 41(5), p. 604-614, 1995.

HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, A.; RINCÓN-ARANO, H.; RECILLAS-TARGA, F.; ORTIZ, R., VALDES-QUEZADA, C.; ECHEVERRÍA, O. M.; BENAVENTE, R.; VÁZQUEZ-NIN, G. H. Differential distribution and association of repeat DNA sequences in the lateral element of the synaptonemal complex in rat spermatocytes. **Chromosoma**, v. 117(1), p. 77-87, 2008.

INGENITO, L. F. S. Análise filogenética da família Parodontidae (Teleostei, Characiformes). Tese de doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, 2008.

INGENITO, L. F. S.; BUCKUP, P. A. A new species of *Parodon* from the Serra da Mantiqueira, Brazil (Teleostei: Characiformes: Parodontidae). **Copeia**, p. 765-771, 2005.

JESUS, C. M.; MOREIRA-FILHO, O. Cytogenetic studies in some *Apareiodon* species (Pisces, Parodontidae). **Cytologia**, v. 65, p. 397-402, 2000a.

JESUS, C. M.; MOREIRA-FILHO, O. Karyotypes of three species of *Parodon* (Teleostei, Parodontidae). **Ichthyological Exploration Freshwaters**, v. 11, 75-80, 2000b.

JESUS, C. M.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. Comparative cytogenetics in *Apareiodon affinis* (Pisces, Characiformes) and considerations regarding diversification of the group. **Genetica**, v. 105, p. 63-67, 1999.

JESUS, C. M.; GALETTI, Jr. P. M.; VALENTINI, S. R.; MOREIRA-FILHO, O. Molecular characterization and chromosomal location of two families of satellite DNA in *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae), a species with B chromosomes. **Genetica**, v. 118, p. 25-32, 2003.

JORGE, L. C.; MOREIRA-FILHO, O. Cytogenetic studies on *Apareiodon affinis* (Pisces, Characiformes) from Paraná river basin: Sex chromosomes and polymorphism. **Genetica**, v. 109, p. 267-273, 2000.

JORGE, L. C.; MOREIRA-FILHO, O. Nucleolar organizer regions as markers of chromosomal polymorphism in *Apareiodon affinis* (Pisces, Parodontidae). **Caryologia**, v. 57, p. 203-207, 2004.

JURKA, J.; KAPITONOV, V. V.; KOHANY, O.; JURKA, M. V. Repetitive Sequences in Complex Genomes: Structure and Evolution. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 8, p. 241-259, 2007.

KURENOVA, E.; CHAMPION, L.; BIESSMANN, H.; MASON, J.M. Directional gene silencing induced by a complex subtelomeric satellite from *Drosophila*. **Chromosoma**, v. 107(5), p. 311-20, 1998.

KANTEK, D. L.; CESTARI, M. M.; BERTOLLO, L. A.; MOREIRA-FILHO, O. M. Characterization of the constitutive heterochromatin of *Astyanax* sp.

(Characiformes: Characidae) from the Upper Iguaçu River (PR). **Folia. Biol.**, v. 57(1-2), p. 37-41, 2009.

LEITE, M. F.; OLIVEIRA, G. A.; MAISTRO E. L. Determinação da constituição cariotípica básica da espécie *Apareiodon cf. affinis* (Pisces, Characiformes, Parodontidae) coletados no rio Sapucaí, MG. 46º Congresso Nacional de Genética, Águas de Lindóia, SP, pp50.

LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANDBERG, A. A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**, v. 52, p. 201-220, 1964.

LONG, E. O.; DAVID, I. D. Repeated genes in eukaryotes. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 49, p. 727–764, 1980.

MANTOVANI, M.; ABEL, L. D. S.; MESTRINER, C. A.; MOREIRA-FILHO, O. Evidence of the differentiated structural arrangement of constitutive heterochromatin between two populations of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Genetic and Molecular Biology**, v. 27, p. 536-542, 2004.

MARTINS, C., GALETTI, P. M. Conservative distribution of 5S rDNA loci in *Schizodon* (Pisces, Anostomidae) chromosomes. **Chromosom. Res.**, v. 8, p. 353–355, 2000.

MARTINS, C.; GALETTI, Jr. P. M. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* Fish (Anostomidae, Characiformes). **Chromosom. Res.**, v. 7, p. 363-367, 1999.

MATSUBARA, K.; TARUI, H.; TORIBA, M.; YAMADA, K.; NISHIDA-UMEHARA, C.; AGATA, K.; MATSUDA, Y. Evidence for different origin of sex chromosomes in snakes, birds, and mammals and step-wise differentiation of snake sex chromosomes. **PNAS.**, v. 103 p. 18190-18195, 2006.

