

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA

(Associação Ampla entre a UEPG e a UNICENTRO)

CITOGENÉTICA MOLECULAR DE *Astyanax scabripinnis* (CHARACIDAE, *Incertae
sedis*) COM ÊNFASE NO CROMOSSOMO B.

HELENA FLÁVIA DE MELLO PISTUNE

Ponta Grossa

2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA

(Associação Ampla entre a UEPG e a UNICENTRO)

CITOGENÉTICA MOLECULAR DE *Astyanax scabripinnis* (CHARACIDAE, *Incertae sedis*) COM ÊNFASE NO CROMOSSOMO B.

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

2010

Ficha Catalográfica Elaborada pelo Setor de Processos Técnicos BICEN/UEPG

P679c

Pistune, Helena Flávia de Mello

Citogenética molecular de *Astyanax scabripinnis* (CHARACIDAE, *Incertae sedis*) com ênfase no cromossomo B. / Helena Flávia de Mello Pistune. Ponta Grossa, 2010.

92f.

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.

Orientador : Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari

Co-orientadora : Profa. Dra. Mara Cristina de Almeida Matiello

1. Pintura cromossômica. 2. DNA satélite As51 3. rDNA.
4. Diversificação cariotípica. 5. C_{ot}-1 DNA I. Vicari, Marcelo Ricardo. II. Matiello, Mara Cristina de Almeida . III. T.

CDD : 575



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. 03/2010

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 **HELENA FLÁVIA DE MELLO PISTUNE**.

Aos doze dias do mês de março de dois mil e dez, no Auditório do Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta Grossa sob a presidência do Dr. Marcelo Ricardo Vicari, em sessão pública, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação do (a) aluno(a) **HELENA FLÁVIA DE MELLO PISTUNE**, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-área de concentração Biologia Evolutiva, visando o título de Mestre, constituída pelos: Dr. Marcelo Ricardo Vicari (Orientador), Dr. Vladimir Pavan Margarido e Dr. Rodrigo Rodrigues Matiello e co-orientadora Mara Cristina de Almeida Matiello. 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 *Astyanax scabripinnis* (Characidae, *Incertae sedis*), com ênfase no Cromossomo B**. 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.

Ponta Grossa, 12 de março de dois mil e dez.

Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari _____

Prof. Dr. Vladimir Pavan Margarido _____

Prof. Dr. Rodrigo Rodrigues Matiello _____

Profª Drª Mara Cristina de Almeida Matiello _____

Orientador

Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari

Co-orientadora

Prof.^a. Dr.^a. Mara Cristina de Almeida Matiello

Dedico este trabalho à pequena
Elisa Maria, minha irmã, o anjo que
tem iluminado cada um de meus
dias...

É pensando nos homens que eu perdoo aos tigres as garras que dilaceram.

(Florbelá Espanca)

Viver é ser outro. Nem sentir é possível se hoje se sente como ontem se sentiu: sentir hoje o mesmo que ontem não é sentir - é lembrar hoje o que se sentiu ontem, ser hoje o cadáver vivo do que ontem foi a vida perdida.

(Fernando Pessoa)

Smile (Sorria)

Sorria, apesar de seu coração estar doendo, sorria, mesmo que ele esteja partindo. Quando houver nuvens no céu, você superará. Se você sorrir por entre seu medo e tristeza... Sorria, e talvez amanhã você verá o Sol vindo brilhar para você. Ilumine sua face com alegria, esconda qualquer traço de tristeza, apesar de uma lágrima poder estar sempre tão perto. Esta é a hora em que você deve continuar tentando. Sorria! Para que chorar? Você descobrirá que esta vida ainda vale a pena, se você apenas... sorrir!

(Charles Chaplin)

Agradecimentos

Gostaria de neste momento agradecer a cada uma das instituições e pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho e também para minha formação pessoal.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta Grossa pela oportunidade de realizar este estudo.

Ao prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni, que foi meu orientador na iniciação científica, e me acolheu muito bem no laboratório de Citogenética e Evolução. A cada ano que passa o laboratório está mais bem estruturado, e o grupo de cientistas mais consolidado. Roberto é gratificante ver essa segunda casa de todos crescer, e devemos muito à sua competência e perseverança, na conquista de parcerias e apoio técnico. Agradeço também sua amizade e conselhos sempre válidos.

À prof^a Dr^a Mara Cristina de Almeida Matiello, pelos conhecimentos transmitidos desde a graduação, pela paciência, pelas contribuições valiosas neste trabalho, e, sobretudo pela amizade, a qual eu prezo muito. Agradeço por ser compreensiva e sempre disposta a ajudar.

Ao prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari, pela ajuda na bancada, por todo o auxílio, não só no mestrado, mas na iniciação científica também. Você é um exemplo de persistência e dedicação.

À minha família, sempre torcendo por mim e me apoiando. Minha mãe, minha amiga, Joana D'Arc de Mello Pistune, agradeço não só por ouvir cada desabafo e comemorar cada vitória durante o mestrado. Agradeço por uma vida inteira ter se dedicado tanto a mim, eu simplesmente não tenho palavras para agradecer. Ao meu pai, João Carlos Pistune. À minha irmãzinha Elisa, agradeço cada sorriso, e digo que cada um deles me dá a força que preciso para continuar.

Aos meus avós, Eva Maria Amaral de Mello, Neudi Ferreira de Mello (*in memorian*), Dinarcy Rumbelsperger Pistune (*in memorian*) e José Francisco Pistune. Muito obrigada por torcerem sempre por mim, pelo carinho dedicado. Amo vocês! À Edi e à Lúcia, pessoas muito carinhosas que cuidaram de mim na infância enquanto meus pais trabalhavam. Aos meus queridos padrinhos, Dilza Aparecida Sobczynski (✠16/01/1968 - ✠ 03/02/2010) e Álvaro Sobczynski, pelo incentivo e presença constantes. Dilza, madrinha querida, nunca vou esquecer a força que você sempre me deu, as vezes em que rimos muito juntas e o amor que sempre demonstrou por mim! Saudades eternas, minha segunda mãe!

À “vó” Yolanda, pelo amor e por ter me auxiliado de diversas maneiras durante o período da graduação e mestrado. A todos os meus tios e primos, pelo apoio e amizade!

À prof^a Dr^a Viviane Nogaroto Vicari, pelo auxílio com as técnicas de genética molecular e pela agradável convivência, bem como suas contribuições neste trabalho, que foram de grande ajuda! Agradeço também ao prof. Dr. Rodrigo Rodrigues Matiello as sugestões e correções em relação a este trabalho. E a ambos, o incentivo e a compreensão.

Ao prof. Dr. Orlando Moreira-Filho da Universidade Federal de São Carlos, pelo fornecimento das amostras, pelas sugestões e pelo auxílio com a revisão bibliográfica.

Ao técnico do laboratório de Citogenética e Evolução da UEPG, Miguel Airton Carvalho, por tantos anos de amizade! Só tenho a agradecer cada auxílio, cada conselho, por estar sempre presente! Sem dúvida, você é um “paizão” para todos nós!

Aos meus colegas e amigos de mestrado: Maelin, Neto, Tatiana, Karin, Stella, Michelle, Marília, Débora, Elise, Juliana, Aline, Simoní e Ricardo. Agradeço as conversas agradáveis, as dificuldades que superamos juntos, e desejo muita felicidade a todos vocês!

Aos colegas e amigos do laboratório: Bárbara, Kamila, Carin, Alain, Paulo, Leonardo, Cléberson, Talita, Danizinha, Johnatan, Bruno, Larissa, Marcela e Taís, pela excelente convivência, amizade e cooperação. Sucesso para vocês!

À prof^a Dr^a Daniele Matoso, do INPA, que muito me ajudou na graduação, pessoa a quem muito estimo!

Aos meus amigos: Elize, Alexandre, Paola, Simone e Vinícius, Daiane, Rafaela, Aline, Franciele, Carla, Mauro, Artur, Marcos, Leandro, Fernando, William e Marco. Obrigada pela presença nos momentos alegres e nos mais difíceis também!

Ao IBAMA, pelas autorizações na captura de peixes.

Ao CNPq pelo apoio financeiro, e à CAPES, pela bolsa concedida.

Agradeço a Deus, cada desafio enfrentado, cada descoberta, cada dificuldade, pois tudo isso fará de mim uma pessoa melhor e mais forte.

Sumário

RESUMO.....	11
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS.....	15
1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Considerações gerais sobre a bacia do rio Paraíba do Sul, sistemática, distribuição, filogenia e biologia dos representantes da família Characidae	17
1.2 Caracterização do gênero <i>Astyanax</i>	20
1.3 Caracterização citogenética de <i>Astyanax</i> , ênfase em <i>A. scabripinnis</i>	22
1.3.1 Os cromossomos B de <i>Astyanax</i>	24
1.3.2 DNAs REPETITIVOS As51 E DE rDNA EM <i>Astyanax</i>	26
1.4 Cromossomos B.....	31
2. JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS.....	36
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	38
3.1 Material biológico e local de coleta.....	38
3.2 Metodologias.....	40
4. RESULTADOS.....	41
4.1 Localização de sondas cromossômica e repetitivas em <i>Astyanax scabripinnis</i> (Characidae, <i>Incertae sedis</i>). Estudo da origem e diferenciação molecular do cromossomo B.....	42
5. CONCLUSÕES.....	66
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
7. ANEXOS.....	81

Resumo

A origem, manutenção e frequência dos cromossomos B presentes em algumas populações de *Astyanax* têm despertado interesse de grupos de citogeneticistas sobre um possível efeito benéfico ou deletério para a espécie. Estes cromossomos geralmente apresentam variações numéricas intra e interindividuais. O objetivo deste trabalho foi realizar uma análise citogenética da origem e diversificação molecular do cromossomo B de *Astyanax scabripinnis*, proveniente do córrego das Pedras, Campos do Jordão-SP. As análises mostraram um número diplóide de 50 cromossomos, fórmula cariotípica: 6m, 22sm, 10st e 12a, além da variação intra e interindividual de um macrocromossomo B. O macrocromossomo B heterocromático tem forma e tamanho similar ao maior par do complemento A (1º par metacêntrico). Em metáfase espermatogonial foi possível observar três metacêntricos grandes em células com $2n=51$ cromossomos. Já em paquíteno com 26 elementos cromossômicos foi observado apenas um bivalente grande, evidenciando que o cromossomo B realiza pareamento braço a braço. A localização *in situ* da sonda cromossomo B evidenciou este elemento totalmente marcado, além de pequenos sítios pericentroméricos e terminais nos cromossomos do complemento A, entre eles o par 24. Já a sonda As51 mostrou localização na maior parte do cromossomo B, além de 14 sítios autossômicos. Entre os sítios As51 está uma marcação intersticial do braço longo do par acrocêntrico 24. Por sua vez, a localização das sequências repetitivas C_ot-1 DNA, obtidas de exemplares sem cromossomo B, mostraram sinais nas regiões pericentroméricas e terminais de quase todos os cromossomos, incluindo o cromossomo B e o par 24. Nenhum sítio de rDNA foi observado no cromossomo B. Esses dados corroboram a hipótese da origem do cromossomo B a partir da formação de isocromossomo do par acrocêntrico 24. Ainda, a análise citogenética em meiose evidencia que o cromossomo B realiza pareamento braço a

braço, mecanismo que pode contribuir para a transposição de sequências, auxiliando assim a diversificação molecular do cromossomo B em relação ao complemento A. Dessa forma, este trabalho contribui para uma melhor compreensão da natureza molecular do cromossomo B em *A. scabripinnis*, bem como de sua origem e suas tendências evolutivas.

Abstract

The origin, maintenance and frequency of B chromosomes present in some population of *Astyanax* have been arousing interest of cytogeneticists groups about a possible beneficial or deleterious effect for the species. These chromosomes generally shows intra and interindividual numerical variation. The aim of this work was to perform a cytogenetical analysis on the origin and molecular differentiation of the B chromosomes of *Astyanax scabripinnis* from “Das Pedras” stream, Campos do Jordão, SP. The analysis showed a diploid number of 50 chromosomes, karyotypic formula 6m, 22sm, 10st and 12a, besides the intra and interindividual variation of a B macrochromosome. The heterochromatic B macrochromosome shows shape and size similar to the major pair of the A complement (1st metacentric pair). In spermatogonial metaphase was possible to observe three great metacentric chromosomes in cells with $2n=51$ chromosomes. However, was observed in pachitene cells with 26 chromosomal elements only one great bivalent, showing that the B chromosome performs arm-to-arm pairing. *In situ* localization with a B chromosome probe showed this element entirely marked, in addition to small pericentromerics and terminal sites in the A chromosomes complement, among them, the 24th pair. Besides, the As51 probe showed localization in the major part of the B chromosome, and also 14 autosomal sites. Between the As51 sites there is an interstitial marking in the long arm of the 24th acrocentric pair. On the other hand, the localization of the repetitive sequences C_ot-1 DNA, obtained from individuals without B chromosome, showed signals on the pericentromeric and terminal regions of almost all chromosomes, including the B chromosome and the 24th pair. No rDNA site was observed on B chromosome. This data corroborate the hypothesis of the origin of B chromosome through the formation of an isochromosome of the 24th acrocentric pair. Even, the cytogenetical analysis in meiotic cells shows that the B chromosome performs arm-to-arm

pairing, a mechanism that can contribute to the transposition of sequences, rising thus the molecular differentiation of the B chromosome in relation to the A complement. Therefore, this work contributes to a better comprehension of the molecular nature of the B chromosome in *A. scabripinnis*, as well as its origin and evolutionary trends.

Lista de Figuras

- Figura 1. Mapa do Brasil, em destaque a região sul/sudeste mostrando as bacias hidrográficas e o ponto de amostragem de *Astyanax scabripinnis* do presente estudo em Campos do Jordão, SP.....39
- Figura 2. Cariótipo de *A. scabripinnis* de Campos do Jordão (SP), Brasil. Em (a), coloração convencional (Giemsa). Em (b), os mesmos cromossomos, submetidos ao bandamento C sequencial, destacando as regiões heterocromáticas. Barra = 10µm.....58
- Figura 3. Células meióticas de espécimes de *A. scabripinnis* sem a presença de cromossomo B em coloração convencional (Giemsa). Em (a) metáfase espermatogonial com $2n=50$ cromossomos; (b) zigóteno inicial; (c) paquíteno inicial; (d) paquíteno final evidenciando 25 bivalentes completamente emparelhados; (e) desenho esquemático representativo dos 25 bivalentes em paquíteno final observado em (d); (f) diplóteno evidenciando 1 a 2 quiasmas por bivalente e; (g) metáfase II com número incompleto de cromossomos. Barras = 10µm.....59
- Figura 4: Células meióticas de espécimes de *A. scabripinnis* com a presença de cromossomo B em coloração convencional (Giemsa). Em (a) metáfase espermatogonial com $2n=51$ cromossomos, as setas indicam o primeiro par metacêntrico, a cabeça de seta mostra o cromossomo B heteropicnótico positivo; (b) metáfase II com 26 cromossomos; (c) paquíteno final mostrando 25 bivalentes e mais o provável cromossomo B autopareado, a seta indica o bivalente do maior par metacêntrico e; (d) desenho esquemático do paquíteno descrito em (c). Barras=10 µm.....60
- Figura 5: Metáfase mitótica de *A. scabripinnis* submetida à dupla FISH com sondas cromossômica e de DNAs repetitivos: localização da sonda cromossomo B. Em (a-d), metáfase sem cromossomo B. Em (a), contra-coloração DAPI. Em (b), localização da sonda do cromossomo B; em (c), localização do DNA repetitivo As51 e, em (d), sobreposição das imagens. (as cabeças de seta indicam outros sítios As51 além dos já indicados com o número correspondente ao par cromossômico) Barra = 10µm.....61
- Figura 6: Metáfase mitótica de *A. scabripinnis* submetida a dupla FISH com sondas cromossômica e de DNAs repetitivos: localização da sonda cromossomo B. Em (a-d), metáfases com cromossomo B. Em (a), contra-coloração DAPI. Em (b-d), é possível observar o cromossomo B totalmente hibridizado com a sonda cromossomo B e quase totalmente hibridizado com a sonda As51, a exceção das regiões terminais e centromérica. Barra = 10µm.....62
- Figura 7: Metáfase de *A. scabripinnis* submetida a dupla FISH com sonda cromossômica (cromossomo B) e de DNA repetitivo $C_{\theta}t-1$. Em (a-d) metáfase apresentando cromossomo B submetida a dupla FISH para a

localização das sondas cromossomo B (b) e do DNA repetitivo $C_{ot}-1$ obtido de espécimes sem cromossomo B (c). Em (a), contra-colocação DAPI. Em (b) é possível observar o cromossomo B totalmente localizado e destaque para o par a 24 portando sonda B em região pericentromérica; (c) cromossomo B portando sonda $C_{ot}-1$ em região pericentromérica e terminais, além do destaque para o par a 24 portando este DNA repetitivo em região pericentromérica; (d) sobreposição das imagens sonda cromossomo B e $C_{ot}-1$ DNA. Barra = 10 μ m.....63

Figura 8: Células paquítenicas de *A. scabripinnis* submetidas a localização *in situ* de sondas cromossômica e de DNAs repetitivos. Em (a-d) paquíteno submetido a localização da sonda cromossomo B (b); localização da sonda As51 (c) e; sobreposição das imagens (d). A seta destaca o cromossomo B com cerca da metade do tamanho do maior bivalente. Em (e-f) paquíteno incompleto com a localização da sonda DNA repetitivo $C_{ot}-1$ obtido de espécimes sem cromossomo B. Em (e) contra-coloração DAPI e; (f) sítios DNA repetitivo $C_{ot}-1$ localizados em regiões terminais e centroméricas da maioria dos bivalentes. Barras = 10 μ m.....64

Figura 9: Metáfases mitóticas de *A. scabripinnis* submetidas a dupla FISH com sondas de rDNA 18S e 5S. Em (a) contra-coloração DAPI; (b) localização *in situ* do rDNA 18S, com destaque para os pares m 4 e 10, além de uma marcação adicional (seta); (c) localização dos sítios rDNA 5S (cabeça de seta) e; (d) sobreposição das imagens (as setas indicam os sítios rDNA 18S e as cabeças de seta indicam os sítios rDNA 5S). Barras = 10 μ m.....65

1. Introdução

1.1 Considerações gerais sobre a bacia do rio Paraíba do Sul, sistemática, distribuição, filogenia e biologia dos representantes da família Characidae

Os peixes compreendem mais da metade dos vertebrados vivos, ultrapassando 32.500 espécies conhecidas, constituindo um grupo extremamente diverso, habitando os mais diferenciados ambientes aquáticos (NELSON, 2006). Grande parcela desta diversidade de espécies está na região Neotropical. Os ecossistemas aquáticos da Mata Atlântica Brasileira possuem uma fauna de peixes rica e variada, intimamente associada à floresta que proporciona proteção e alimento (MENEZES et al., 1990; MENEZES, 1994). Com a devastação da floresta, hoje reduzida a apenas 2 a 2,5 % de sua extensão inicial, houve uma profunda alteração, reduzindo a fauna original a uma fração do que existia no passado. O traço mais marcante desta fauna é o seu grau de endemismo, resultante do processo de evolução histórica das espécies, em uma área geomorfológica isolada das outras áreas onde se localizam as demais bacias hidrográficas brasileiras.

A bacia do rio Paraíba do Sul apresenta uma superfície de 55.400 km², ocupando uma área densamente povoada e urbanizada nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais (CEIVAP, 2008). Está situada no fundo de uma depressão tectônica entre a Serra do Mar e a Serra da Mantiqueira. O rio Paraíba do Sul é formado pela junção dos rios Paraibuna e Paraitinga, no estado de São Paulo. Seu percurso inicial é de leste para oeste, entretanto, na

altura da cidade de Guararema, é barrado por serras elevadas, invertendo seu curso em quase 180 graus no sentido horário, a partir daí, seguindo em direção oeste-leste, até sua desembocadura no oceano Atlântico, junto à cidade de São João da Barra, RJ (CEIVAP, 2008). Essa região é caracterizada por formações montanhosas, com muitos pequenos riachos que compreendem uma rica ictiofauna, onde é verificada a ocorrência de populações isoladas.

O isolamento entre populações restringe o fluxo gênico, aumentando a probabilidade dos acasalamentos ocorrerem entre indivíduos aparentados, tornando a população endogâmica. Também vale ressaltar que animais aquáticos mostram uma maior diversidade regional em regiões montanhosas onde há sistemas de rios isolados e o isolamento geográfico de espécies de peixes nas cabeceiras de rios pode levar estas comunidades a processos evolutivos importantes, culminando em especiação alopátrica (FUTUYMA, 2002).

Mecanismos de isolamento incluem barreiras físicas, químicas e bióticas, causando isolamento espacial; isolamento temporal; e barreiras comportamentais (LOWE-McCONNELL, 1969). Deste modo, estas populações isoladas passam a evoluir de maneira independente umas das outras devido à ausência de fluxo gênico entre elas. Consequentemente, a população pode se tornar altamente endogâmica. A endogamia promove um aumento da frequência dos genótipos homozigotos em ambas as extremidades do espectro fenotípico, enquanto diminuem os heterozigotos, ou seja, o fenótipo médio da população sofre um declínio (a menos que o loco em questão tenha ação sobredominante). Quando os alelos recessivos diminuem o valor adaptativo, serão eliminados mais rapidamente nessa população endogâmica do que em uma exogâmica. Assim, inicialmente a população sofrerá depressão endogâmica, porém eventualmente a seleção natural tende a eliminar os alelos deletérios e a população reconquista alta média de valor adaptativo. A menor variação genética em

populações endogâmicas se deve não somente ao endocruzamento em si, mas da ação combinada com a seleção natural e também a deriva genética (FUTUYMA, 2002).

A ordem Characiformes contém 18 famílias, 270 gêneros e aproximadamente 1674 espécies (NELSON, 2006; MOREIRA, 2007). Characidae é a maior e mais complexa família da ordem Characiformes com cerca de 780 espécies válidas, é também a mais diversificada da região Neotropical (FROESE e PAULY, 2010). Nos últimos anos, sua composição mudou muito com o reconhecimento das subfamílias Crenuchinae e Characidinae como pertencentes à família Crenuchidae, e a elevação do táxon africano Alestiinae, de subfamília a família (NELSON, 2006). Seus representantes são conhecidos popularmente como piranhas, lambaris, tetras, entre muitos outros e possuem hábitos alimentares muito diversificados (herbívoros, onívoros, carnívoros), sendo coletados com relativa facilidade nos cursos de água, tanto pela abundância de espécies como pelo grande número de espécimes encontrados (BRITSKI et al., 1988).

A ampla variedade de formas encontradas na família Characidae certamente está relacionada à sua condição polifilética. Do mesmo modo, Tetragonopterinae era tida como a mais especiosa entre as subfamílias de Characidae. Entretanto, pela carência de dados que suportariam o seu monofiletismo, foi considerada apenas com o gênero *Tetragonopterus* (LIMA et al., 2003). Os demais gêneros de Tetragonopterinae, entre eles *Astyanax*, foram listados em gêneros “*Incertae sedis*” em Characidae. No entanto, algumas das subfamílias de Characidae são consideradas monofiléticas por apresentarem certas especializações. Cheirodontinae, por exemplo, apresenta caracteres relacionados à morfologia dentária, à musculatura e ao padrão de colorido na região umeral, que suportam seu monofiletismo (MALABARBA, 1998). Apesar do grande

número de espécies encontradas, muitas delas, antes relatadas como abundantes em certos sistemas, estão cada vez mais raras e podem desaparecer por completo sem ao menos serem estudadas do ponto de vista biológico. Estes dados ressaltam a importância de uma investigação mais detalhada e aprofundada das relações filogenéticas e da diversidade de espécies de peixes, analisando caracteres morfológicos e moleculares (NELSON, 2006).

1.2 Caracterização do gênero Astyanax

O gênero *Astyanax* é um dos táxons de peixes de água doce mais amplamente distribuído nas Américas. Sua distribuição vai desde a Argentina até a fronteira do México com os Estados Unidos (BRITSKI, 1972). Seus exemplares possuem tamanho reduzido; nadadeira adiposa geralmente presente; linha lateral completa, pouco curva na frente; pré-maxilar não-protrátil; dentes pré-maxilares dispostos em duas séries, a interna com cinco dentes; dentes com cúspides; altura do corpo cerca de três vezes ou menos o comprimento padrão e escamas de tamanho normal, cobrindo apenas a base dos raios na nadadeira caudal (BRITSKI et al., 1988). São peixes não-migradores, com fecundação externa e ausência de cuidado parental.

Anteriormente alocado na subfamília Tetragonopterinae (GÉRY, 1977), *Astyanax* foi considerado como *Incertae sedis*, por não apresentar evidências consistentes de monofilismo (LIMA et al., 2003). Reis et al. (2003), naquele ano, listaram 86 espécies válidas para este gênero, o qual é apontado, juntamente com mais 87 gêneros da família Characidae, como taxonomicamente pouco conhecido e possivelmente não monofilético. Atualmente, são

reconhecidas 127 espécies válidas para o gênero *Astyanax* (FROESE e PAULY, 2010). No entanto, a maioria das descrições está baseada apenas em dados morfológicos, sem relatos de estudos ecológicos, fisiológicos, reprodutivos e genéticos. Sendo assim, é um grupo de especial interesse em estudos evolutivos e citogenéticos, representado por um grande número de espécies amplamente distribuída pela América do Sul e Central (BRITSKI et al., 1984).

Dentro deste gênero, encontra-se o “complexo de espécies” *Astyanax scabripinnis*, assim definido por Moreira-Filho e Bertollo (1991) com base em caracteres morfológicos e cromossômicos, os quais apresentam grande diversidade dentro deste táxon. Este complexo de espécies caracteriza-se por peixes de pequeno porte que habitam a cabeceira de pequenos rios de diferentes bacias hidrográficas brasileiras (CARAMASCHI, 1986). Esta espécie é de pequeno valor comercial, mas de grande importância na cadeia trófica de vários ecossistemas (FRAGOSO et al., 2008). Os canais de grandes rios atuam como barreiras biológicas para populações de pequenos afluentes, seja por competição com outras espécies de lambaris ou por predação por outras espécies, restringindo o fluxo gênico e reforçando a condição alopátrica entre eles. Assim, a tendência é de que as populações sigam diferentes caminhos evolutivos, estando sob diferentes pressões seletivas e, devido ao tamanho restrito da população, podem ser afetadas por deriva genética (KAVALCO e MOREIRA-FILHO, 2003; VICARI et al., 2008a). Diante destas características, o complexo de espécies “*Astyanax scabripinnis*” é considerado um excelente material para estudos genéticos e evolutivos.

1.3 Caracterização citogenética de *Astyanax*, ênfase em *A. scabripinnis*

O número diplóide do gênero *Astyanax* pode variar de 36, em *Astyanax schubarti* a 50, em *A. eigenmaniorum*, *A. mexicanus*, *A. taeniatus*, *A. lineatus*, *A. scabripinnis* (MOREIRA-FILHO e BERTOLLO, 1991) entre outros. Além da ampla diversidade cromossômica para o número diplóide, vários relatos têm demonstrado uma alta diversidade cariotípica neste gênero para a morfologia cromossômica, padrão de bandamento C, Regiões Organizadoras de Nucléolos (RONs), ocorrência de micro e macro cromossomos B, triploidia natural, localização de sítios de rDNA e DNAs satélites em populações naturais (MOREIRA-FILHO e BERTOLLO, 1991; MAISTRO et al., 1994; FAUAZ et al., 1994; MESTRINER et al., 2000; MANTOVANI et al., 2000; ABEL et al., 2006; PERES et al., 2008; VICARI et al., 2008 a, b; KANTEK et al., 2007; 2009a, b).

O taxa nominal *A. scabripinnis*, de acordo com Moreira-Filho e Bertollo (1991), representa um complexo de espécies. Neste estudo com caracteres cariotípicos e/ou morfológicos com análises de variáveis canônicas, Moreira-Filho e Bertollo (1991) diferenciaram seis das sete populações estudadas. Bertaco e Lucena (2006) relataram que este complexo de espécies é representado por aproximadamente 15 espécies. Recentemente, Vicari et al. (2008a) consideraram esse número possivelmente subestimado baseados em estudos citogenéticos em populações de *Astyanax* de cabeceiras de rios. Análises cariotípicas em populações do complexo “*Astyanax scabripinnis*”, pertencentes a diferentes córregos em uma mesma bacia hidrográfica, ou mesmo a diferentes bacias hidrográficas podem mostrar números diplóides específicos ($2n=46$, 48 e 50 cromossomos), bem como padrões particulares de bandamento C (MANTOVANI et al., 2000; MOREIRA-FILHO et al., 2004; VICARI et

al., 2008a) e variações no número de sítios de rDNA (MANTOVANI et al., 2005; VICARI et al., 2008a).

Apesar de populações simpátricas do complexo “*Astyanax scabripinnis*” com números diplóides diferentes já terem sido descritas, nenhuma ocorrência de indivíduos híbridos tem sido relatada (MIZOGUCHI e MARTINS-SANTOS, 1998a; VICARI et al., 2008a). Mizoguchi e Martins-Santos (1998a) estudaram quatro populações de *A. scabripinnis*, duas delas pertencentes à mesma bacia hidrográfica; uma delas apresentou número diplóide igual a 50 cromossomos, e a outra, um número diplóide de 48 cromossomos. Além disso, a população $2n=50$ apresenta três pares de cromossomos metacêntricos, enquanto a população $2n=48$ detém cinco pares metacêntricos. Segundo Moreira-Filho e Bertollo (1991), o grupo metacêntrico de cromossomos em *A. scabripinnis* costuma ser bastante conservado, enquanto a quantidade de cromossomos submetacêntricos, subtelocêntricos e acrocêntricos é mais variável. Vicari et al. (2008a) também estudaram populações simpátricas e sintópicas do complexo “*Astyanax scabripinnis*” com $2n=50$ e $2n=48$ cromossomos. Nesta análise citogenética comparativa observaram a presença de um par metacêntrico a mais (5 pares) para a população com $2n=48$ cromossomos. O número diplóide igual a 50 também foi a característica mais comumente encontrada para este complexo de espécies (MOREIRA-FILHO e BERTOLLO, 1991; SOUZA e MOREIRA-FILHO, 1995; ROCON-STANGE e ALMEIDA-TOLEDO, 1993; MAISTRO et al., 2000; NÉO et al., 2000a; b; MANTOVANI et al., 2005; VICARI et al., 2008a). No entanto, a ocorrência de $2n=48$ cromossomos já foi descrita para algumas populações de *A. scabripinnis*, pertencentes à bacia do alto rio Paraná (MOREIRA-FILHO e BERTOLLO, 1991; SOUZA et al., 1996; MIZOGUCHI e MARTINS-SANTOS, 1998a; MAISTRO et al., 2000; MANTOVANI et al., 2000; ALVES e MARTINS-

SANTOS, 2002; VICARI et al., 2008a). Além da diferença numérica, essas populações geralmente diferem daquelas com $2n=50$ cromossomos pela presença de um par diferenciado de cromossomos subtelocêntricos (MANTOVANI et al., 2000), submetacêntricos (MAISTRO et al., 2000) ou metacêntricos (VICARI et al., 2008a). Nestes três estudos, o número diplóide $2n=48$ cromossomos é considerado apomórfico e originado por evento de translocação Robertsoniana.

1.3.1 Os cromossomos B de *Astyanax*

A origem, a manutenção e a frequência dos cromossomos B presentes em algumas populações de *Astyanax* também têm despertado interesse de grupos de citogeneticistas sobre um possível efeito benéfico ou deletério para a espécie. Estes cromossomos geralmente apresentam variações numéricas intra e interindividuais, assim como podem diferir em tamanho e na morfologia (MESTRINER et al., 2000; NÉO et al., 2000a).

Cromossomos B foram descritos para 21 populações de *A. scabripinnis*, algumas destas isoladas das outras há milhões de anos em diferentes bacias hidrográficas e separadas por centenas de quilômetros (MOREIRA-FILHO et al., 2004). Geralmente, para a espécie *A. scabripinnis* este elemento supranumerário é caracterizado como um cromossomo metacêntrico grande, similar em tamanho ao primeiro par cromossômico do complemento (SALVADOR e MOREIRA-FILHO, 1992). Todavia, em algumas populações desta espécie podem se apresentar como microcromossomos (MIZOGUCHI e MARTINS-SANTOS, 1997), ou como metacêntricos pequenos e submetacêntricos grandes (NÉO et al., 2000a). O número de cromossomos B por indivíduo pode variar de zero a quatro, embora a presença de apenas um seja a mais frequente (NÉO et al., 2000a, b).

A frequência de cromossomos B no complexo “*Astyanax scabripinnis*” pode variar entre populações em seu modo de segregação. Rocon-Stange e Almeida-Toledo (1993) analisaram uma população de *A. scabripinnis* coletada no Rio Jucu – ES que apresentou cromossomos B exclusivamente em machos. Por sua vez, em um estudo realizado por Néo et al. (2000a) foi observada uma relação direta entre o aumento da altitude onde se encontra a população e a quantidade destes elementos supranumerários em *A. scabripinnis*. Neste mesmo estudo, foram descritos cromossomos B somente em populações isoladas acima de 1000 metros de altitude, além de ter sido verificada uma maior frequência de cromossomos B em espécimes fêmeas (VICENTE et al., 1996; NÉO et al., 2000a).

Moreira-Filho et al. (2001) verificaram a ocorrência de cromossomos B metacêntricos em populações de *A. scabripinnis*, *A. fasciatus* e *A. schubarti* de três bacias hidrográficas diferentes, porém a maior frequência de cromossomos B é relatada para *A. scabripinnis*. Por sua vez, em *Astyanax eigenmaniorum* também foram encontrados cromossomos B metacêntricos em populações com $2n=50$ cromossomos (STRIPECKE et al., 1985; apud MOREIRA-FILHO et al., 2004) e com $2n=48$ cromossomos (TORRES-MARIANO e MORELLI, 2008). Nesse sentido, Moreira-Filho et al. (2004) hipotetizaram que o cromossomo B metacêntrico grande teria uma origem remota comum dentro do gênero *Astyanax* e que, uma análise molecular destes cromossomos poderia auxiliar no entendimento de sua origem e dispersão. No entanto, não é possível descartar a hipótese de que os cromossomos B de diferentes populações/espécies no gênero *Astyanax* sejam eventos recorrentes.

Quatro tipos morfológicos de cromossomos B já foram relatados para *A. scabripinnis*: metacêntrico grande; microcromossomo; subtelocêntrico grande e metacêntrico pequeno

(Anexo I). A origem dos cromossomos B de *A. scabripinnis* das populações isoladas da Serra da Mantiqueira é descrita para um par autossômico (par 24) subtelo-acrocêntrico ancestral (VICENTE et al., 1996; NÉO et al., 2000b). Néo et al. (2000b) sugeriram que os cromossomos B de forma metacêntrica grande e a forma microcromossômica tenham se originado deste par cromossômico 24 por evento de formação de isocromossomo. Por sua vez, o cromossomo B submetacêntrico grande deve ter origem de uma inversão pericêntrica a partir do metacêntrico grande. Já o metacêntrico pequeno pode ter sido derivado do submetacêntrico grande por meio de deleções no braço longo (NÉO et al., 2000b).

A origem isocromossômica para o cromossomo B metacêntrico grande é suportada por estudos meióticos que verificaram a formação de univalentes que realizam pareamento entre seus braços em paquíteno, corroborando a hipótese que estes apresentam homologia (MESTRINER et al., 2000). Esta conformação meiótica do cromossomo B permitiria a ocorrência de trocas desiguais entre os braços cromossômicos, levando a padrões diferenciados de heterocromatina entre os cromossomos B (NÉO et al., 2000b).

1.3.2 DNAs repetitivos As51 e de rDNA em *Astyanax*

A citogenética de peixes Neotropicais vem aprimorando-se nos últimos anos no sentido de buscar respostas mais consistentes para os mecanismos de diversificação dos genomas das espécies. Muitos pesquisadores utilizam as sequências de DNAs repetitivos dos genomas para embasar suas teorias de evolução cariotípica. Mestriner et al. (2000) identificaram um DNA satélite 59% rico em AT no genoma de *A. scabripinnis*, com unidades monoméricas de 51 pb, denominado As51. Análises por hibridação *in situ* fluorescente (FISH) mostraram que este DNA está localizado principalmente nas heterocromatinas distais, em alguns sítios de RONS e

no cromossomo B da população analisada (MESTRINER et al., 2000). Essa sequência apresentou 58,8% de similaridade com uma porção do retrotransposon RT2 de *Anopheles gambiae* e menor homologia com o gene da transposase do transposon TN4430 do *Bacillus thuringiensis*, sugerindo que sua origem possa ter ocorrido a partir de um elemento transponível de DNA.

Estudos posteriores identificaram esta família de DNA satélite em outras populações de *A. scabripinnis*, assim como em *A. fasciatus*, *A. janeiroensis*, *Astyanax* sp. D e, *A. paranae* (MANTOVANI et al., 2004; ABEL et al., 2006, PAZZA et al., 2008; VICARI et al., 2008a; KANTEK et al., 2009a), evidenciando sua ocorrência não apenas no grupo *scabripinnis*, mas também entre diferentes espécies do gênero. O padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva constitui um dos melhores marcadores cromossômicos para discriminar populações locais de *A. scabripinnis* (MOREIRA-FILHO e BERTOLLO, 1991; MAISTRO et al., 1998) e *A. fasciatus* (ARTONI et al., 2006a; PAZZA et al., 2008), indicando que processos de diferenciação heterocromática/As51 podem estar diretamente envolvidos com a evolução cromossômica deste grupo. Todos os cinco taxa acima mencionados possuem grandes blocos distais de heterocromatina ou blocos intersticiais menores, principalmente em cromossomos subtelocêntricos e acrocêntricos, embora este DNA satélite possa também ocorrer em cromossomos meta e submetacêntricos.

Mantovani et al. (2004) mostraram que os blocos distais de heterocromatina com homologia para a sequência As51, presentes em duas populações distintas de *A. scabripinnis*, apresentavam respostas discordantes para fluorocromos base específicos, que não poderiam ser atribuídos à composição de bases do DNA satélite As51. Vicari et al. (2008b), estudando a composição da heterocromatina em uma outra espécie de *Astyanax*, *A. janeiroensis*,

mostraram que os 14 grandes blocos heterocromáticos, presentes nos cromossomos subtelocêntricos e acrocêntricos dessa espécie, eram compostos por duas famílias de DNAs repetitivos co-localizados, o satélite As51 e o rDNA 18S. É conhecido que nos peixes teleósteos, a fração espaçadora do rDNA maior geralmente apresenta-se rica em GC (AMEMIYA e GOLD, 1986; SCHMID e GUTTENBACH, 1988), enquanto o satélite As51 tem composição 59% AT. Assim sendo, é possível que a co-localização dos sítios GC do rDNA maior e AT do satélite As51 possa propiciar um efeito de competição entre os fluorocromos base específicos, Cromomicina A3 e 4'-6-diamidino-2-phenilindole (DAPI), com consequentes respostas atenuadas ou discordantes nestes domínios cromossômicos (VICARI et al., 2008b).

Elementos transponíveis de DNA são conhecidos como potentes agentes indutores de alterações no genoma hospedeiro (KIDWELL e LISCH, 2000; 2001; KIDWELL, 2002, DORER e HENIKOFF, 1997). O DNA satélite As51 tem origem provável a partir de um elemento transponível de DNA (MESTRINER et al., 2000). Significativamente, as sequências de rDNA 18S, presentes nos grandes domínios heterocromáticos As51 de *A. janeiroensis*, mostraram-se inativas evidenciando o silenciamento dos genes de rRNA quando co-localizados com o DNA satélite As51 (VICARI et al., 2008b).