MESTRINER, C. A.; GALETTI, Jr. P. M.; VALENTINI, S. R.; RUIZ, I. R. G.; ABEL, L. D. S.; MOREIRA-FILHO O.; CAMACHO, J. P. M. Structural and functional evidence that a B chromosome in the characidae fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome. **Heredity**, v. 85, p.1-9, 2000.

MEYNE, J.; BAKER, R. J.; HOBART, H. H.; HSU, T. C.; RYDER, O. A.; WARD O. G.; WILEY, J. E.; WURSTER-HILL, D. H.; YATES, T. L.; MOYZIS, R. K. Distribution of non-telomeric sites of the (TTAGGG)_n telomeric sequence in vertebrate chromosomes. **Chromosoma**, v. 99(1), p. 3-10, 1990.

MONOD, C.; AULNER, N.; CUVIER, O.; KÄS, E. Modification of position-effect variegation by competition for binding to *Drosophila* satellites. **EMBO**, v. 3(8), p. 747-52, 2002.

MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C.; GALETTI, Jr. P. M. Distribution of sex chromosome mechanisms in Neotropical fish and description of a ZZ/ZW system in *Parodon hilarii* (Parodontidae). **Caryologia**, v. 46, p. 115-125, 1993.

MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C.; GALETTI, Jr. P. M. Karyotypic study of some species of family Parodontidae (Pisces-Cypriniformes) **Caryologia**, v. 38, p. 47-55, 1985.

MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C.; GALETTI, Jr. P. M. Evidences for a multiple sex chromosome system with female heterogamety in *Apareiodon affinis* (Pisces, Parodontidae). **Caryologia**, v. 33, p. 83-91, 1980.

MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C.; GALETTI, Jr. P. M. Structure and variability of nucleolar organizer regions in Parodontidae fish. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, v. 26, p. 564-568, 1984.

MOREIRA-FILHO, O. Uma transposição de rio esquecida. **Revista UFG**, v.2, p. 78-82, 2006.

MULLER, H. J. Some genetic aspects of sex. **Am. Nat.**, v. 66, p. 118–138, 1932.

NAKAYAMA, I.; FORESTI, F.; TEWARI, R.; SCHARTL, M.; CHOURROUT, D. Sex chromosome polymorphism and heterogametic males revealed by two cloned DNA probes in the ZW/ZZ fish *Leporinus elongatus*. **Chromosoma**, v.103, p. 31-39, 1994.

NAKATANI, K.; AGOSTINHO, A. A.; BAUMGARTNER, G.; BIALETZKI, A.; SANCHES, P. V.; MAKRAKIS, M. C.; PAVANELLI, C. S. **Ovos e larvas de água doce: desenvolvimento e manual de identificação**. Maringá: EDUEM, 2001. 378 p.

NANDA, I. W.; FEICHTINGER; SCHMID, M.; SCHORÖDER, J. H.; EPPELEN, J. T. Simple repetitive sequences are associated with differentiation of the sex chromosomes in the guppy fish. **J. Mol. Evol.**, v. 30, p. 456-462, 1990.

NELSON, J. S. **Fishes of the world**. 4th ed. Hoboken, John Wiley & Sons, 2006. 624p.

NOMURA, H.; FERREIRA, M.; HAYSHI, C. Caracteres merísticos e dados biológicos sobre o canivete, *Apareiodon affinis* (Steinchnner, 1879) do rio Mogi Guaçu, São Paulo (Osteichthyes, Parodontidae). **Revista Brasileira de Biologia**, v.38, p. 745-752, 1978.

O'CONNEL, M.; WRIGTH, J. Microsatellite DNA in fishes. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 7, p. 331-363, 1997.

PAVANELLI, C. S.; BRITSKI, H. A. *Apareiodon* Eigenmann, 1916 (Teleostei, Characiformes), from the Tocantins-Araguaia Basin, with Description of three New species. **Copeia**, v. 2, p. 337-348, 2003.

PAVANELLI, C. S. Family Parodontidae. Pp. 46-50. In: REIS, R. E., S. O. KULLANDER & C. J. FERRARIS (Eds.). **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre, EDIPUCRS, 742p., 2003.

PAVANELLI, C. S. New species of *Apareiodon* (Teleostei: Characiformes: Parodontidae) from the Rio Piquiri, upper Rio Paraná basin, Brazil. **Copeia**, p.89-95, 2006.

PAVANELLI, C. S. (2007) Família Parodontidae In: Buckup A B, Menezes N A, Ghazzi M S (Eds) Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil. Museu Nacional do Rio de Janeiro.