Recentemente, Kantek et al. (2009a) realizaram um mapeamento comparativo por FISH, com sondas do DNA satélite As51, entre algumas espécies de *Astyanax*: *A. scabripinnis*, *A. paranae*, *A. janeiroensis*, *Astyanax* sp. D, *A. altiparanae* e *A. fasciatus*. *A. altiparanae* foi a única espécie que não apresentou sítios de DNA satélite em nenhuma das populações analisadas. Por outro lado, as demais espécies apresentaram extensas variações no número de cromossomos marcados (1 a 16 sítios As51). As espécies *A. paranae*, *A. janeiroensis*,

Astyanax sp. D e *A. altiparanae* apresentam número diplóide de 50 cromossomos (ARTONI et al., 2006a; DOMINGUES et al., 2007; VICARI et al., 2008a, b; KANTEK et al., 2009b) enquanto que diferentes populações de *A. scabripinnis* e *A. fasciatus* podem apresentar variações em seus números diplóides de 46 a 50 cromossomos (MOREIRA-FILHO e BERTOLLO et al., 1991; JUSTI, 1993). Apesar de sítios de DNA satélite serem prováveis alvos para quebras e fusões cromossômicas, o DNA satélite As51 não se mostrou associado aos rearranjos cromossômicos que modificaram os números diplóides em *A. scabripinnis* e *A. fasciatus* (KANTEK et al., 2009).

Esta família de DNA mostra-se basal para *A. scabripinnis*, *A. paranae*, *A. janeiroensis*, *Astyanax* sp. D, *A. fasciatus*, constituindo assim um grupo de espécies mais relacionadas quanto a esta característica, do que as outras espécies do gênero que não apresentam o satélite As51, como *A. altiparanae* (KANTEK et al., 2009a). Assim, a grande variação em número e posição de sítios As51 entre diferentes populações de uma mesma espécie deve ser decorrente do isolamento geográfico existente entre elas. Considerando ser o DNA satélite As51 derivado de um elemento transponível, cada população ou espécie poderia seguir vias evolutivas independentes, quer seja para o acúmulo e invasão de outros sítios cromossômicos, ou eliminação de sequências no genoma, acentuando assim as divergências cariotípicas entre as populações/espécies. Neste sentido, não se pode descartar um papel potencial do DNA satélite As51 nos processos de especiação do gênero *Astyanax*.

As famílias multigênicas de RNAs ribossomais 45S e 5S também são amplamente utilizadas em inferências de diversificação dos genomas em *Astyanax*. Os sítios de rDNA 45S ativos coincidem em localização com as RONS, enquanto as regiões 5S não estão associadas com esta região na intérfase. A localização *in situ* destas regiões são marcadores genéticos

válidos em citotaxonomia e estudos evolutivos (GALETTI Jr., 1998; MANTOVANI et al., 2005; entre outros). Entretanto, a análise por impregnação por prata (Ag-RON) apenas revela os sítios ativos na interfase precedente (MILLER et al., 1976). Por sua vez, para localizar diretamente os sítios cromossômicos portadores do rDNA 45S (sítios ativos e inativos) são utilizadas sondas desta região gênica em procedimentos de hibridação *in situ* fluorescente (FERRO et al., 2001).

O rDNA 45S codifica os RNAs 18S, 5,8S e 28S, enquanto o RNA 5S é codificado pelo rDNA 5S. Estudos apontam para uma variação intra/interindividual e inter populacional do rDNA 45S em *A. scabripinnis*, contrastando com um certo grau de conservação da localização do rDNA 5S (MANTOVANI et al., 2005; VICARI et al., 2008a). Sítios de RONS múltiplas é a condição comumente encontrada em populações de *A. scabripinnis* (FERRO et al., 2001; MANTOVANI et al., 2005; VICARI et al., 2008a). No tocante a localização dos sítios de rDNA 45S, para a maioria dos pares, não há evidências da conservação dos cromossomos portadores destes sítios de rDNA nos cariótipos entre diferentes populações, evidenciando a ampla plasticidade deste marcador em *A. scabripinnis*, possivelmente decorrente de eventos de transposição (SOUZA et al., 2007). Ainda, a presença de um cromossomo subtelocêntrico com RONS biteloméricas foi constatada em algumas populações do gênero *Astyanax*, como em *A. scabripinnis* (MANTOVANI et al., 2005; VICARI et al., 2008a) e *A. janeiroensis* (VICARI et al., 2008b).

Enquanto que variações interpopulacionais ocorrem no número de sítios de rDNA 18S em *Astyanax*, a localização dos sítios de rDNA 5S mostra evidências de sítios e cromossomos homeólogos entre populações/espécies do gênero (FERRO et al., 2001; ALMEIDA-TOLEDO et al., 2002; MANTOVANI et al., 2005; PERES et al., 2008; VICARI et al., 2008a;

FERREIRA-NETO et al., 2009). Sítios de rDNA 5S mostraram-se conservados em dois pares cromossômicos, um metacêntrico e outro acrocêntrico, na região proximal do braço longo, em populações do complexo *A. scabripinnis* (FERRO et al., 2001; ALMEIDA-TOLEDO et al., 2002; MANTOVANI et al., 2005; VICARI et al., 2008a). Em *Astyanax* sp. D do rio Iguaçu e *A. janeiroensis* o sítio de rDNA 5S foi localizado apenas em um par acrocêntrico em região proximal do braço longo, comparável àquele encontrado no complexo *A. scabripinnis* (KANTEK et al., 2007; VICARI et al., 2008b, respectivamente). Mantovani et al. (2000) propõem que sítios de rDNA 5S em posição proximal do braço longo indicam ser um padrão conservado para estes genes em *Astyanax*. Nesse sentido, os cromossomos portadores dos sítios de rDNA 5S são comparáveis entre as populações de *Astyanax* estudadas, no entanto, divergentes em morfologia cromossômica e número de sítios aos encontrados em outras populações do gênero.

1.4 Cromossomos B

Cromossomos B são cromossomos adicionais dispensáveis, não homólogos aos do complemento padrão e detectados em uma certa frequência na população (JONES e REES, 1982). Ocorrem em frequências variáveis em diferentes espécies de fungos, plantas, animais e podem ser instáveis durante a mitose ou a meiose. Estes cromossomos já foram descritos em mais de 1300 espécies de plantas e 500 espécies de animais, além de serem encontrados também em várias espécies de fungos, segundo revisão feita por Camacho et al. (2000). São elementos que não recombina com os cromossomos do complemento padrão e apresentam padrão de herança não-mendeliano. Estão presentes em aproximadamente 15% das espécies eucarióticas e na maior partes das vezes se comportam de maneira parasítica, mostrando taxas de transmissão mais alta que os cromossomos do complemento padrão e podem ter efeitos

prejudiciais aos seus portadores (TERUEL et al., 2009). Segundo Camacho et al. (2000), as influências destes cromossomos supranumerários podem oscilar entre efeitos parasíticos e neutros ou até mesmo efeitos benéficos.

Os cromossomos B podem ter origem intraespecífica, a partir de cromossomos do complemento padrão (A) ou de cromossomos sexuais, ou interespecífica: neste último caso, por meio de formação de híbridos entre duas espécies proximamente relacionadas (CAMACHO et al., 2000). Em peixes neotropicais, o primeiro cromossomo B foi detectado em *Prochilodus lineatus*, citado como *Prochilodus scrofa* (PAULS e BERTOLLO, 1983). Posteriormente foram observados em Prochilodontidae, Parodontidae, Characidae, Pimelodidae, Curimatidae, Callichthyidae, Loricariidae, Cichlidae e Coregonidae. A maioria dos cromossomos B é composta de DNA satélite, coincidindo com sua natureza heterocromática.

Camacho et al. (2000), descreveram as principais características acerca da frequência destes elementos em diferentes espécies e populações.

“Estes cromossomos têm sido descritos predominantemente em certos grupos taxonômicos, porém a alta frequência de B nestes taxa provavelmente reflete a intensidade e a facilidade técnica com que cada grupo tem sido estudado. Assim, é provável que muitas outras espécies, quando analisadas com intensidade suficiente, sejam descobertas como portadoras destes cromossomos”.

Cromossomos B podem atingir frequências extremamente altas em populações naturais, dependendo do quanto uma espécie particular pode tolerar estes elementos adicionais bem como da força do mecanismo de acúmulo dos cromossomos B, se estes existirem

(JONES, 1985; PARDO et al., 1994; CAMACHO et al., 2000). Uma frequência estável destes elementos é encontrada por muitos anos, o que, no passado, levou autores a concluir que o polimorfismo está num estado de equilíbrio e que a frequência é o resultado da ação de duas forças opostas: de acumulação do B, que tende a aumentar sua frequência e dos efeitos danosos ao valor adaptativo dos indivíduos portando cromossomos B, o que tende a diminuir sua frequência (ÖSTERGREN, 1945; NUR, 1966; 1977). Entretanto, o polimorfismo do cromossomo B pode ser interpretado como um sistema dinâmico no qual a frequência continuamente muda devido a forças opostas entre cromossomos do complemento A e B (CAMACHO et al., 2000).

Em adição, diferenças interpopulacionais na frequência de cromossomos B depende de fatores seletivos (por exemplo: a tolerância de portadores de cromossomos B em termos de permissividade das condições ambientais para uma população particular), fatores históricos (o número de gerações desde a origem do cromossomo B), fatores de transmissão (relacionados a diferenças entre populações na intensidade de acúmulo de cromossomos B) e fatores aleatórios (i.e. a ação da deriva genética em populações de tamanho finito) - (CAMACHO et al., 2000). Os quatro tipos de fatores provavelmente agem simultaneamente, tornando difícil avaliar a importância relativa de qualquer um separadamente, mesmo sob intensa análise. O número máximo de cromossomos B que uma espécie é capaz de tolerar, medido pelo número máximo destes elementos encontrados em indivíduos adultos varia amplamente, apesar de depender crucialmente das intensidades relativas dos fatores acima mencionados (CAMACHO et al., 2000).

Foram encontradas plantas de milho com 34 cromossomos B (envolvendo um aumento de 155% no conteúdo de DNA nuclear (JONES e REES, 1982), uma situação que é

provavelmente tolerada devido à sua domesticação. Em plantas selvagens, como *Lolium perene*, não foram encontrados indivíduos com mais de três cromossomos B, embora em *Allium schoenoprasum* tenham sido reportados até 20 cromossomos B (BOUGOURD et al., 1995). No gafanhoto *Eyprepocnemis plorans* é rara a ocorrência de mais de três cromossomos B em populações naturais, porém indivíduos da espécie de sapo endêmica da Nova Zelândia *Leiopelma hochstetteri* pode ter até 15 cromossomos B mitoticamente estáveis (GREEN et al., 1993).

Karavtseva e Roslik (2004), em uma ampla revisão a respeito de cromossomos B no rato do mato coreano, *Apodemus peninsulae*, verificaram uma ampla variação na morfologia, no número de cromossomos B e sua frequência relativa, em populações analisadas do sudeste e extremo leste (incluindo pequenas ilhas no Oceano Pacífico) da Rússia, leste da Mongólia, nordeste da China, nas Coreias do Norte e do Sul e na ilha de Hokkaido, no Japão. Classificaram os cromossomos B encontrados em macrocromossomos B (os quais eram variáveis em morfologia e tamanho); e microcromossomos B (cuja morfologia somente era possível de ser visualizada nas metáfases de melhor qualidade, do contrário, sendo visíveis somente como pequenas estruturas sem formato definido). A frequência dos cromossomos B nestas populações de *Apodemus peninsulae* foram extremamente variáveis, sendo que o número de cromossomos B encontrados teve uma amplitude de 0-24 cromossomos adicionais.

Nesse sentido, a variação do número de cromossomos B pode partir do princípio de:

- 1) frequência de formação de um B a partir de um A;
- 2) taxa de aumento do cromossomo B devido à amplificação do DNA ou à ação de outros mecanismos associados a reorganizações destes cromossomos B;
- 3) frequência de rearranjos de B levando a alteração de morfologia e tamanho;
- 4) direção e intensidade da seleção natural de portadores de B e;
- 5) direcionamento

meiótico de cromossomos B (RUBTZOV, 2009). A ausência de indivíduos sem B na maioria das populações analisadas e um grande número de cromossomos B em algumas delas sugere tanto um direcionamento meiótico positivo de Bs ou uma seleção natural positiva a respeito dos seus portadores (RUBTZOV, 2009).

Duas correntes têm postulado a respeito da presença e evolução de cromossomos B. Ambas assumem a manutenção dos B em populações naturais como resultado do equilíbrio de sua frequência, contudo devido a causas distintas. O modelo heterótico assume um papel adaptativo para os cromossomos B, especialmente quando em menor número (WHITE, 1973). Por outro lado, o modelo parasítico considera a manutenção dos cromossomos B como resultado do balanço entre sua taxa de transmissão e seu efeito sobre a adaptação do hospedeiro (ÖSTERGREN, 1945; NUR, 1966, 1977; JONES, 1985; SHAW e HEWITT, 1990, CAMACHO et al., 2000).

Cromossomos B ocorrem em diferentes táxons de peixes sul-americanos, devendo sua origem ter ocorrido de modo independente na história evolutiva de peixes de famílias diferentes. No entanto, para o gênero *Astyanax* algumas hipóteses buscam explicar a origem comum dos cromossomos B em diferentes espécies, de modo que estudos de citogenética molecular podem dar início ao entendimento da origem, manutenção e dispersão dos cromossomos B em algumas espécies do gênero.

2. Justificativas e Objetivos

A população de *A. scabripinnis* da região de Campos de Jordão, SP, Brasil, é caracterizada por apresentar uma alta frequência intra e interindividual de um macrocromossomo B totalmente heterocromático. As populações com maiores frequências deste cromossomo são aquelas isoladas por quedas da água em altitudes geralmente acima de 1920 m em relação ao nível do mar (NÉO et al., 2000b). Estas populações endêmicas, apesar de localizadas em ambiente aparentemente inóspito e não habitado por nenhuma outra espécie de peixe, mostram uma biologia reprodutiva normal. Uma questão central, associada a estas populações, refere-se a estratégia que deve ser utilizada para manter altos níveis de variabilidade e escapar dos problemas endogâmicos. Vicari et al. (2010) obtiveram por microdissecção cromossômica e localizaram *in situ* uma sonda do macrocromossomo B de *A. scabripinnis* de Campos de Jordão, SP. Nesse estudo, verificaram que o cromossomo B é altamente diferenciado em relação ao complemento A, mantendo identidade apenas com sítios do DNA satélite As51. Desta forma, a caracterização molecular deste macrocromossomo B e aprofundamentos em estudos meióticos poderiam dar início ao entendimento da origem, manutenção e diversificação deste cromossomo no genoma de populações endêmicas da espécie.

Objetivo geral:

1. Ampliar o conhecimento da composição, diversificação molecular e manutenção do macrocromossomo B de *A. scabripinnis* da população de Campos de Jordão, SP;

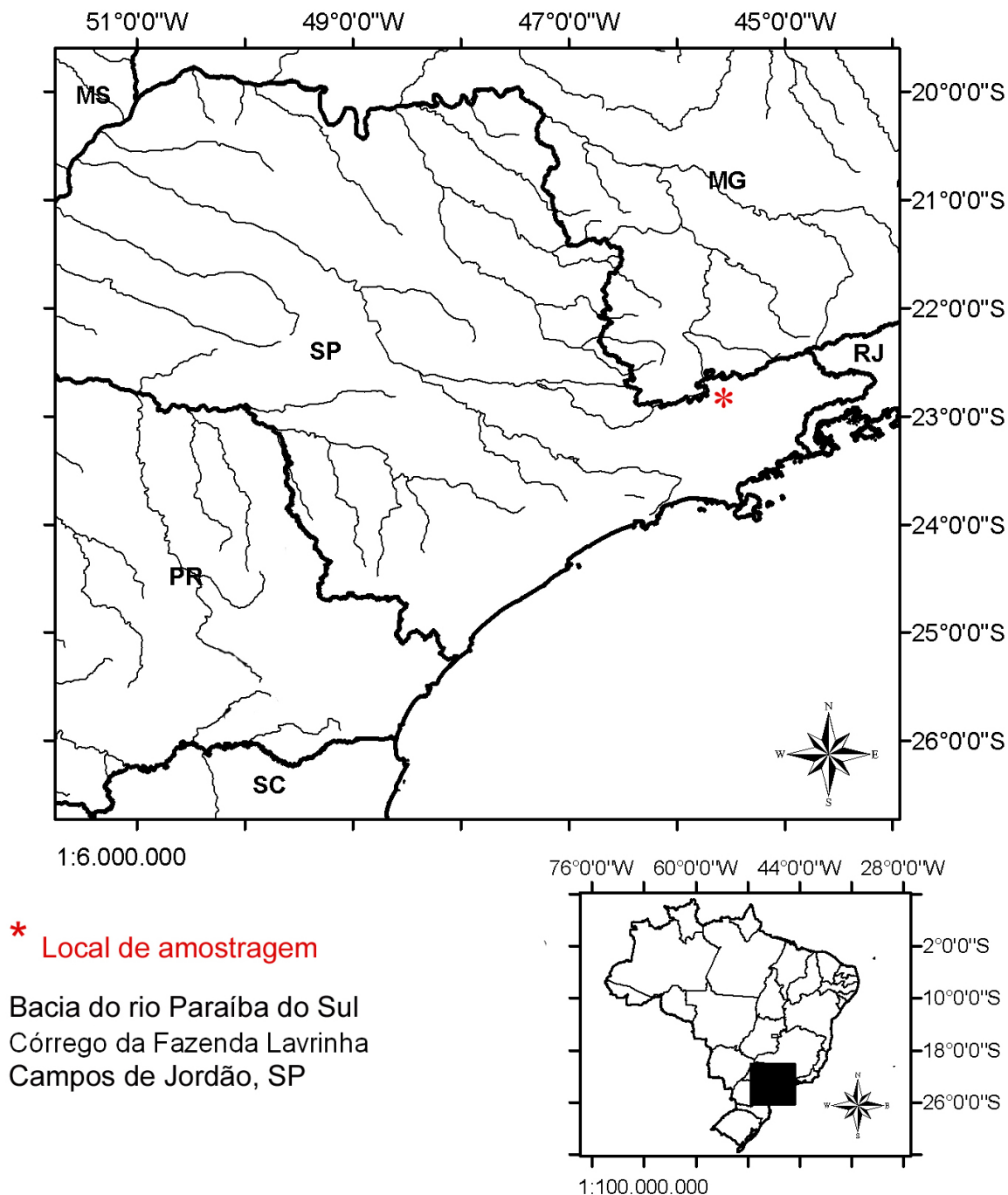
Objetivos específicos:

1. Mapear a sonda do macrocromossomo B em células mitóticas e meióticas de *A. scabripinnis*, buscando entender a diferenciação e distribuição deste cromossomo sobre o genoma e seu comportamento em células paquitênicas;
2. Prospectar DNAs repetitivos que possam ser resolutivos para o entendimento da diversificação genômica de *Astyanax*;
3. Localizar *in situ* sondas de DNAs repetitivos (As51, C_ot-1 DNA, rDNA 18S e 5S) visando esclarecer a composição do cromossomo B e inferir sobre sua diferenciação em relação ao complemento A.

3. Material e Métodos

3.1 Material biológico e local de coleta

Foram estudadas citogeneticamente espécimes de *Astyanax scabripinnis* do córrego da Fazenda Lavrinha, bacia do Rio Paraíba do Sul, no município de Campos de Jordão, SP, em populações isoladas em cabeceiras de rios a altitudes de 1200 a 1920m (Figura 1). O material cromossômico foi obtido via preparação de espécimes coletados na natureza com licença do SISBIO MMA/IBAMA (Anexo II), ou a partir do banco de preparações cromossômicas do Laboratório de Citogenética e Evolução da 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 III).



.Figura 1. Mapa do Brasil, em destaque a região sul/sudeste mostrando as bacias hidrográficas e o ponto de amostragem de *Astyanax scabripinnis* do presente estudo em Campos do Jordão, SP.

3.2 Metodologias

As preparações cromossômicas mitóticas foram obtidas pela técnica de “*air-drying*”, conforme descrito por Bertollo et al. (1978) – (Anexo IV). Os cromossomos meióticos foram obtidos pela técnica descrita por Kligerman e Bloom (1977), com algumas adaptações (BERTOLLO et al., 1978) - (Anexo V). O bandamento C seguiu o procedimento descrito por Sumner (1972) – (Anexo VI). Foi utilizada a hibridação *in situ* fluorescente (FISH) para mapear as sequências do cromossomo B, do DNA satélite As51, dos rDNA 18S e 5S e da sonda C₀t total sobre os cromossomos de *A. scabripinnis*. As sondas foram obtidas e gentilmente cedidas por: sonda cromossomo B (VICARI et al., 2010); sonda DNA satélite As51 (MESTRINER et al., 2000); sonda rDNA 18S (HATANAKA e GALETTI Jr, 2004); sonda rDNA 5S (MARTINS E GALETTI Jr, 1999). Os procedimentos de marcação das sondas foram realizados por reação de *Nick Translation* conforme as orientações dos fabricantes (Anexo VII). Os cromossomos B, após submetidos ao bandamento C, foram microdissectados por Vicari et al. (2010) (Anexo VIII). As reações de DOP-PCR para amplificação da sonda cromossomo B seguiram os procedimentos descritos por Telenius et al. (1992), com as adaptações para cromossomos submetidos ao bandamento C (VICARI et al., 2010) – (Anexo IX). A obtenção do DNA repetitivo total baseado na cinética de reassociação C₀t-1 foi realizada de acordo com Zwick et al. (1997) e recentemente adaptado por Ferreira e Martins (2007) para isolamento de DNAs repetitivos em peixes (Anexo X). O procedimento geral da FISH baseou-se na técnica descrita por Pinkel et al. (1986) – (Anexo XI). Os cromossomos foram organizados em ordem decrescente de tamanho e de acordo com a morfologia (LEVAN et al., 1964), obedecendo à regra de razão de braços (Anexo XII).

4. Resultados

Os resultados estão organizados em um capítulo correspondente ao artigo científico:

Capítulo I

Localização de sondas cromossômica e repetitivas em *Astyanax scabripinnis* (Characidae, *Incertae sedis*). Estudo da origem e diferenciação molecular do cromossomo B

Manuscrito em preparo a ser submetido ao periódico Micron.

4.1 Localização de sondas cromossômica e repetitivas em *Astyanax scabripinnis* (Characidae, *Incertae sedis*). Estudo da origem e diferenciação molecular do cromossomo B

Resumo

Neste estudo foi realizada análise citogenética convencional e molecular em espécimes de *Astyanax scabripinnis* provenientes do córrego das Pedras, Campos de Jordão-SP, Brasil. A análise mitótica convencional mostrou um número diplóide de 50 cromossomos, 6m+22sm+10st+12a, além da ocorrência intra e interindividual de um macrocromossomo B. O cromossomo B heterocromático tem tamanho e forma similar ao primeiro par metacêntrico, maior par do complemento. Utilizando a técnica de dupla FISH (fluorescent *in situ* hybridization) para a localização das sondas cromossomo B, DNA satélite As51, C_{ot}-1 DNA e rDNAs 18S e 5S foi possível inferir que o cromossomo B tem origem por formação de isocromossomo a partir de um elemento semelhante ao par acrocêntrico 24. Na análise por meiose convencional em espécimes portando cromossomo B, em metáfase espermatogonial, foram observados três cromossomos metacêntricos grandes. No entanto, em paquíteno com 26 elementos cromossômicos, apenas um bivalente grande é visualizado, sugerindo o pareamento braço a braço do cromossomo B. Ainda, é discutida a diversificação molecular do cromossomo B em relação aos elementos do complemento A.

Palavras chave: Pintura cromossômica; DNA satélite As51; rDNA; diversificação cariotípica; C_{ot}-1 DNA.

Introdução

Cromossomos supranumerários ou B, também denominados de acessórios ou extras, são cromossomos adicionais, dispensáveis, e não homólogos aos do complemento padrão. Em determinadas espécies podem ocorrer nas populações com frequências intra/interindividuais variáveis. Algumas hipóteses buscam explicar sua origem, frequência e evolução, como derivação de autossomos seguida de silenciamento de genes, heterocromatinização, acúmulo de DNA repetitivo e transposons (CAMACHO et al., 2000). Além disso, eles podem ser diferentes morfologicamente dos cromossomos A, apresentam um padrão de herança não Mendeliano e podem apresentar mecanismos de acúmulo (BEUKEBOOM, 1994).

Duas teorias buscam explicar a manutenção dos cromossomos B em populações naturais. A primeira aceita a hipótese do cromossomo B conferir alguma vantagem adaptativa ao indivíduo portador, principalmente quando em menor número (WHITE, 1973). Na segunda, se aceita que a manutenção dos cromossomos B é resultado de um acúmulo de fatores, entre eles a geração de células germinativas com diferentes quantidades de Bs durante a embriogênese e o amadurecimento preferencial de células com alta quantidade de Bs nas linhagens de células germinativas (ÖSTERGREN, 1945; NUR, 1966; 1977; JONES, 1985; PARDO et al., 1995; CAMACHO et al., 2000).

Pertencente a ordem Characiformes e listado entre os *Incertae sedis* na família Characidae (LIMA et al., 2003), a espécie *Astyanax scabripinnis* apresenta cromossomos B em algumas populações (VICENTE et al., 1996; NÉO et al., 2000 a; b). A forma e o número destes cromossomos podem variar em diferentes populações de *A. scabripinnis*, no entanto, a ocorrência de um macrocromossomo B, similar em tamanho ao primeiro par cromossômico é a condição mais usual (NÉO et al., 2000a). Estudos meióticos mostraram que os cromossomos

B de *A. scabripinnis* têm comportamento não mendeliano e formam univalentes durante a meiose, por meio de pareamento entre os braços cromossômicos (MESTRINER et al., 2000).

Elementos de DNA repetitivos já foram mapeados sobre o macrocromossomo B de *A. scabripinnis*. Mestriner et al. (2000) identificaram um DNA satélite 59% rico em AT no genoma desta espécie, com unidades monoméricas de 51 pb, denominado As51. Análises por hibridação *in situ* fluorescente (FISH) mostraram que este DNA está localizado principalmente nas heterocromatinas distais, em alguns sítios de regiões organizadoras de nucléolo (RONS) e no cromossomo B da população analisada (MESTRINER et al., 2000).

Neste trabalho foi analisado o comportamento, a composição, além da diferenciação do cromossomo B de *A. scabripinnis* em relação aos elementos do complemento A em células mitóticas e meióticas, com base na utilização de sondas do cromossomo B total e sondas de DNAs repetitivos.

Material e Métodos

Foram estudados citogeneticamente 10 exemplares de *A. scabripinnis*, (4 machos e 6 fêmeas) coletados no córrego da Fazenda Lavrinha, bacia do rio Paraíba do Sul, Campos do Jordão (SP), Brasil. Foram analisadas pelo menos 30 metáfases por indivíduo. As populações de *A. scabripinnis* foram capturadas em altitudes de 1200 a 1920 metros em relação ao nível do mar.

As preparações cromossômicas mitóticas foram obtidas das células do rim anterior usando o procedimento de *air drying* (BERTOLO et al., 1978). Por sua vez, os cromossomos meióticos foram obtidos pela técnica descrita por Kligerman e Bloom (1977), com algumas adaptações (BERTOLLO et al., 1978). As preparações cromossômicas foram submetidas à

coloração convencional por Giemsa e bandamento C (SUMNER, 1972) para a determinação do número diplóide, fórmula cromossômica, distribuição da heterocromatina e presença de cromossomos B. Os cromossomos foram organizados em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subteloicêntricos (st) e acrocêntricos (a) dependendo da razão de braços (LEVAN et al., 1964), e arranjados em decréscimo de tamanho nos respectivos cariótipos. Para a análise do cromossomo B, sondas do próprio cromossomo B e de DNAs repetitivos foram utilizadas sobre células meióticas e mitóticas desta espécie, conforme procedimentos a seguir.

Reação de DOP-PCR do cromossomo B de A. scabripinnis

A sonda cromossomo B de *A. scabripinnis* foi obtida utilizando-se um microscópio invertido IX51 (Olympus) equipado com micromanipulador mecânico Transferman (Eppendorf) em preparações mitóticas submetidas ao bandamento C (VICARI et al., 2010).

Os cromossomos B recuperados foram então 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 (VICARI et al., 2010). Os produtos obtidos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, observando-se um arrasto de tamanho esperado entre 100 – 400 pb.

Uma segunda reação de amplificação foi realizada utilizando 100 ng do primeiro produto de PCR num volume final de 50 µl. A reação foi composta de tampão (200 mM Tris pH 8.4, 500 mM KCl) 1x da *Taq* DNA polimerase (Invitrogen); 2 mM MgCl₂; 400 µM de dNTP, 2µM de primer DOP = 5'-CCGACTCGAGNNNNNNATGTGG-3' e 2 U de *Taq* DNA polimerase. As reações de polimerização foram realizadas em termociclador Biocycler

programado da seguinte maneira: 3 minutos a 94°C; 35 ciclos de 1 minuto e 30 segundos a 90°C, 1 minuto e 30 segundos a 52°C e 1 minuto e 30 segundos a 72°C, finalizando com um ciclo de 5 minutos a 72°C.

Obtenção da sonda de DNA repetitivo total baseado na cinética de reassociação $C_{ot}-1$

O DNA genômico total de um exemplar de *A. scabripinnis* sem cromossomo B foi utilizado no procedimento $C_{ot}-1$ DNA (ZWICK et al., 1997) adaptado para obtenção de DNAs repetitivos em peixes (FERREIRA e MARTINS, 2007; VICARI et al., 2010). O DNA genômico com concentração de 500 ng/ μ L em solução de NaCl 0,3 mol/L foi autoclavado (121 °C, $1,034 \times 10^5$ Pa) por 5 minutos para obter fragmentos entre 100 e 2000 pb. Amostras de 50 μ L do DNA autoclavado foram então desnaturadas a 95 °C por 10 minutos, colocadas em gelo por 10 segundos e, posteriormente, incubadas a 65 °C por 3 minutos para reanelamento das fitas. A seguir, foram adicionados 1 U nuclease S1 (Promega), 1x tampão [20mM Tris-HCl (pH 7.5 at 25°C), 0.1mM $ZnCl_2$, 50mM NaCl e 50% (v/v) glicerol] da enzima para 1 μ g DNA e deixados a 37 °C por 8 min. Por último, a fração repetitiva deste DNA foi recuperada congelando-o imediatamente em nitrogênio líquido e realizando uma extração via fenol-clorofórmio. Após precipitação o DNA repetitivo total foi ressuspendido em 20 μ L de H_2O ultrapura para posterior realização da localização *in situ*.

Hibridação in situ fluorescente (FISH)

Essencialmente, foram utilizadas uma sonda cromossômica (sonda cromossomo B) e quatro sondas de DNA repetitivos para mapeamento destas regiões sobre os cromossomos da

espécie *A. scabripinnis* (DNA satélite As51; sonda C₀t-1 total; rDNA 18S e rDNA 5S). A sonda cromossomo B foi marcada em reação de DOP-PCR utilizando o nucleotídeo modificado biotina 14-dATP (Invitrogen). A reação da PCR consistiu de: tampão 1x da *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), 2 mM MgCl₂, 400 µM dTTP, dGTP e dCTP, 200 µM de dATP, 200 µM de dATP 14- biotina, 2 µM DOP primer e 2 U de *Taq* DNA polimerase. As sondas DNA satélite As51; C₀t-1 total; rDNA 18S foram marcadas pela técnica de nick translation, utilizando o composto digoxigenina 16 - dUTP (Dig Nick Mix - Roche), e a sonda rDNA 5S foi marcada com biotina pela técnica de nick translation, utilizando o composto biotina 16 - dUTP (Nick Translation Biotin - Roche). 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 contracorados 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).

Resultados

A análise citogenética dos exemplares de *A. scabripinnis* provenientes da população de Campos de Jordão (SP) apresentou 2n=50 cromossomos para o complemento padrão e, adicionalmente foi observada uma variação intra e interindividual de 0 - 1 macrocromossomo B nos espécimes estudados (Figura 2). O macrocromossomo B tem tamanho e forma similar ao primeiro par cromossômico. A fórmula cariotípica do complemento A é composta por 6m+22sm+10st+12a, sem a presença de cromossomos sexuais heteromórficos (Figura 2). A análise do bandamento C evidenciou blocos heterocromáticos nas regiões terminais de

cromossomos subtelo/acrocêntricos, em regiões pericentroméricas da grande maioria dos cromossomos, pequenas bandas intersticiais nos pares 1, 15, 20 e 24, bem como, o cromossomo B totalmente heterocromático (Figura 2b).

O estudo de células mitóticas espermatogoniais em indivíduos sem a presença de cromossomos B mostrou a ocorrência de 50 cromossomos, confirmando a fórmula cariotípica obtida com células mitóticas (Figura 3a). O estudo da cronologia de células meióticas possibilitou a separação e subdivisão de algumas fases da prófase I, utilizando como parâmetro o emparelhamento dos cromossomos homólogos. A análise de células em zigóteno inicial evidenciou que os bivalentes estão quase totalmente emparelhados (Figura 3b), em paquíteno inicial os bivalentes estão totalmente emparelhados (Figura 3c), tornando-se mais espessos, mais curtos e mais visíveis em paquíteno final (Figura 3d). Nas células diplotênicas observa-se o início da repulsão dos homólogos, permanecendo próximos pelas regiões de quiasmas, sendo possível observar a formação de 25 bivalentes e a ocorrência de 1 a 2 quiasmas por bivalente (Figura 3f). Nestas células não foi possível observar nenhum cromossomo com comportamento diferenciado que representasse os cromossomos sexuais.

A análise das células com cromossomos B mostrou em metáfases espermatogoniais a ocorrência de 51 cromossomos sendo o cromossomo B de tamanho similar ao par 1 com os braços heteropicnóticos positivos (Figura 4a). Em células paquitênicas foram observados 25 bivalentes, sendo encontrado somente um bivalente grande, assim o cromossomo B provavelmente apresenta-se como um univalente com emparelhamento braço a braço (Figura 4c).

A análise por dupla FISH com a sonda B e sonda As51 em metáfases de indivíduos sem a presença de cromossomo B mostrou a sonda B em pequenos sítios pericentroméricos e terminais de alguns pares cromossômicos (Figura 5b). Já o DNA satélite As51 foi localizado

em 14 sítios cromossômicos (Figura 5c). A sobreposição das imagens evidenciou que essas sondas são co-localizadas em alguns sítios cromossômicos (par 20, entre outros) e, em cinco cromossomos (par 24 mais 3 cromossomos) essas sondas estão presentes no mesmo cromossomo, porém em sítios distintos (Figura 5d). A dupla FISH com essas mesmas sondas (sonda B e As51) em metáfases com a presença do macrocromossomo B evidenciou este cromossomo totalmente marcado com a sonda B, além dos pequenos sítios pericentroméricos e terminais de alguns pares cromossômicos (Figura 6b). O DNA satélite As51 foi localizado em grande parte do cromossomo B a exceção das regiões terminais e centromérica (Figura 6c). A sobreposição destas imagens evidencia além do cromossomo B, cinco cromossomos com a presença da sonda B e As51 em sítios distintos (Figura 6d). Por sua vez, a dupla FISH utilizando as sonda B e $C_{ot}-1$ DNA proveniente de genomas sem o cromossomo B mostrou que os DNAs repetitivos obtidos da sonda $C_{ot}-1$ DNA foram localizados em regiões terminais e pericentroméricas da maioria dos cromossomos e também no cromossomo B (Figura 7 b, c, d).

A dupla FISH com a sonda B e sonda As51 em células paquitênicas mostrou que estas sondas localizam sobre um cromossomo com a metade do tamanho do bivalente maior (primeiro par metacêntrico), além de alguns sítios menores em outros bivalentes (Figura 8 a, b, c, d). A hibridação da sonda $C_{ot}-1$ DNA sobre célula paquitênica sem cromossomo B evidenciou sítios em regiões terminais e centromérica da grande maioria dos bivalentes (Figura 8 e, f).

A localização *in situ* com as sondas ribossômicas não mostrou sinais positivos sobre o cromossomo B (Figura 9). Foram observados sítios de rDNA 18S em regiões terminais de cinco cromossomos (Figura 9 b) e seis sítios intersticiais de rDNA 5S (Figura 6 c) sempre em cromossomos independentes (Figura 9 d).

Discussão

O complexo de espécies *A. scabripinnis* tem variação do número diplóide de 46 a 50 cromossomos (MOREIRA-FILHO e BERTOLLO, 1991). Vicari et al. (2008a) em uma análise citogenética comparativa inferem que o caracter $2n = 50$ cromossomos é plesiomórfico no complexo *Astyanax scabripinnis* e rearranjos do tipo translocação Robertsoniana originariam populações de menor número diplóide.

A localização da heterocromatina constitutiva evidenciou bandas pericentroméricas em todos os cromossomos, alguns pequenos blocos terminais, um bloco C positivo no braço curto do cromossomo 10, o qual é caracterizado por apresentar rDNA 18S e DNA satélite As51 interspaçado, assim como um bloco na região terminal do braço longo do par acrocêntrico 20 de composição As51, como também visualizado por Mestriner et al. (2000). A banda heterocromática em região intersticial do par acrocêntrico 24 observada por Vicente et al. (1996), no presente estudo, apresentou composição As51 e situação polimórfica entre os homólogos. Além dos seis sítios As51 já descritos, oito sítios As51 pequenos foram observados em regiões terminais dos cromossomos. Ainda, o bandamento C mostrou o cromossomo B totalmente heterocromático e, em sua maior parte, de composição As51, a exceção das regiões terminais e centromérica. Estudos anteriores evidenciaram que este cromossomo B apresentava blocos de heterocromatina apenas em regiões intersticiais de ambos braços cromossômicos (VICENTE et al., 1996; MESTRINER et al., 2000). Nesse sentido, é possível hipotetizar que este macrocromossomo B vem, ao longo dos anos, sofrendo um processo de heterocromatinização, como proposto para a teoria da diversificação do cromossomo B (JONES e REES, 1982; CAMACHO et al., 2000).

A análise convencional em células meióticas com $2n=50$ cromossomos mostrou um comportamento normal, emparelhamento total em 25 bivalentes no paquíteno, repulsão e formação de um a dois quiasmas por bivalente em diplóteno. Por sua vez, em metáfases espermatogoniais que apresentaram 51 cromossomos, foi observado que o macrocromossomo B é heteropicnótico positivo e de tamanho similar ao maior bivalente (primeiro par metacêntrico). No entanto, apenas um bivalente grande correspondente ao primeiro par foi observado em células com 26 elementos em paquíteno. Dessa forma, o macrocromossomo B realiza emparelhamento braço a braço em paquíteno, permanecendo nesta fase com metade do tamanho do maior bivalente e, de acordo com a teoria de origem do B de *A. scabripinnis* por mecanismos de formação de isocromossomo (MESTRINER et al., 2000; NÉO et al., 2000a).

A origem dos cromossomos supranumerários, na maioria das vezes, é desconhecida e controversa. Grande parcela dos autores aceita a hipótese que estes segmentos cromossômicos surgem a partir de elementos do complemento A (CAMACHO e CABRERO, 1987; PALOMEQUE et al., 1993; JESUS et al., 2003; ARTONI et al., 2006b). Outras teorias buscam explicar a origem do cromossomo B como não derivada dos elementos do complemento A (ZIEGLER et al., 2003). A origem heteróloga do cromossomo B foi utilizada para explicar a origem do cromossomo B gigante do peixe *Alburnus alburnus*, o qual apresenta o cromossomo B composto de DNA repetitivo disperso do tipo retrotransposon, o qual não está presente nos cromossomos A da espécie (ZIEGLER et al., 2003).

Algumas hipóteses buscam explicar a origem do macrocromossomo B de *A. scabripinnis*. Baseados no tamanho e morfologia do cromossomo B (SALVADOR e MOREIRA-FILHO, 1992) propuseram que sua origem foi a partir da não disjunção do primeiro par metacêntrico. Atualmente, a teoria amplamente aceita relata que o cromossomo B

de *A. scabripinnis* foi originado a partir da formação de isocromossomo em um elemento do par acrocêntrico 24 (MESTRINER et al., 2000; NÉO et al., 2000a; MOREIRA-FILHO et al., 2004). Esta hipótese está baseada na presença de uma banda heterocromática intersticial no braço longo deste par, a qual, posterior a formação de isocromossomo, daria origem aos sítios As51 intersticiais e em distâncias simétricas em relação ao centrômero em ambos os braços do cromossomo B (MESTRINER et al., 2000).