PENDAS, A. M.; MORÁN, P.; FREIJE, J. P.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Chromosomal mapping and nucleotide sequence of two tandem repeats of Atlantic salmon 5S rDNA. **Cytoget. Cell. Genet.**, v. 67, p. 31-36, 1994.

PENDAS, A. M.; MORAN, P.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Multi chromosomal location of ribosomal RNA genes and heterochromatin association in brown trout. **Chromosom. Res.**, v. 1, p. 63–67, 1993.

PHILLIPS, R. B.; REED, K. M. Application on fluorescence in situ hybridization (FISH) techniques to fish genetics: a review. **Aquaculture**, v. 140, p. 197-216, 1996.

PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J. W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.83, p. 2934-2938, 1986.

PLOHL, M.; BORSTNIK, B.; LUCIJNICJUSTVI, A.; UGARKOVDI, N. D. Evidence for random distribution of sequence variants in *Tenebrio molitor* satellite DNA. **Genet. Res.**, v. 60, p. 7-13, 1992.

PLOHL, M.; LUCHETTI, A.; MEŠTROVIĆ, N.; MANTOVANI, B. Satellite DNAs between selfishness and functionality: Structure, genomics and evolution of tandem repeats in centromeric (hetero)chromatin. **Gene**, v. 409, p. 72–82, 2008.

PONS, J.; JUAN, C.; PETITPIERRE, E. Higher-order organization and compartmentalization of satellite DNA PIM357 in species of the coleopteran genus *Pimelia*. **Chromosome Research**, v.10(7), p. 597-606, 2002.

PONS, J.; GILLESPIE, R. G. Common origin of the satellite DNAs of the Hawaiian spiders of the genus *Tetragnatha*: evolutionary constraints on the length and nucleotide composition of the repeats. **Gene**, v. 313, p. 169–177, 2003.

REED, K. M.; PHILLIPS, R.B. Molecular characterization and cytogenetic analysis of highly repeated DNAs of lake trout, *Salvelinus namaycush*. **Chromosoma**, v. 104, p. 242-251, 1995.

REED, K. M., PHILLIPS, R. B. Polymorphism of the nucleolus organizer region (NOR) on the putative sex chromosomes of Arctic char (*Salvelinus alpinus*) is not sex related. **Chromosom. Res.**, v. 5, p. 221-227, 1997.

ROBERTS, T. R. Osteology and classification of the neotropical characoid fishes of the families Hemiodontidae (Including Anodontidae and Parodontidae). **Bull. Mus. Comp. Zool.**, v.146, p. 411-472, 1974.

ROSA, R.; BELLAFRONTE, E.; MOREIRA-FILHO, O.; MARGARIDO, V. P. Description of the ZZ/ZW sex chromosome system and localization of 5S and 18S rDNA genes in *Apareiodon* sp. (Pisces, Characiformes, Parodontidae). **Genetica**, v. 128, p. 159–166, 2006.

SAITO, Y.; EDPALINA, R. R.; ABE, S. Isolation and characterization of salmonid telomeric and centromeric satellite DNA sequences. **Genetica**, v. 131, p. 157-166, 2007.

SCHNEIDER, M. C.; ALMEIDA M. C.; ROSA S. P.; COSTA C.; CELLA D. M. Evolutionary chromosomal differentiation among four species of *Conoderus* Eschscholtz, 1829 (Coleoptera, Elateridae, Agrypninae, Conoderini) detected by standard staining, C-banding, silver nitrate impregnation, and CMA₃/DA/DAPI staining. **Genetica**, v. 28, p. 333-346, 2006.

SCHULTZ, L.P.; MILES, C. Descriptions a new genus and a new species of Parodontidae, characinid fishes from the South America. **J. Wash. Acad. Sci.**, v. 33, p. 251-255, 1943.

SCHWEIZER, D.; LOID, L. J; HAMILTON, B. Heterochromatin and the phenomenon of chromosome banding. **Results Probl. Cell. Differ.**, v. 14, p. 235-54, 1987.

SILVA, E. B. Citogenética clássica e molecular em peixes Neotropicais. Estudos comparativos entre bacias hidrográficas com ênfase em região de transposição de rio. Tese de Doutorado (Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução). Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, SP, 2009.

SMITH, G. P. Unequal crossover and evolution of multigene families. **Quant. Biol.**, v. 38, p. 507-513, 1974.

SMITH, S. G.; VIRKKI N. Coleoptera, p.59-70. In B. John (ed.), Animal cytogenetics. Berlin, Germany, Gebrüder Borntraeger, 1978. 366p.

STEIN, J.; PHILLIPS, R. B.; DEVLIN, R. H. Identification of the Y chromosome in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). **Cytogenet. Cell. Genet.**, v. 92, p. 108-110, 2001.