No presente estudo, a localização da sonda cromossomo B, obtida por microdissecção posterior ao bandamento C (VICARI et al., 2010) mostrou a composição altamente repetitiva do cromossomo B, o qual mantém identidade com pequenas regiões centroméricas ou terminais do complemento A. A dupla FISH sonda B e satélite As51 evidenciou que o cromossomo B tem enormes sítios As51, a exceção das regiões terminais e centromérica. Esta dupla FISH evidenciou a correspondência sonda B e As51 na região terminal do par acrocêntrico 20, entre outros sítios menores. No entanto, em cinco cromossomos foi possível observar que a sonda B e As51 são localizadas no mesmo cromossomo, porém em sítios distintos. Um destes cromossomos foi o acrocêntrico 24, o qual apresenta As51 em região intersticial do braço longo e sonda cromossomo B em região pericentromérica. Ainda, a obtenção da sonda $C_{ot}-1$ do DNA genômico de espécime sem cromossomo B e, posterior localização *in situ* desta sonda sobre os cromossomos de *A. scabripinnis* evidenciou sinais pericentroméricos e terminais em vários cromossomos, entre eles o acrocêntrico 24 e o cromossomo B. A localização destas sondas repetitivas corrobora a hipótese da origem do cromossomo B a partir do elemento do complemento A 24 a partir da formação de isocromossomos (MESTRINER et al., 2000; NÉO et al., 2000a). Ainda, demonstram que o macrocromossomo B de *A. scabripinnis* tem sequências compartilhadas do satélite As51 e de DNAs repetitivos centromérico e terminais em relação ao complemento A. No entanto,

devido a baixa identidade da sonda B com o complemento padrão demonstram que este cromossomo B vem sofrendo mecanismos de diferenciação molecular.

Além da origem, a localização destas sondas cromossômica e repetitivas sobre células meióticas paquitênicas permite elaborar inferências sobre a diversificação molecular do cromossomo B. A localização das sondas cromossomo B e As51 em paquíteno mostraram o cromossomo B pareado braço a braço em uma estrutura semelhante a um bivalente. Entretanto, ao contrário do relatado por Mestriner et al. (2000), no presente estudo não foram encontradas evidências de ocorrências de quiasmas no cromossomo B autopareado. Gray (2000) descreveu um mecanismo de recombinação ectópica entre cópias de elementos repetitivos dispersos em cromossomos não homólogos, dessa forma, não dependentes de *crossing-over*. Esse mesmo mecanismo foi utilizado por Vicari et al. (2008b) para explicar a co-localização dos DNAs repetitivos As51 e do rDNA 18S em 14 grandes domínios heterocromáticos da espécie *Astyanax janae*. Dessa forma, esse mesmo mecanismo pode ser utilizado para explicar a heterocromatinização por dispersão de sequências de DNAs repetitivos, principalmente o As51, entre os braços autopareados do cromossomo B, sem a necessidade de *crossing-over*. O autopareamento dos braços destes cromossomos facilitaria trocas ectópicas de sequências. Assim, mutações ao acaso em sequências do cromossomo B poderiam ser espalhadas entre os braços, dessa forma, atuando na heterocromatinização do cromossomo B e na sua diversificação molecular em relação ao complemento A. Ainda, é possível inferir que o cromossomo B de *A. scabripinnis* se mantém em populações endogâmicas incorporando as taxas mutacionais e consequente divergência molecular em relação aos cromossomos do complemento A, com os quais realiza pouca ou nenhuma troca. Contudo, análises mais aprofundadas ainda são necessárias para esclarecer definitivamente o

comportamento do cromossomo B na meiose. Do mesmo modo, análise da divergência molecular das sequências do cromossomo B e do complemento A poderia auxiliar no entendimento da diferenciação deste cromossomo.

Em peixes são raras as descrições da presença de sítios de rDNA nos cromossomos B. A presença do rDNA 18S já foi descrito sobre o microcromossomo B de *Moenkhausia sanctaefilomenae* (DANTAS et al., 2007) e no cromossomo B do ciclídeo africano *Haplochromis obliquidens* (POLETTTO et al., 2010). Por sua vez, a co-localização dos sítios rDNA 18S e satélite As51 é um fato bem documentado no gênero *Astyanax*. Mestriner et al. (2000) constataram que o sítio de RON do braço curto do cromossomo submetacêntrico 10 é co-localizado ao DNA satélite As51 em *A. scabripinnis* da população de Campos de Jordão. Na espécie *A. janeiroensis* foram observados 22 sítios de rDNA 18S, onde 14 destes eram inativos e co-localizados ao DNA satélite As51 (VICARI et al., 2008b). Nesse mesmo estudo, os autores verificaram a organização em duas classes de heterocromatina diferentes, onde os oito sítios de apenas rDNA 18S eram organizados em uma heterocromatina GC rica, enquanto os 14 sítios co-localizados rDNA 18S e satélite As51 não mostraram sinais brilhantes a fluorocromos GC ou AT preferenciais. No presente estudo, apesar da enorme quantidade do satélite As51, nenhum sítio de rDNA foi localizado sobre o cromossomo B. Ainda, a co-localização dos sítios rDNA 18S e satélite As51 é restrita a região do braço curto do cromossomo 10. Com estes resultados, é possível inferir que esta região do cromossomo 10 em *A. scabripinnis* não realiza trocas de sequências com outros domínios cromossômicos As51 de cromossomos não homólogos e com o cromossomo B.

A localização e número de sítios de rDNAs também são marcadores citogenéticos úteis em inferências evolutivas e citotaxonômicas. No presente estudo, foram localizados *in*

situ cinco sítios de rDNA 18S, no braço curto do par submetacêntrico 10, na região terminal do par submetacêntrico 4, além de um sítio adicional em um cromossomo subtelocêntrico. O número de sítios e a localização do rDNA 18S costuma ser múltiplo e variável em *Astyanax* (NÉO et al., 2000a; FERRO et al., 2001; MANTOVANI et al., 2005; VICARI et al., 2008a; b) e algumas vezes co-localizados ao satélite As51 (MESTRINER et al., 2000; VICARI et al., 2008b). Estudos de Mizoguchi e Martins-Santos (1998b) revelam uma variação intra e interindividual no número de RONS e ainda, nas populações analisadas, havia um cromossomo principal ativo na maioria das células, bem como apresentaram padrões específicos de ativação. A ativação de sítios de RONS parece envolver um mecanismo de regulação gênica que permite a expressão preferencial de genes de um dado cromossomo nucleolar principal no sistema de RONS múltiplas. Souza et al. (2007) observaram uma variação nos blocos heterocromáticos, principalmente de cromossomos acrocêntricos, em duas populações isoladas por uma queda d'água de 100 metros de altitude, sendo que o fluxo gênico é unidirecional (*downstream*). A transposição de sequências teloméricas seria facilitada por recombinações entre DNAs repetitivos pré-existentes na heterocromatina e/ou *clusters* de rDNA nucleolar. O desenvolvimento destes padrões genéticos ao longo de gradientes ecológicos seria facilitado pelo isolamento parcial destas populações, resultando no surgimento de novos citótipos a serem selecionados. Dessa forma, mecanismos do tipo transposição de sequências estão amplamente associados à alta diversidade de número e localização do rDNA maior em *Astyanax*. O rDNA 18S por apresentar características saltatórias e mecanismos de transposição de sequências não tem sido considerado um bom marcador evolutivo.

Ao contrário do rDNA maior, a localização *in situ* dos sítios de rDNA 5S tende a ser conservada nos cromossomos de *Astyanax* (MARTINS e GALETTI JR, 2000; MANTOVANI

et al., 2005; VICARI et al., 2008a). Neste gênero, geralmente o rDNA 5S está localizado nas regiões proximais do braço longo de um par acrocêntrico e outro metacêntrico (ALMEIDA-TOLEDO et al., 2002; MANTOVANI et al., 2005; VICARI et al., 2008a), por vezes apenas no par acrocêntrico (VICARI et al., 2008b). No entanto, em algumas populações de *A. scabripinnis* têm sido descrita a ocorrência de mais dois pares (FERRO et al., 2001). O presente estudo mostrou a ocorrência de três pares com marcações de rDNA 5S. Os pares com marcações proximais acrocêntrico e metacêntrico são homeólogos àqueles já descritos (ALMEIDA-TOLEDO et al., 2002; MANTOVANI et al., 2005; VICARI et al., 2008a) e o par acrocêntrico com marcação terminal ao braço longo pode ser considerado uma sinapomorfia para este caracter.

Assim, este estudo demonstra por meio de análises mitóticas e meióticas convencionais e moleculares que o macromossomo B de *A. scabripinnis* tem origem por formação de isocromossomo a partir de um elemento do par acrocêntrico 24. A localização da sonda cromossômica B e dos DNAs repetitivos mostraram que este cromossomo mantém pequenos sítios de identidade com o complemento A, demonstrando a alta diversificação molecular deste cromossomo. Ainda, é possível inferir que este cromossomo B tem se heterocromatinizado ao longo do tempo por mecanismos de trocas ectópicas de sequências entre seus braços autopareados.

Agradecimentos

Os autores são gratos ao IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis) pela autorização de captura de espécimes na natureza (IBAMA/MMA/SISBIO licença número: 15117). Este trabalho foi realizado com financiamento dos órgãos de fomento a pesquisa CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Processo: 473448/2007-6), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Processo: 087/2007), FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) e Fundação Araucária (Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná, Processo: 17217/2009). Nós também somos gratos ao Sr. Miguel Airton Carvalho pela colaboração nas atividades de campo e laboratório.

Referências Bibliográficas

As referências citadas neste capítulo estão listadas ao final da dissertação em um único tópico com todas as demais referências.



Figura 2: Cariótipo de *A. scabripinnis* de Campos do Jordão (SP), Brasil. Em (a), coloração convencional (Giemsa). Em (b), os mesmos cromossomos, submetidos ao bandamento C sequencial, destacando as regiões heterocromáticas. Barra = 10µm.

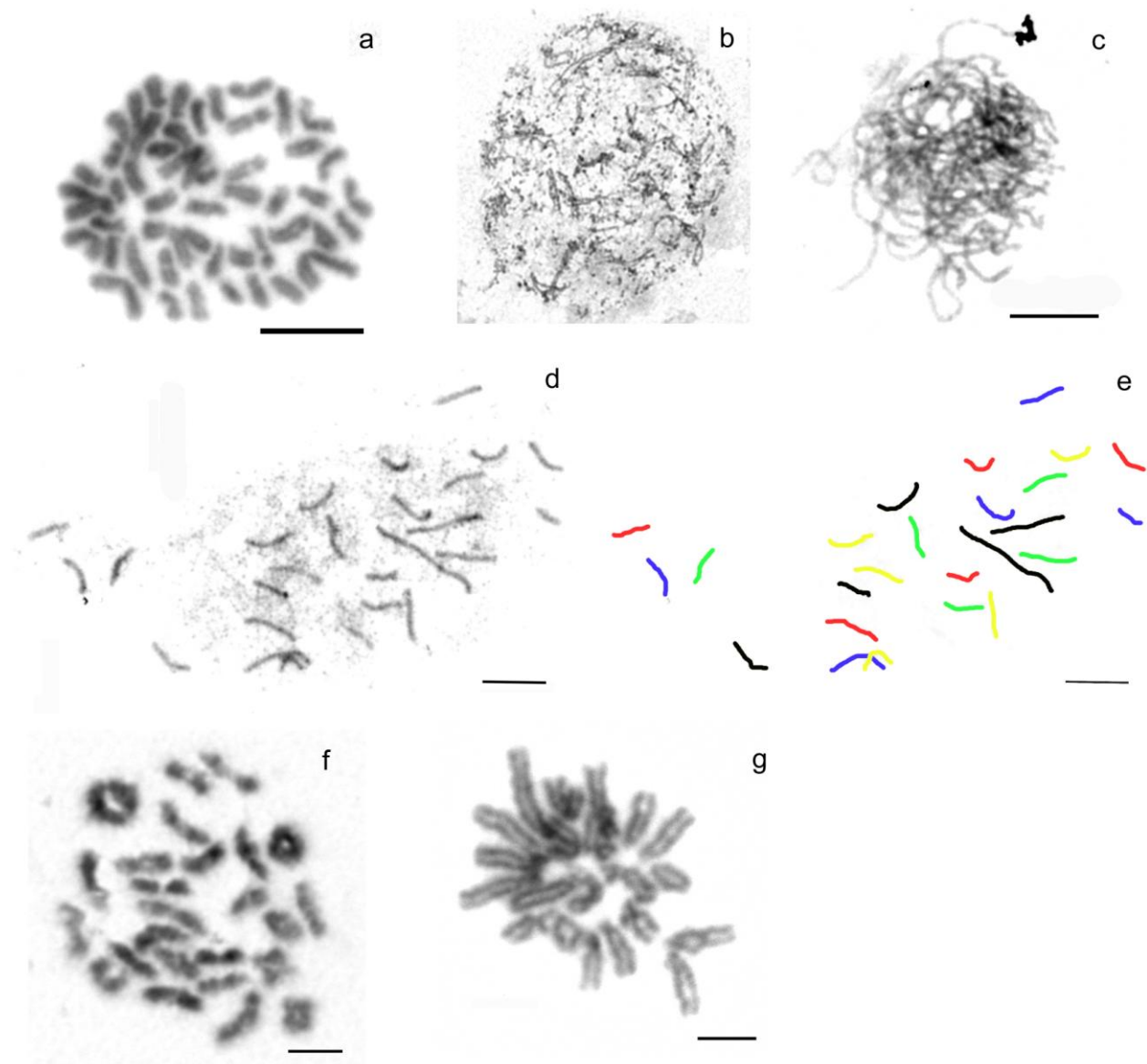


Figura 3. Células meióticas de espécimes de *A. scabripinnis* sem a presença de cromossomo B em coloração convencional (Giemsa). Em (a) metáfase espermatogonial com $2n=50$ cromossomos; (b) zigóteno inicial; (c) paquíteno inicial; (d) paquíteno final evidenciando 25 bivalentes completamente emparelhados; (e) desenho esquemático representativo dos 25 bivalentes em paquíteno final observado em (d); (f) diplóteno evidenciando 1 a 2 quiasmas por bivalente e; (g) metáfase II com número incompleto de cromossomos. Barras = $10\mu\text{m}$.

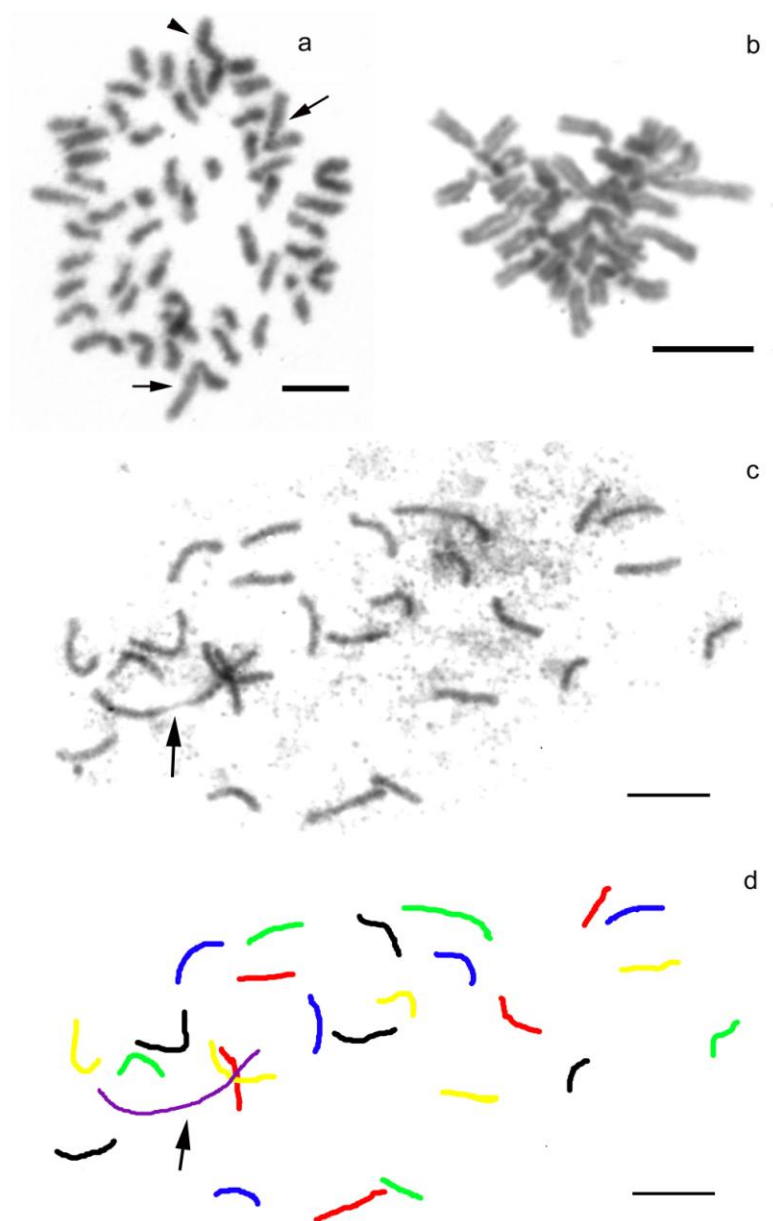


Figura 4. Células meióticas de espécimes de *A. scabripinnis* com a presença de cromossomo B em coloração convencional (Giemsa). Em (a) metáfase espermatogonial com $2n=51$ cromossomos, as setas indicam o primeiro par metacêntrico, a cabeça de seta mostra o cromossomo B heteropicnótico positivo; (b) metáfase II com 26 cromossomos; (c) paquíteno final mostrando 25 bivalentes e mais o provável cromossomo B autopareado, a seta indica o bivalente do maior par metacêntrico e; (d) desenho esquemático do paquíteno descrito em (c). Barras = 10 µm.

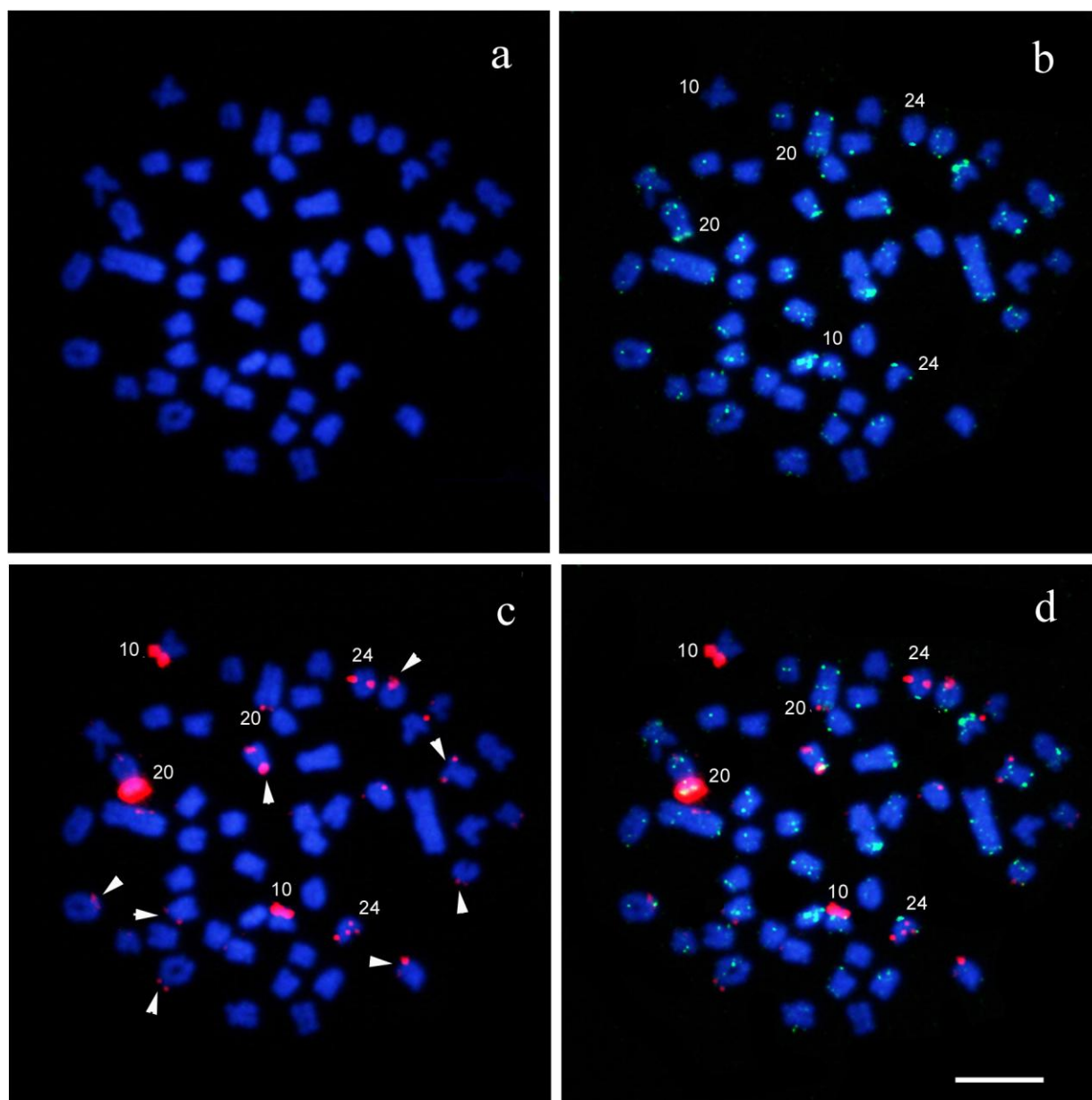


Figura 5: Metáfase mitótica de *A. scabripinnis* submetida a dupla FISH com sondas cromossômica e de DNAs repetitivos: localização da sonda cromossomo B. Em (a-d), metáfase sem cromossomo B. Em (a), contra-coloração DAPI. Em (b), localização da sonda do cromossomo B; em (c), localização do DNA repetitivo As51 e, em (d), sobreposição das imagens (as cabeças de seta indicam outros sítios As51 além dos já indicados com o número correspondente ao par cromossômico). Barra = 10µm.

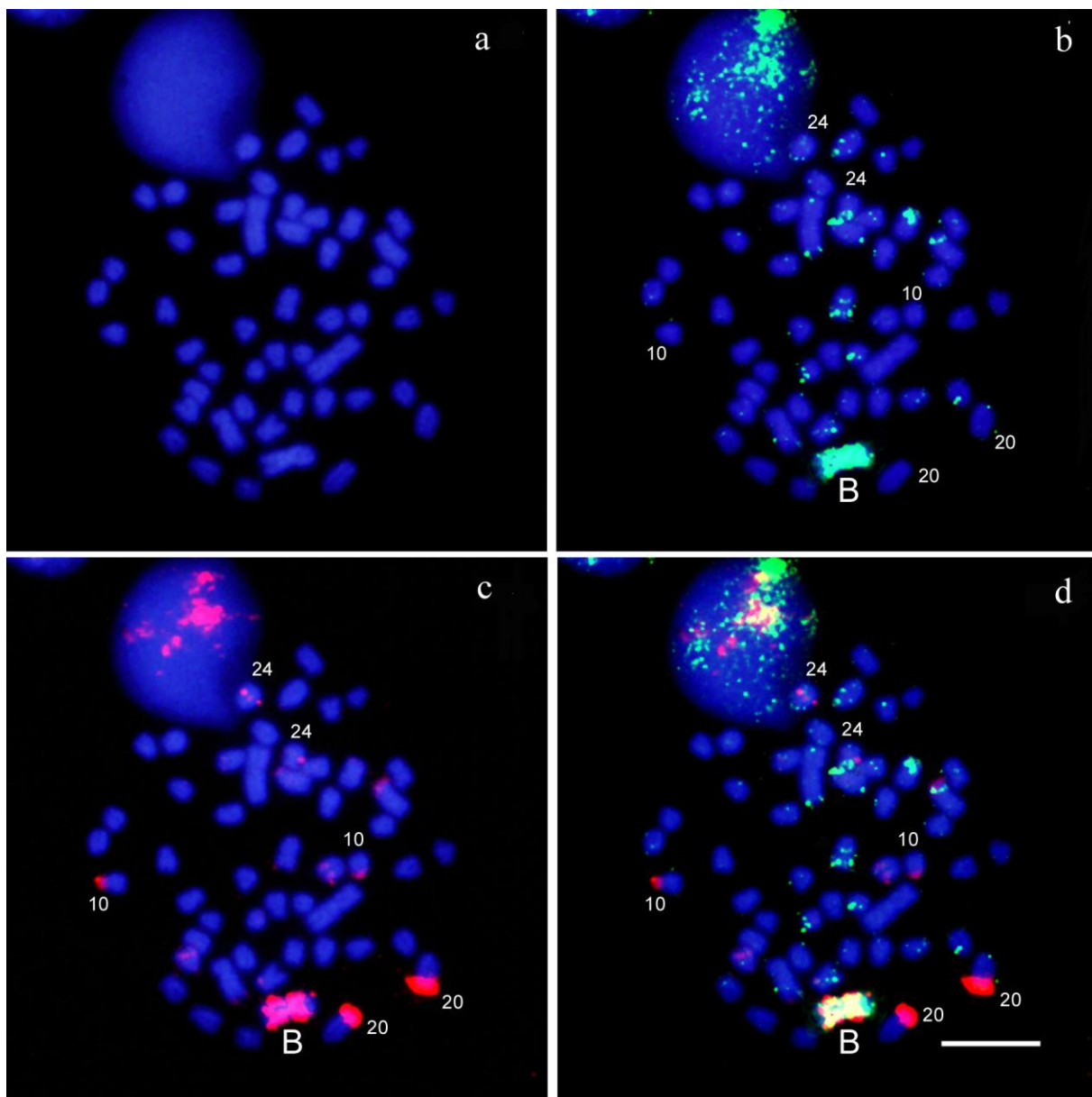


Figura 6: Metáfase mitótica de *A. scabripinnis* submetida a dupla FISH com sondas cromossômica e de DNAs repetitivos: localização da sonda cromossomo B. Em (a-d), metáfases com cromossomo B. Em (a), contra-coloração DAPI. Em (b-d), é possível observar o cromossomo B totalmente hibridizado com a sonda cromossomo B e quase totalmente hibridizado com a sonda As51, a exceção das regiões terminais e centromérica. Barra = 10µm.

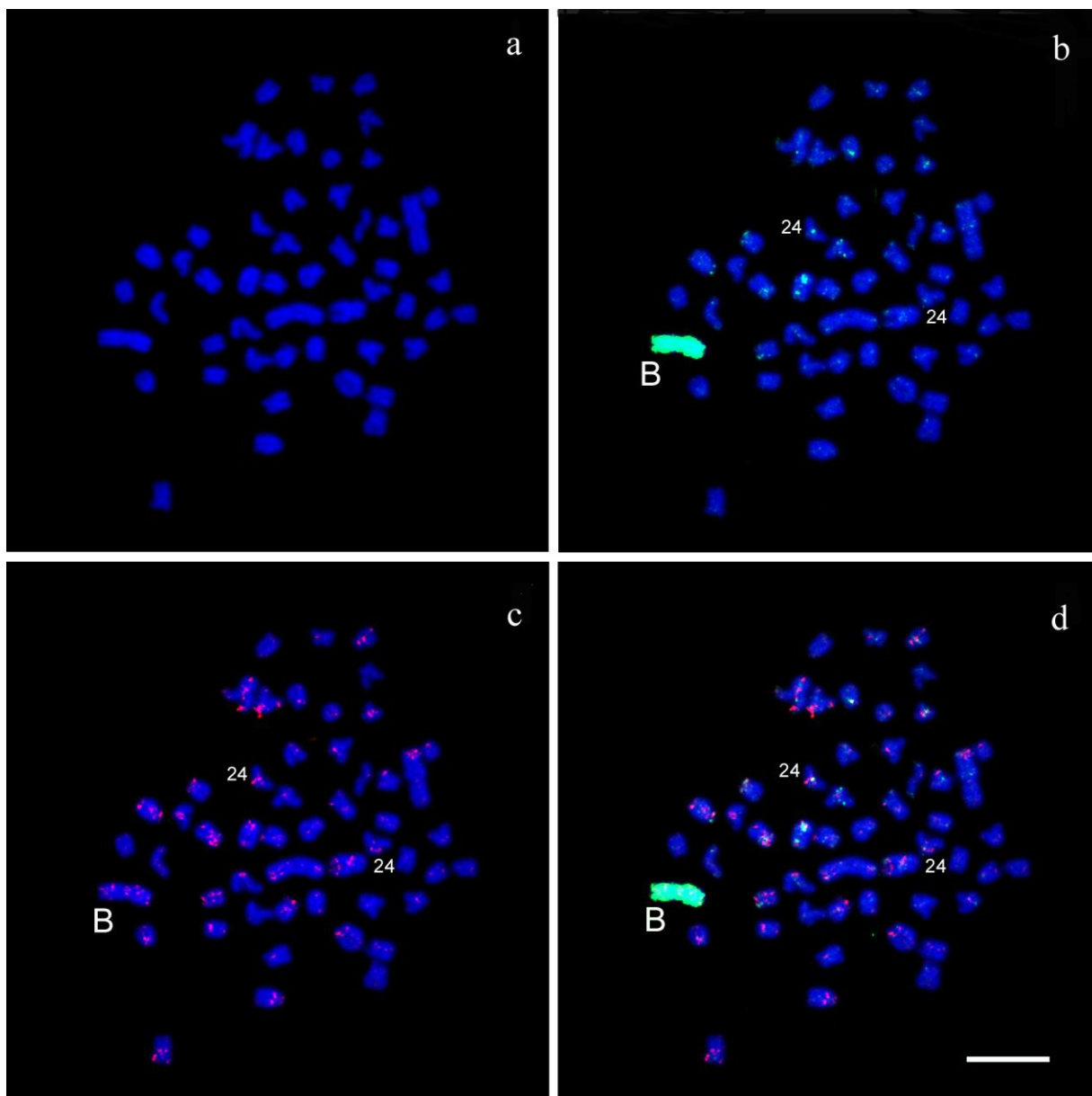


Figura 7: Metáfase de *A. scabripinnis* submetida a dupla FISH com sonda cromossômica (cromossomo B) e de DNA repetitivo C_0t-1 . Em (a-d) metáfase apresentando cromossomo B submetida a dupla FISH para a localização das sondas cromossomo B (b) e do DNA repetitivo C_0t-1 obtido de espécimes sem cromossomo B (c). Em (a), contra-colocação DAPI. Em (b) é possível observar o cromossomo B totalmente localizado e destaque para o par a 24 portando sonda B em região pericentromérica; (c) cromossomo B portando sonda C_0t-1 em região pericentromérica e terminais, além do destaque para o par a 24 portando este DNA repetitivo em região pericentromérica; (d) sobreposição das imagens sonda cromossomo B e C_0t-1 DNA. Barra = 10 μ m.

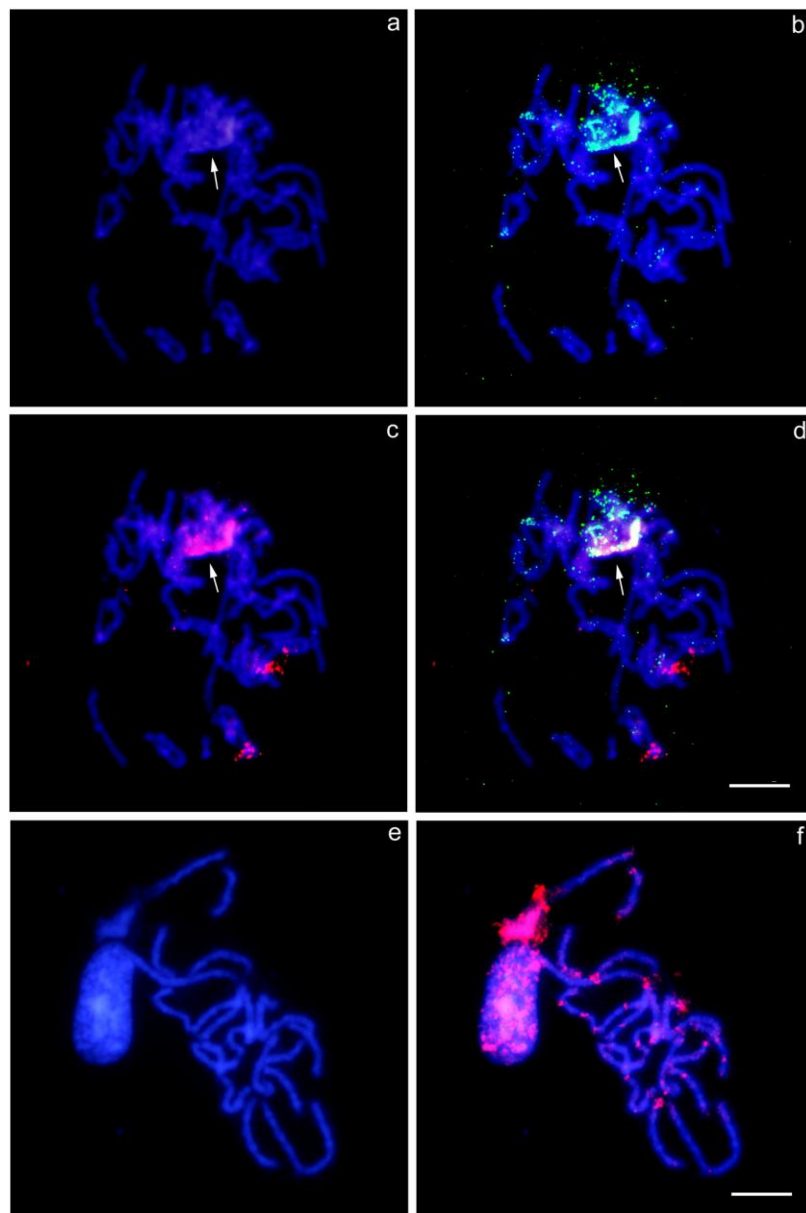


Figura 8: Células paquítenicas de *A. scabripinnis* submetidas a localização *in situ* de sondas cromossômica e de DNAs repetitivos. Em (a-d) paquíteno submetido a localização da sonda cromossomo B (b); localização da sonda As51 (c) e; sobreposição das imagens (d). A seta destaca o cromossomo B com cerca da metade do tamanho do maior bivalente. Em (e-f) paquíteno incompleto com a localização da sonda DNA repetitivo C₀t-1 obtido de espécimes sem cromossomo B. Em (e) contra-coloração DAPI e; (f) sítios DNA repetitivo C₀t-1 localizados em regiões terminais e centroméricas da maioria dos bivalentes. Barras = 10µm.

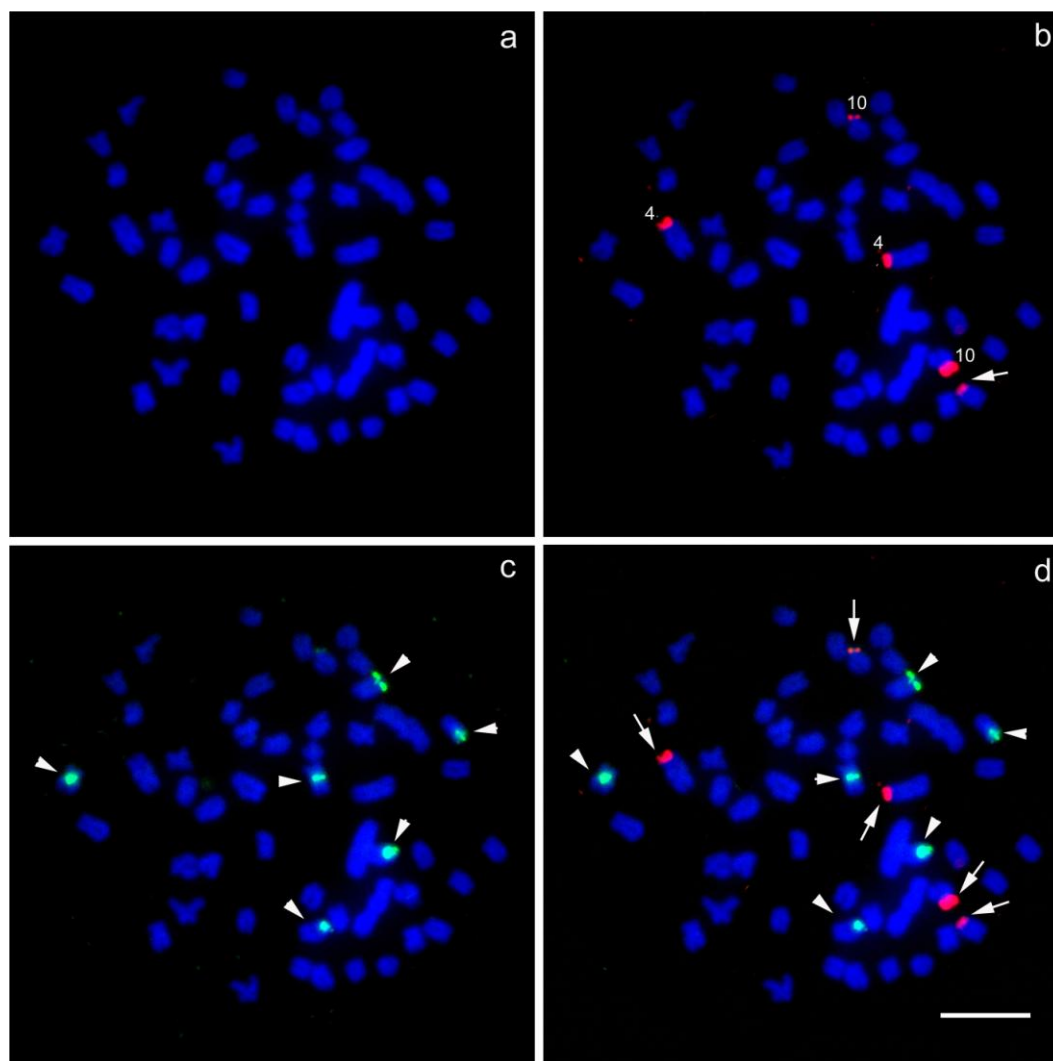


Figura 9: Metáfases mitóticas de *A. scabripinnis* submetidas a dupla FISH com sondas de rDNA 18S e 5S. Em (a) contra-coloração DAPI; (b) localização *in situ* do rDNA 18S, com destaque para os pares m 4 e 10, além de uma marcação adicional (seta); (c) localização dos sítios rDNA 5S (cabeça de seta) e; (d) sobreposição das imagens (as setas indicam os sítios rDNA 18S e as cabeças de seta indicam os sítios rDNA 5S). Barras = 10 μ m.

5. Conclusões

1) A população de *Astyanax scabripinnis* de Campos do Jordão (SP) apresentou número diplóide constante ($2n=50$), e esta condição é a mais presente neste complexo de espécies, e possivelmente a mais ancestral. O padrão de bandamento C diferiu pouco em relação a populações estudadas na mesma região. Estas pequenas diferenças devem-se ao isolamento geográfico entre as populações e conseqüente ausência de fluxo gênico.

2) O cromossomo B mostrou-se como um metacêntrico grande e totalmente heterocromático, sendo composto em sua grande maioria pelo DNA satélite As51, a exceção da região centromérica e regiões terminais. Não foi observada a localização de nenhum sítio de DNA ribossomal no cromossomo B, descartando a origem a partir do cromossomo 10.

3) A hibridação in situ com a sonda cromossomo B em metáfases mitóticas com e sem este elemento acessório puderam detectar que o cromossomo B ainda mantém alguma identidade com algumas poucas regiões do complemento A, entre elas as regiões do DNA satélite As51 e, regiões centroméricas e terminais de alguns cromossomos, o que remete à origem intraespecífica do macrocromossomo B.

4) Sinais positivos da sonda B e sonda $C_{ot}-1$ DNA em região pericentromérica do cromossomo acrocêntrico 24, além do sítio As51 intersticial neste par corroboram a origem por formação de isocromossomo a partir do par 24. Entretanto, a sonda B hibridou totalmente no cromossomo supranumerário e apresentou poucos e fracos sinais no complemento padrão, indicando uma grande diferenciação do cromossomo B em relação ao complemento A.