STEIN, J.; REED, K. M.; WILSON, C. C.; PHILLIPS, R. A sex-linked microsatellite locus isolated from the Y chromosome of lake charr, *Salvelinus namaycush*. **Environmental Biol. of Fishes**, v. 64, p. 211-216, 2002.

STEINEMANN, S.; STEINEMANN, M. Retroelements: tools for sex chromosome Evolution. **Cytogenet Genome Res.**, v. 110, p. 134–143, 2005.

SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Exp. Cell. Res.**, v. 75, p. 304-306, 1972.

SUMNER, A. T. **Chromosomes: organization and function**. Malden, Blackwell Publishing, 2003.

TELENIUS, H.; CARTER, N. P.; BEBB, C. E.; NORDENSKJOLD, M.; PONDER, B. A.; TUNNACLIFFE, A. Degenerate oligonucleotideprimed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. **Genomics**, v.13, p. 718-725, 1992.

TRAVASSOS, H. Ictiofana de Pirassununga. I- Subfamília Parodontidae Eigenmann, 1916 (Actinopterygii-Cypriniformes). **Bol. Mus. Nac.** (N. Sér. Zool.), v. 129, p. 1-31, 1955.

UGARKOVIC, D.; PLOHL, M. Variation in satellite DNA profiles causes and effects. **The EMBO journal**, v. 21(22), p. 5955-5959, 2002.

VICARI, M. R.; ARTONI, R. F.; BERTOLLO, L. A. C. Heterochromatin polymorphism associated with 18S rDNA. A differential pathway among *Hoplias malabaricus* fish populations. **Cytogenet. Gen. Res.**, v. 101, p. 24-28, 2003.

VICARI, M. R.; NOGAROTO, V.; NOLETO, R. B.; CESTARI, M. M.; CIOFFI, M. B.; ALMEIDA, M. C.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C.; ARTONI, R. F. Satellite DNA in Neotropical fishes: Methods, applications and perspectives. **Journal of Fish Biology** (submetido).

VICARI, M. R.; MOREIRA-FILHO, O.; ARTONI, R. F.; BERTOLLO, L. A. C. ZZ/ZW sex chromosome system in an undescribed species of the genus *Apareiodon* (Characiformes, Parodontidae). **Cytogenet. Genome Res.**, v.114, p. 163-168, 2006.

VICARI, M. R. ; ARTONI, R. F.; MOREIRA-FILHO, O. ; BERTOLLO L. A. C. Colocalization of repetitive DNAs and silencing of major rRNA genes. A case report of the fish *Astyanax janae* *ensis* **Cytogenet. Genome Res.**, v. 122, p. 67-72, 2008.

VICENTE, V. E.; BERTOLLO, L. A. C.; VALENTINI, S. R.; MOREIRA-FILHO, O. Origin and differentiation of sex chromosome system in *Parodon hilarii* (Pisces, Parodontidae). Satellite DNA, G and C-banding. **Genetica**, v. 119, p. 115-120, 2003.

VICENTE, V. E.; JESUS, C. M.; MOREIRA-FILHO, O. Chromosomal localization of 5S and 18S rDNA genes in three *Parodon* species (Pisces, Parodontidae). **Caryologia**, v. 54, p. 365-369, 2001.

YUNIS, J. J.; YASMINEH, W. G. Heterochromatin, satellite DNA, and cell Function. **Science**, v. 174, p. 1200-1209, 1971.

WHITE, M. J. D. **Animal Cytology and Evolution**. 3rd edition. Columbia Univ Press, NY, 1973. 468p.

ZIEGLER, C. G.; LAMTSCH, D. K.; STEINLEIN, C.; ENGEL, W.; SCHARTL, M.; SCHMID, M. The giant B chromosome of the cyprinid fish *Alburnus alburnus* harbours a retrotransposon-derived repetitive DNA sequence. **Chromosom. Res.**, v. 11, p. 23-35, 2003.

7. ANEXOS

ANEXO I



PARECER Nº 01/2008
Protocolo: 04741/08

Em reunião extraordinária realizada nesta data, a Comissão de Ética em Pesquisa, **APROVOU** o protocolo de pesquisa intitulado "**Diversidade de peixes: uma abordagem cromossômica em três diferentes biomas aquáticos da região sul do Brasil**" de responsabilidade do Pesquisador Marcelo Ricardo Vicari.

Ponta Grossa, 19 de maio de 2008.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SUB-COMISSÃO DE ÉTICA EM ANIMAL - SCEE


Prof.º Guilherme de Almeida S. Tedrus
Coordenador substituto da SCEE

A