5) A sonda $C_{ot}-1$ evidenciou principalmente marcações na região centromérica de quase todos os cromossomos, além de marcações teloméricas e pequenas marcações intersticiais em alguns cromossomos. No cromossomo B, houve uma grande distribuição

destas sequências de DNA repetitivo, demonstrando que há outros tipos de DNA envolvidos na composição do cromossomo B.

6) As análises em meiose convencional mostraram um comportamento regular para os 25 pares cromossômicos. A hibridação da sonda B e do DNA As51 na meiose mostraram o cromossomo B com pareamento braço a braço, apresentando metade do tamanho do maior bivalente, mais uma vez corroborando a origem isocromossômica, indicando o autopareamento deste cromossomo. Não foi confirmada a formação de quiasmas no cromossomo B, sugerindo desta forma, que o macrocromossomo B não deve realizar crossing-over.

7) Com relação ao rDNA 18S, foram observadas duas marcações em regiões terminais do par de cromossomos submetacêntricos quatro, duas marcações nos braços curtos do par submetacêntrico dez, além de um sítio adicional em um cromossomo subtelocêntrico. A localização terminal dos sítios de rDNA 18S é a mais encontrada na literatura, bem como a condição de múltiplos sítios é a mais frequentemente observada em *Astyanax*. Mecanismos de transposição de sequências estão relacionados a esta diversidade de número e localização do rDNA maior entre diferentes populações de *Astyanax scabripinnis*.

8) A localização in situ do rDNA 5S evidenciou duas marcações na região pericentromérica de um par metacêntrico pequeno, duas na região subterminal proximal de um par acrocêntrico grande, e dois sítios em região pericentromérica de um par cromossômico subtelo/acrocêntrico pequeno. Em geral, observa-se até 4 marcações de rDNA 5S dentro deste complexo de espécies, embora já tenha sido relatada a existência de oito sítios de rDNA 5S. A presença de um sítio pericentromérico em um par metacêntrico médio é coincidente com

outras espécies do gênero *Astyanax*, reforçando a conservação deste caracter, porém os sítios adicionais podem ser considerados caracteres apomórficos nesta população.

Assim, este trabalho contribui para o melhor entendimento da origem e diversificação do cromossomo B, por meio de análises citogenéticas e evolutivas. Os próximos passos seriam uma melhor investigação deste cromossomo na meiose, bem como testar marcadores de DNA repetitivo em mais populações, especialmente nas portadoras de cromossomo B, a fim de testar a hipótese de que há uma origem comum para estes cromossomos dentro do gênero *Astyanax*.

6. Referências Bibliográficas

ABEL, L. D. S.; MANTOVANI, M.; MOREIRA-FILHO, O. Chromosomal distribution of the As51 satellite DNA in two species complexes of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 3, p. 448-452, 2006.

ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; OZOUF-COSTAZ, C.; FORESTI, F.; BONILLO, C.; PORTO-FORESTI, F.; DANIEL-SILVA, M. F. Z. Conservation of the 5S-bearing chromosome pair and co-localization with major rDNA clusters in five species of *Astyanax* (Pisces, Characidae). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 97, p. 229-233, 2002.

ALVES, A.L.; MARTINS-SANTOS, I.C. Cytogenetics studies in two populations of *Astyanax scabripinnis* with 2n=48 chromosomes (Teleostei, Characidae). **Cytologia**, v. 67, p. 117-122, 2002.

AMEMIYA, C.T. AND GOLD, J.R. Chromomycin A stains nucleolus organizer regions of fish chromosomes. **Copeia**, p. 226-231, 1986.

ARTONI, R. F.; SHIBATTA, O. A.; GROSS, M. C.; SCHNEIDER, C. H.; ALMEIDA, M. C.; VICARI, M. C.; BERTOLLO, L. A. C. *Astyanax aff. fasciatus* Cuvier, 1819 (Teleostei; Characidae): evidences of a species complex in the upper rio Tibagi basin (Paraná, Brazil). **Neotropical Ichthyology**, v. 4, n. 2, 2006a.

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, 2006b.

BERTACO, V. A.; LUCENA, C. A. S. Two new species of *Astyanax* (Ostariophysi: Characiformes: Characidae) from eastern Brazil, with a synopsis of the *Astyanax scabripinnis* species complex. **Neotropical Ichthyology**, v. 4, p. 53–60, 2006.

BERTOLLO, L. A. C., TAKAHASHI, C. S. E MOREIRA-FILHO, O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Brazilian Journal of Genetics**, v. 1, p. 103–120, 1978.

BEUKEBOOM, L. W. Bewildering Bs: An Impression of the 1st B-Chromosome Conference. **Heredity**, v. 73, p. 328-336, 1994.

BOUGOURD, S. M.; PLOWMAN, A. B.; PONSFORD, N. R.; ELIAS, M. L.; HOLMES, D. S.; TAYLOR, S. The case for unselfish B-chromosomes: evidence from *Allium schoenoprasum*. In **Kew Chromosome Conference IV** (ed. P. E. Brandham e M. D. Bennet), Kew, UK: Royal Botanic Gardens, p. 21-34, 1995.

BRITSKI, H. A. Peixes de água doce do estado de São Paulo: sistemática, p. 79-108. In: **Comissão Inter Estadual da Bacia Paraná-Uruguaí. Poluição e piscicultura**. São Paulo, Faculdade de Saúde Pública da USP, Instituto de Pesca, 1972, 108p.

BRITSKI, H. A.; SATO, Y.; ROSA, A. B. S. **Manual de identificação de peixes da Região de Três Marias**. Brasília: CODEVASF, 1984, 116p.

BRITSKI, H. A.; SATO, Y.; ROSA, A. B. S. **Manual de identificação de peixes da região de Três Marias**: com chave de identificação para os peixes da bacia do rio São Francisco. Brasília: CODEVASF, 1988. 115p.

CAMACHO, J. P. M.; CABRERO, J. New hypotheses about the origin of supernumerary chromosome segments in grasshoppers. **Heredity**, v. 58, p. 341-343, 1987.

CAMACHO, J. P. M., SHARBEL, T. F., BEUKEBOOM, L. W. B-chromosome evolution. **The Royal Society**. n. 355, p. 163-178. 2000.

CARAMASCHI, E. P. **Estudos da ictiofauna de riachos das bacias do Tietê e do Paranapanema, junto ao divisor de águas**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos, Botucatu, SP. 1986.

CEIVAP. Disponível em <http://www.ceivap.org.br>. Acesso em: 02 ago 2008.

DANTAS, E. S. O.; VICARI, M. R.; SOUZA, I. L.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C.; ARTONI, R. F. Cytotaxonomy and Karyotype Evolution in *Moenkhausia* Eigenmann, 1903 (Teleostei, Characidae). **Nucleus**, v. 50, n. 3, p. 509-522, 2007.

DOMINGUES, M. S.; VICARI, M.R.; ABILHOA, V.; WAMSER, J. P.; CESTARI, M. M.; BERTOLLO, L. A. C.; ALMEIDA, M. C.; ARTONI, R. F. Cytogenetic and comparative morphology of two allopatric populations of *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Teleostei, Characidae) from upper rio Paraná basin. **Neotropical Ichthyology**, v. 5, p. 37-44. 2007.

DORER, D. R.; HENIKOFF, S. Transgene Repeat Arrays Interact With Distant Heterochromatin and Cause Silencing in *cis* and *trans*. **Genetics**, v. 147, p. 1181-1890, 1997.

FAUAZ, G.; VICENTE, V. E.; MOREIRA-FILHO, O. Natural triploidy and B chromosomes in the neotropical fish genus *Astyanax* (Characidae). **Brazilian Journal of Genetics**, v. 17, p. 157-163, 1994.

FERREIRA, I.; MARTINS, C. Physical chromosome mapping of repetitive DNA sequences in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*: Evidences for a differential distribution of repetitive elements in the sex chromosomes, **Micron**, v. 39, p. 411-418, 2007.

FERREIRA NETO, M.; VICARI, M. R.; CAMARGO, E. F.; ARTONI, R. F.; MOREIRA-FILHO, O. Comparative cytogenetics among populations of *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae, *Incertae sedis*). **Genetics and Molecular Biology**, v. 32, n. 4, p. 792-796, 2009.

FERRO, D. A. M.; NÉO, D. M.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. Nucleolar organizing regions, 18S and 5S in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): population distribution and functional diversity. **Genetica**, v. 110, p. 55-62, 2001.

FRAGOSO, E. N.; FENERICH-VERANI, N.; VERANI, J. R. **ESTRUTURA DA POPULAÇÃO DE *Astyanax scabripinnis* (JENYNS, 1842) (CHARACIFORMES, CHARACIDAE) DO CÓRREGO DA LAGOA, SÃO CARLOS/SP**. I Congresso de Pós Graduação da UFScar; São Carlos, PPGERN/UFSCar, v.1, n.1, p. 135-138, 2001. Disponível em: <http://www.propg.ufscar.br> . Acesso em: 20 mai 2008.

FROESE, R.; PAULY, D. (Eds). **FishBase**. Disponível em: <http://www.fishbase.org> . acesso em: 9 jan. 2010.

FUTUYMA, D. **Biologia Evolutiva**. 2a. ed. Funpec, 2002, 631p.

GALETTI JR., P. M. Chromosome diversity in Neotropical fishes: NOR studies. **Italian Journal of Zoology** v. 65 (suppl), p. 53-56, 1998.

GERY, J. **Characoids of the World**. New Jersey, T. F. H. Publications, 1977, 672 p.

GRAY, Y. H. It takes two transposons to tango: transposable element-mediated chromosomal rearrangements. **Trends in Genetics**, v. 16, p. 461–468, 2000.

GREEN, D. M.; ZEYL, C. W.; SHARBEL, T. F. The evolution of hypervariable sex and supernumerary (B) chromosomes in the relict New Zealand frog, *Leiopelma hochstetteri* **Journal of Evolutionary Biology**, v. 6, n. 3, p. 417-441, 1993.

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.

JONES, R. N.; REES, H. **B chromosomes**. London, Academic Press, v. 8, 1982, 266p.

JONES, R. N. Are B chromosomes selfish? In: Cavalier-Smith, T. (ed.). **The Evolution of Genome Size**, Wiley, London, p. 397–425, 1985.

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.

JUSTI, A. J. **Caracterização cariotípica de populações de *Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819) Pisces, Characidae, em três bacias hidrográficas**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1993.

KANTEK, D. L. Z.; NOLETO, R. B.; FENOCCHIO, A. S.; CESTARI, M. M. Cytotaxonomy, heterochromatic polymorphism and natural triploidy of a species of *Astyanax* (Pisces, Characidae) endemic to the Iguaçu River Basin (Paraná, Brasil). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, p. 67–74, 2007.

KANTEK, D. L. Z., VICARI, M. R., PERES, W. A. M., CESTARI, M. M., ARTONI, R. F., BERTOLLO, L. A. C. & MOREIRA-FILHO, O. Chromosomal location and distribution of As51 satellite DNA in five species of the genus *Astyanax* (Teleostei, Characidae, *Incertae sedis*). **Journal of Fish Biology**, v. 75, p. 408-421, 2009a.

KANTEK, D. L. Z., CESTARI, M. M., BERTOLLO, L. A. C. & MOREIRA-FILHO, O. Characterization of the constitutive heterochromatin of *Astyanax* sp. D (Characiformes: Characidae) from the Upper Iguaçu River (PR). **Folia biologica**, v. 57, p. 37-41, 2009b.

KARTAVTSEVA, I. V.; ROSLIK, G. V. A complex B chromosome system in the Korean field mouse, *Apodemus peninsulae*. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 106, p. 271-278, 2004.

KAVALCO, K. F.; MOREIRA-FILHO, O. Cytogenetical analyses in four species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae) from Paraíba do Sul River Basin. **Caryologia**, v. 56, n. 4, p. 453-461, 2003.

KIDWELL, M. G.; LISCH, D. R. Transposable elements and host genome evolution. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 15, n. 3, p. 95-99, 2000.

KIDWELL, M. G.; LISCH, D. R. Perspective: transposable elements, parasitic DNA, and genome evolution. **Evolution**, v. 55, n. 5, p. 1-24, 2001.

KIDWELL, M. G. Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. **Genetica**, v. 115, p. 49-63, 2002.

KLIGERMAN, A. D.; BLOOM, S. E. Rapid chromosome preparation from solid tissues of fishes. **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, v. 43, p. 266-269, 1977.

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

LIMA, F. C. T. et al. Genera *Incertae sedis* in Characidae. In: REIS, R. E.; S. O. KULLANDER; FERRARIS JR. C. J. (Org.). **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003, p. 106-169.

LOWE-MCCONNELL, R.H. The cichlid fishes of Guiana, South America, with notes on their ecology and breeding behavior. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 48, p. 255-302, 1969.

MAISTRO, E. L.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. New occurrence of a macro B-chromosome in *Astyanax scabripinnis paranae* (PISCES, CHARACIFORMES, CHARACIDAE). **Revista Brasileira de Genética**, v.17, n.2, p. 153-156, 1994.

MAISTRO, E. L.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Comparative cytogenetic and morphological analysis of *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characidae, Tetragonopterinae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 21, p. 201-206, 1998.

MAISTRO, E. L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Sympatric occurrence of two cytotypes of *Astyanax scabripinnis* (Characiformes, Characidae). **Genetics and Molecular Biology**, v.23, n.2, p. 365-369, 2000.

MALABARBA, L. R. Monophyly of Cheirodontinae, characters and major clades. p.193-233. In: Malabarba, L. R., R. E. Reis, R. P. Vari, Z. M. S. Lucena & C. A. S. Lucena. **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. Porto Alegre, EDIPUCRS, 1998, 603p.

MANTOVANI, M.; ABEL, L. D. S.; MESTRINER, C. A.; MOREIRA-FILHO, O. Accentuated polymorphism of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): Tools for understanding karyotypic evolution. **Genetica**, v. 109, p. 161-168, 2000.

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). **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, p. 536–542, 2004.

MANTOVANI M.; ABEL L. D. S.; MOREIRA-FILHO, O. Conserved 5S and variable 45S rDNA chromosomal localization revealed by FISH in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Genetica**, v.123, p. 211–216, 2005.

MARTINS, C.; GALETTI Jr, P. M. Chromosomal localization of 5S DNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). **Chromosome Research**, v. 7, p. 363–367, 1999.

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

MENEZES, N. A.; CASTRO, R. M. C.; WEITZMAN, S. H.; WEITZMAN, M. J. Peixes de riacho da Floresta Costeira Atlântica Brasileira: Um conjunto pouco conhecido e ameaçado de vertebrados. In: (Watanabe, S. coord.) **II Simpósio de Ecossistemas da costa sul e sudeste brasileira: Estrutura, 41 manejo e função**. Academia de Ciências do estado de São Paulo, p. 290-295, 1990.

MENEZES, N. A. Importância da conservação da ictiofauna dos ecossistemas aquáticos brasileiros. **Seminários sobre fauna aquática e o setor elétrico brasileiro**. COMASE, ELETROBRÁS. Caderno 3, Conservação, p. 7-13, 1994.

MESTRINER, C. A.; GALETTI JR, P. M.; VALENTINI, S. R.; RUIZ, I. R. G.; ABEL, L. D. S.; et al: Structural and functional evidence that a B chromosome in the characidae fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome. **Heredity**, v. 85, p.1–9, 2000.

MILLER, O. L.; DEV, V.; TANTRAHAHI, R.; MILLER, O. J. Suppression of human nucleolus organizer activity in mouse-human somatic hybrid cells. **Experimental Cell Research**, v. 101, n. 235–243, 1976.

MIZOGUCHI, S. M. H. N.; MARTINS-SANTOS, I. C. Macro- and microchromosomes B in females of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Hereditas**, n. 127, p. 249-253, 1997.

MIZOGUCHI, S. M. H. N.; MARTINS-SANTOS, I. C. Cytogenetics and morphometrics differences in populations of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) from Maringá region, PR, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v. 21, p. 55-61, 1998a.

MIZOGUCHI, S. M. H. N.; MARTINS-SANTOS, I. C. Activation patterns of the nucleolar organizer regions in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Cytologia**, v. 63, n. 3, p. 259-265, 1998b.

MOREIRA, C. L. R. **Relações filogenéticas na ordem Characiformes (Teleostei, Ostariophisi)**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 2007.

MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): A species complex. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 14, p. 331–357, 1991.

MOREIRA-FILHO, O.; FENOCCHIO, A. S.; PASTORI, M. C.; BERTOLLO, L. A. C. Occurrence of a metacentric macrochromosome B in different species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae, Tetragonopterinae). **Cytologia**, v. 66, p. 59-64, 2001.

MOREIRA-FILHO, O.; GALETTI JR., P. M.; BERTOLLO, L. A. C. B chromosomes in the fish *Astyanax scabripinnis* (Characidae, Tetragonopterinae): An overview in natural populations. **Cytogenetic Genome Research**, v. 106, p. 230-234, 2004.

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

NÉO, D. M.; MOREIRA-FILHO, O.; CAMACHO, J. P. M. Altitudinal variation for B chromosome frequency in the fish *Astyanax scabripinnis*. **Heredity**, v. 85, p. 136-141, 2000a.

NÉO, D. M.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. Morphological differentiation and possible origin of B chromosomes in a natural Brazilian population of *Astyanax scabripinnis* (PISCES, CHARACIDAE). **Genetica**, v. 108, p. 211-215, 2000b.

NUR, U. Harmful B chromosomes in a mealy bug population. **Genetics**, v. 54, p. 1225–1238, 1966.

NUR, U. Maintenance of a 'parasitic' B chromosome in the grasshopper *Melanoplus femur-rubrum*. **Genetics**, v. 87, p. 499–512, 1977.

ÖSTERGREN, G. Parasitic nature of extra fragment chromosomes. **Botaniska Notiser**, v. 2, n. 157-163, 1945.

PALOMEQUE, T.; CHICA, E.; DÍAZ DE LA GUARDIA, R. Supernumerary chromosome segments in different genera of Formicidae. **Genetica**, v. 90, p. 17–29, 1993.

PARDO, M. C.; LOPEZ-LEON, M. D.; CABRERO, J.; CAMACHO, J.P.M. Transmission analysis of mitotically unstable B chromosomes in *Locusta migratoria*. **Genome**, n. 37, p. 1027-1034, 1994.

PAULS, E.; BERTOLLO, L. A. C. Evidence for a system of supernumerary chromosomes in *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881 (Pisces, Prochilodontidae). **Caryologia**, v. 36 p.3 07-314, 1983.

PAZZA, R.; KAVALCO, S. A. F.; PENTEADO, P. R.; KAVALCO, K. F.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. The species complex *Astyanax fasciatus* Cuvier, 1819 (Teleostei, Characiformes): A multidisciplinary approach. **Jornal of Fish Biology**, v. 72, p. 2002-2010, 2008.

PERES, W. A. M.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. Physical mapping of the 18S and 5S ribosomal genes in nine Characidae species (Teleostei, Characiformes). **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, p. 222-226, 2008.

PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J. W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy Sciences, USA**, v. 83, p. 2934–2938, 1986.

POLETO, A. B.; FERREIRA, I. A.; MARTINS, C. The B chromosomes of the African cichlid fish *Haplochromis obliquens* harbour 18S rRNA gene copies. **BMC Genetics**, v. 11, n. 1, 2010, *in press*.

REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS, C. L. (EDS.). **Checklist of the freshwater fishes of the South and Central America**. Porto Alegre, Edipucrs, 2003, 729 p.

ROCON-STANGE, E. A.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. Supernumerary B chromosome restricted to males in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Brazilian Journal of Genetics**, v. 16, p. 601–615, 1993.

RUBTZOV, N. B.; BORISSOV, YU. M.; KARAMYSHEVA, T. V.; BOCHKAREV, M. N. The mechanisms of formation and evolution of B chromosomes in Korean field mice

Apodemus peninsulae (Mammalia, Rodentia). **Russian Journal of Genetics**, v. 45, n. 4, p. 389-396, 2009.

SALVADOR, L. B.; MOREIRA-FILHO, O. B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Heredity**, v. 69, p. 50-56, 1992.

SCHMID, M.; GUTTENBACH, M. Evolutionary diversity of reverse fluorescence chromosome bands in vertebrates. **Chromosoma**, v. 97, p. 101-114, 2008.

SHAW, M. W.; HEWITT, G. M. B chromosomes, selfish DNA and theoretical models: where next? In: Futuyma, D.; Antonovics, J. (eds) **Oxford Surveys in Evolutionary Biology**, Oxford University Press, Oxford, v. 7, p. 197–223, 1990.

STRIPECKE, R.; NOGUEIRA-PINTO, M. T.; HACKEL, C.; SAZIMA, I. O caritótipo de *Astyanax engelmaniorum* (Osteichthyes, Characidae). XII Congresso Brasileiro de Zoologia. Campinas, Brasil, 1985. apud: MOREIRA-FILHO, O.; GALETTI JR., P. M.; BERTOLLO, L. A. C. B chromosomes in the fish *Astyanax scabripinnis* (Characidae, Tetraodonidae): An overview in natural populations. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 106, p. 230-234, 2004.

SOUZA, I. L.; MOREIRA-FILHO, O. Cytogenetic diversity in the *Astyanax scabripinnis* species complex (Pisces, Characidae). I. Allopatric distribution in a small stream. **Cytologia**, v. 60, p. 1-11, 1995.

SOUZA, I. L., **Estudos citogenéticos em populações de *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae), pertencentes a dois riachos de diferentes bacias do Sudeste Brasileiro**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, Brasil, 1996.

SOUZA, I. L.; VENERE, P. C.; MOREIRA-FILHO, O. Constitutive heterochromatin and Ag-NOR polymorphism in the small Characidae fish *Astyanax scabripinnis*. **Cytologia**, v. 72, n. 1, p. 63-69, 2007.

SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**, v. 74, p. 304-306, 1972.

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.

TERUEL, M.; CABRERO, J.; MONTIEL, E. E.; ACOSTA, M. J.; SÁNCHEZ, A. E CAMACHO, J. P. M. Microdissection and chromosome painting of X and B chromosomes in *Locusta migratoria*. **Chromosome research**, v. 17; p. 11-18, 2009.

TORRES-MARIANO, A. R.; MORELLI, S. B chromosomes in a population of *Astyanax eigenmanniorum* (Characiformes, Characidae) from the Araguari River Basin (Uberlândia, MG, Brazil). **Genetics and Molecular Biology**, v.31, n.1 (suppl), p. 246-249, 2008.

VICARI, M. R.; NOLETO, R. B.; ARTONI, R. F.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. Comparative cytogenetics among species of the *Astyanax scabripinnis* complex. Evolutionary and biogeographical inferences. **Genetics and Molecular Biology**, v.31 p. 173–179, 2008a.

VICARI, M. R., ARTONI, R. F., MOREIRA-FILHO O. E. BERTOLLO, L. A. C. COLOCALIZATION OF repetitive DNAs and silencing of major rRNA genes. A case report of the fish *Astyanax janeiroensis*. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 122, p. 67 – 72, 2008b.

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 and chromosomes in Neotropical fishes: Methods, applications and perspectives. **Journal of Fish Biology**, doi:10.1111/j.1095-8649.2010.02564.x *in press*.

VICENTE, V. E.; MOREIRA-FILHO, O.; CAMACHO, J. P. M. Sex-ratio distortion associated to the presence of a B chromosome in *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae) **Citogenetic and Cell Genetics**, v. 74, p. 70-75, 1996.

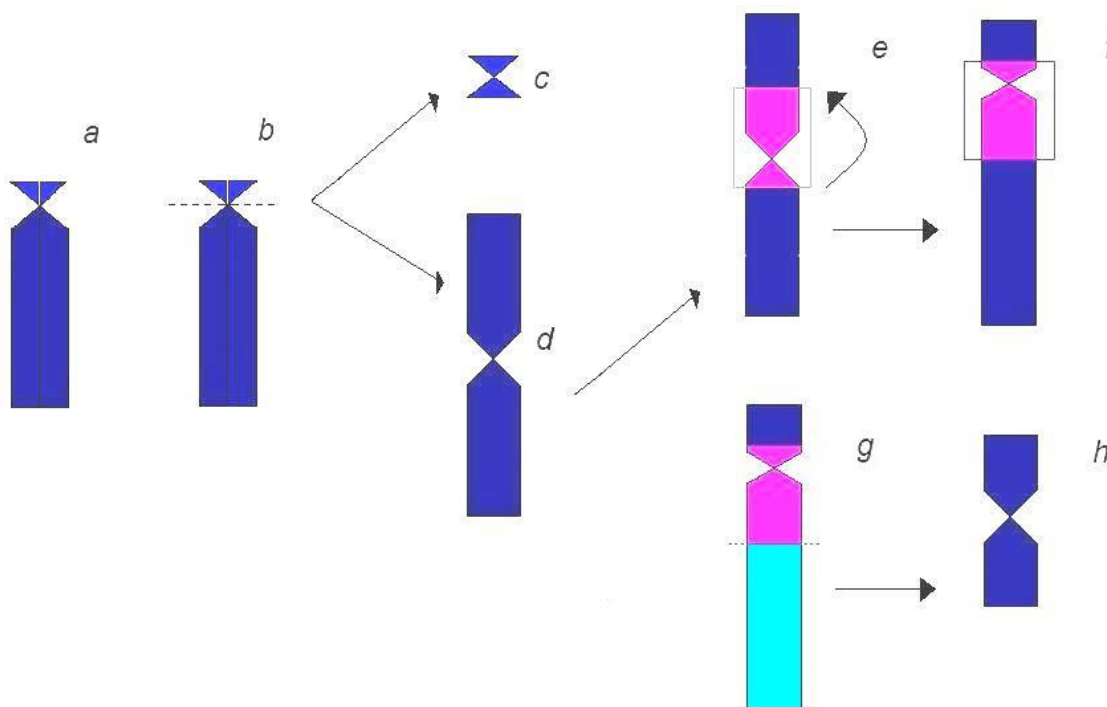
WHITE, M. J. D. **Animal cytology and evolution**, 3 ed., London: Cambridge University Press, 1973.

ZIEGLER, C. G.; LAMATSCH, D. K. et al. The giant B chromosome of the cyprinid fish *Alburnus alburnus* harbours a retrotransposon-derived repetitive DNA sequence. **Chromosome Research**, v. 11, p. 23–25, 2003.

ZWICK, M. S.; HANSON, R. E.; MCKNIGHT, T. D.; ISLAM-FARIDI, H. M.; STELLY, D. M.; WING, R. A. E ; Price, J. H. A rapid procedure for the isolation of *Cot-1* DNA from plants. **Genome**, v. 40, p. 138-142, 1997.

7. Anexos

Anexo I: desenho esquemático a respeito da formação dos quatro tipos morfológicos de cromossomos B encontrados no complexo Astyanax scabripinnis, baseado em Neo et al. (2000b), com modificações.



Desenho esquemático dos tipos morfológicos de cromossomos B já encontrados em *A. scabripinnis*, mostrando como possíveis caminhos para a sua origem. (a) representa um cromossomo subtelo/acrocêntrico. (b) representa a quebra deste cromossomo na região centromérica, com posterior formação de isocromossomo, originando (c), um microcromossomo com origem nas cromátides irmãs do braço curto, ou (d), um macrocromossomo metacêntrico, originado a partir das cromátides irmãs do braço longo. Ainda, o cromossomo metacêntrico grande poderia sofrer uma inversão pericêntrica (e), originando um cromossomo do tipo submetacêntrico grande (g). O submetacêntrico grande, por sua vez, poderia originar um cromossomo metacêntrico pequeno por meio de deleções no braço longo (h).

Anexo II: Licença permanente para a coleta de material zoológico



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Licença permanente para coleta de material zoológico

Número: 15117-1		Data da Emissão: 26/03/2008 18:25
Dados do titular		
Registro no Ibama: 2537361	Nome: Marcelo Ricardo Vicari	CPF: 952.846.480-72
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA		CNPJ: 80.257.355/0001-08

Observações, ressalvas e condicionantes

1	A participação de pesquisador(a) estrangeiro(a) nas atividades previstas nesta autorização depende de autorização expedida pelo Ministério de Ciência e Tecnologia (CNPq/MCT).
2	A licença permanente não é válida para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) manutenção de espécimes de fauna silvestre em cativeiro; c) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e d) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna. A restrição prevista no item d não se aplica às categorias Reserva Particular do Patrimônio Natural, Área de Relevante Interesse Ecológico e Área de Proteção Ambiental constituídas por terras privadas.
3	O pesquisador titular da licença permanente, quando acompanhado, deverá registrar a expedição de campo no Sisbio e informar o nome e CPF dos membros da sua equipe, bem como dados da expedição, que constarão no comprovante de registro de expedição para eventual apresentação à fiscalização.
4	Esta licença permanente não exime o seu titular da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
5	Esta licença permanente não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais, esportivos ou para realização de atividades inerentes ao processo de licenciamento ambiental de empreendimentos.
6	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular da necessidade de atender ao disposto na Instrução Normativa Ibama nº 27/2002, que regulamenta o Sistema Nacional de Anilhamento de Aves Silvestres.
7	O pesquisador titular da licença permanente será responsável pelos atos dos membros da equipe (quando for o caso).
8	O órgão gestor de unidade de conservação estadual, distrital ou municipal poderá, a despeito da licença permanente e das autorizações concedidas pelo Ibama, estabelecer outras condições para a realização de pesquisa nessas unidades de conservação.
9	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
10	O titular da licença permanente deverá apresentar, anualmente, relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias após o aniversário de emissão da licença permanente.
11	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo Ibama e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
12	A licença permanente será válida enquanto durar o vínculo empregatício do pesquisador com a instituição científica a qual ele estava vinculado por ocasião da solicitação.
13	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico.
14	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constantes de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexploradas ou ameaçadas de sobreexploração.

Táxons autorizados

#	Nível taxonômico	Taxon(s)
1	ORDEN	Characiformes, Cypriniformes, Synbranchiformes, Perciformes, Siluriformes, Gymnotiformes
2		

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA	Citogenética de Peixes
2	Museu Nacional da Universidade Federal do Rio de Janeiro	colecção

Este documento (Licença permanente para coleta de material zoológico) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 61434795



Página 1/2



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Licença permanente para coleta de material zoológico

Número: 15117-1		Data da Emissão: 26/03/2008 18:25
Dados do titular		
Registro no Ibama: 2537361	Nome: Marcelo Ricardo Vicari	CPF: 952.846.480-72
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA		CNPJ: 80.257.355/0001-08

Anexo para registrar Coletas Imprevistas de Material Biológico

De acordo com a Instrução Normativa Ibama nº154/2007, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Nível	Táxon*	Qtde.	Amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico mais específico possível.

Este documento (Licença permanente para coleta de material zoológico) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 61434795



Página 2/2

Anexo III: Aprovação do comitê de ética em experimentação animal



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA



Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação



SCEEA

SUB-COMISSÃO DE ÉTICA EM ANIMAIS

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 - SCEEA

Profº Guilherme de Almeida S. Tedrus

Coordenador substituto da SCEEA

Anexo IV: Obtenção dos cromossomos mitóticos:

Para a obtenção dos cromossomos mitóticos foi utilizado o procedimento descrito por Bertollo et al. (1978). Foi injetado intra-abdominalmente no animal uma solução aquosa de colchicina 0,0125 %, 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, e depois foi re-suspendido com auxílio de uma pipeta Pasteur e colocado em tubo de centrifuga. 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 (até ser homogeneizado), 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.

Anexo V: Preparação de cromossomos meióticos (KLIGERMAN e BLOOM, 1977, adaptada por Bertollo et al., 1978)

Após anestesiá-lo o animal, este foi sacrificado. As gônadas foram retiradas e seccionadas em pequenos fragmentos, os quais foram colocados em solução hipotônica de KCl a 0,075M por 20 minutos. O material foi, então, transferido para o fixador (metanol: ácido acético; 3:1) recém preparado. Este processo foi repetido uma vez e a seguir o material foi guardado no refrigerador a 4°C. Para a confecção das lâminas, o material foi retirado do fixador e alguns fragmentos foram transferidos para uma placa escavada, sendo então adicionadas duas a três gotas de ácido acético a 60%. Após, o material foi bem fragmentado, obtendo-se uma suspensão celular, transferida então para uma lâmina aquecida a 30-35°C, sendo imediatamente reaspirada. Este processo foi repetido em 2 ou 3 pontos da lâmina e posteriormente esta foi corada com Giemsa 10%.

Anexo VI: Detecção da Heterocromatina Constitutiva: Bandas-BSG

O procedimento seguiu o protocolo de Sumner (1972). 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 submersas em solução de ácido clorídrico 0,2 N e lavadas com água destilada. O material foi então imerso em solução salina (*Saline salt citrate*) 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.

Anexo VII: Marcação de sondas por nick translation

As reações de nick translation seguiram as orientações do fabricante (Roche). Pipetar os seguintes componentes em tubo de 1,5 mL no gelo: x μ L água qsp (quantidade para completar o volume final de 20 μ L); x μ L sonda (equivalente a 1 μ g – depende da concentração da sonda em nanogramas por μ L); 4 μ L mix de nick translation; completar para o volume total de 20 μ L; colocar em banho Maria a 15 C por 1 hora e 30 minutos; interromper com 1 μ L de EDTA 0,5 M pH 8,0; aquecer por 10 minutos à 65 C.

Anexo VIII: Microdissecção de cromossomos submetidos ao bandamento C (VICARI et al., submetido)

Os cromossomos B de *Astyanax scabripinnis* (Campos do Jordão, SP) depois de submetidos ao bandamento C foram microdissectados em microscópio invertido IX51 (Olympus) equipado com micromanipulador mecânico Transferman (Eppendorf). A microdissecção foi realizada com agulhas de vidro, capilar, com pontas de aproximadamente 0,7 μ m. Após a microdissecção, a ponta da agulha contendo o material cromossômico foi quebrada no interior de um microtubo. Um total de 20 cromossomos B com bandamento C extremamente visível e contrastante foram microdissectados. Estes cromossomos foram então transferidos para um microtubo e utilizados na reação de “Degenerated Oligonucleotide Primer – Polymerase Chain Reaction” (DOP-PCR).

Anexo IX: Iniciador oligonucleotídeo degenerado – reação em cadeia da polimerase (DOP-PCR)

A reação DOP-PCR seguiu o procedimento descrito por Telenius et al. (1992) com

adaptações (VICARI et al., 2010). A reação de polimerização consistiu de tampão 1x (*ThermoSequenase* - GE healthcare), 400 μ M de dNTP, 2 μ M 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 minutos, seguido da adição de 10 U de *ThermoSequenase*. A primeira amplificação é realizada via RAMP-PCR: 3 minutos a 94°C; 12 ciclos de baixa estrigência (1 minuto e 30 segundos a 94°C, 2 minutos a 32°C aumentando 0,2°C/s até 72°C e 2 minutos a 72°C), seguidos por 30 ciclos de alta estrigência (1 min. e 30 s a 94°C, 1 minuto e 30 segundos a 52°C e 1 minuto e 30 segundos a 72°C). Os produtos obtidos foram corridos em gel de agarose 1%, onde o tamanho esperado foi corresponde a um arrasto entre 100 – 400 pb.

A segunda reação de amplificação foi feita com 100 ng do primeiro produto de PCR realizando-se uma nova reação de amplificação num volume final de 50 μ L. A reação foi composta de tampão (200 mM Tris pH 8.4, 500 mM KCl) 1x da *Taq* DNA polimerase (Invitrogen); 2 mM $MgCl_2$; 400 μ M de dNTP, 2 μ M de primer DOP = 5'-CCGACTCGAGNNNNNNATGTGG-3' e 2 U de *Taq* DNA polimerase. As reações de polimerização foram constituídas por: 3 minutos a 94°C; 35 ciclos de 1 minuto e 30 segundos a 90°C, 1 minuto.. e 30 segundos a 52°C e 1 minuto e 30 segundos a 72°C.

Anexo X: Isolamento de sequências repetitivas obtidas pela cinética de reassociação do DNA (Cot-1)

O procedimento seguiu o protocolo de Zwick et al. (1997). O DNA genômico foi diluído a 100-500 ng/ μ L em 0,3M NaCl; posteriormente 500 μ L de DNA foram colocados em tubos de 1,5 mL. Este DNA foi autoclavado por 3 a 5 minutos a 1.0 atm/120°C. Em seguida, 3 μ L do DNA autoclavado foram aplicados em gel de agarose 1% para checar o tamanho dos

fragmentos obtidos (ideal obter fragmentos entre 100 e 1.000 pb). A seguir, 3 alíquotas (tubos 0, 1 e 5) com 50 µL do DNA autoclavado foram desnaturadas em banho a 95°C por 10 minutos. Os tubos foram então passados para gelo por 10 segundos: o tubo 0 foi imediatamente tratado com S1 nuclease (Promega) e os tubos 1 e 5 foram colocados em banho a 65°C para renaturação. Após 1 minuto, o tubo 1 foi retirado e tratado com S1 nuclease, e após 5 minutos, o tubo 5 sofreu o mesmo processo. Para o tratamento com S1 nuclease, foi utilizada 1U da enzima para 1µg de DNA e 5,5 µL tampão [20mM Tris-HCl (pH 7.5 at 25°C), 0,1mM ZnCl₂, 50mM NaCl e 50% (v/v) glicerol] 10x para o volume final de 50 µl. As amostras foram incubadas a 37°C por 8 minutos e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido; em seguida igual volume de fenol/clorofórmio (1:1) foi adicionado. As amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 13.000 rpm. Coletou-se a fase aquosa e esta foi passada para um tubo novo. O DNA foi precipitado com 2,5 volumes de etanol absoluto gelado, e então deixado no freezer a -80°C por 30 minutos. Decorrido este tempo, foi centrifugado por 15 minutos a 16.000 rpm a 4°C. Posteriormente, as amostras foram colocadas para secar e ressuspensas em 50 µl de água milliQ autoclavada. O DNA foi checado em gel de agarose 1%.

Anexo XI: Hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com sondas B, DNA repetitivo As51 de *C₀t-1*, rDNA 18S e rDNA 5S.

A. Preparação das sondas

Foram empregadas uma sonda cromossômica e quatro sondas de DNA repetitivos para a localização dessas seqüências nos cromossomos metafásicos dos exemplares de *Astyanax scabripinnis* estudados: (1) sonda do DNA total do cromossomo B de *Astyanax scabripinnis*

obtida por meio de microdissecção cromossômica; (2) sonda do DNA repetitivo As51 obtida por meio de digestão enzimática do peixe *Astyanax scabripinnis* (MESTRINER et al., 2000) ; (3) sonda de DNA repetitivo C₀t-1, isolada a partir de DNA extraído do fígado de *Astyanax scabripinnis*, seguindo protocolo de Zwick et al. (1997), (4) 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 Jr., 2004) e (5) sonda de rDNA 5S, obtida a partir da espécie de peixe *Leporinus elongatus* (MARTINS E GALETTI JR Jr., 1999).

B. Marcação das sondas

A sonda cromossomo B foi marcada em reação de DOP-PCR utilizando o nucleotídeo modificado biotina 14-dATP (Invitrogen). A reação de PCR consistiu de: tampão 1x da *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), 2 mM MgCl₂, 400 µM dTTP, dGTP e dCTP, 200 µM de dATTP, 200 µM de dATP 14- biotina, 2 µM DOP primer e 2 U de *Taq* polimerase. As sondas DNA satélite As51; C₀t-1 total; rDNA 18S foram marcadas pela técnica de nick translation, utilizando o composto digoxigenina 16 - dUTP (Dig Nick Mix - Roche), e a sonda rDNA 5S foi marcada com biotina pela técnica de nick translation, utilizando o composto biotina 16 - dUTP (Nick Translation Biotin - Roche).

C. Preparação da solução de hibridação

Em todas as FISH, a mistura de hibridação consistiu de: 200 µL Formamida 50%; 80 µL Sulfato de Dextrano 50% (concentração final de 10%); 40 µL 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 2x SSC, 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 1 x 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, por 5 minutos em cada banho. Os cromossomos foram então contra corados com DAPI (0,2 µg/mL) diluído em uma solução “antifade” (Fluka).

Anexo XII: Análises dos resultados

Os cromossomos foram organizados em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), e subtelocêntricos (st), e acrocêntricos (a) 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 microscópio de epifluorescência Olympus BX41 acoplado ao sistema de captura de Imagens DP 71 (Olympus).