

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

**EVOLUÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO CROMOSSÔMICA ENTRE OS
SEXOS NO GÊNERO *Gymnotus* (GYMNOTIFORMES,
GYMNOTIDAE)**

MAELIN DA SILVA

**Ponta Grossa
2010**

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

EVOLUÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO CROMOSSÔMICA ENTRE OS
SEXOS NO GÊNERO *Gymnotus* (GYMNOTIFORMES,
GYMNOTIDAE)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biologia Evolutiva, da Universidade Estadual de Ponta Grossa em associação com a Universidade Estadual do Centro Oeste do Paraná, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de concentração: Biologia Evolutiva).

Ponta Grossa
2010

Ficha Catalográfica Elaborada pelo Setor de Processos Técnicos BICEN/UEPG

S586e

Silva, Maelin da

Evolução da diferenciação cromossômica entre os sexos no
Gênero Gymnotus (Gymnotiformes, Gymnotidae). / Maelin da Silva.
Ponta Grossa, 2010.

111f.

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. Roberto Ferreira Artoni

Co-orientador : Prof. Dr. Vladimir Pavan Margarido

1. Gymnotidae. 2. Cromossomos sexuais de origem recente.
3. Meiose. 4. DNAr 5S 5. DNA repetitivos. I. Artoni,
Roberto Ferreira. II. Margarido, Vladimir Pavan. 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. 09/2009

Ata referente à Defesa de Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, uma Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa e a Universidade Estadual do Centro-Oeste, pela candidata **MAELIN DA SILVA**. Aos doze 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. Roberto Ferreira Artoni, em sessão pública, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação do (a) aluno(a) **MAELIN DA SILVA**, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-área de concentração Biologia Evolutiva, visando o título de Mestre, constituída pelos: Dr. Roberto Ferreira Artoni (Orientador), Dr^a. Mara Cristina de Almeida Matiello, Dr. Orlando Moreira Filho, Dr. Vladimir Pavan Margarido e Dr. Marcelo Ricardo Vicari. 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: **Evolução da Diferenciação Cromossômica entre os sexos no Gênero *Gymnotus* (*Gymnotiformes Gymnotidae*)**. 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. Roberto Ferreira Artoni _____
Prof^a Dr^a Mara Cristina de Almeida Matiello _____
Prof. Dr. Orlando Moreira Filho _____
Prof. Dr. Vladimir Pavan Margarido _____
Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari _____

**Orientador: Prof. Dr. Roberto
Ferreira Artoni**

**Co-orientador: Prof. Dr. Vladimir
Pavan Margarido**

Dedico esse trabalho aos meus pais Gessi e Eroni por me apoiarem quando me faltava forças para continuar a percorrer a caminhada.

O desenvolvimento da ciência e das atividades criativas do espírito exige uma liberdade que consiste na independência do pensamento em relação às restrições do preconceito autoritário e social, e isso exige cultivar mentes livres e espíritos livres; um espírito de tolerância. O fundamento da tolerância é a humildade – a convicção de que ninguém tem o direito de impor ideias e crenças aos outros.

Albert Einstein

“Mais inteligente é aquele que sabe que não sabe.”

Socrates

AGRADECIMENTOS

Quero expressar meus agradecimentos a todas as pessoas que me incentivaram, e que juntas trilharam em diferentes períodos esta caminhada comigo, e que hoje se materializa neste trabalho.

Quero agradecer aos meus pais Gessi e Erony, que apesar das limitações sempre me incentivaram a correr em busca dos meus sonhos. As Minhas irmãs Marina e Eduarda. Meus sobrinhos Gabriely e Helinho e o Hercules meu Priminho. Juntos sempre formaram o meu porto seguro.

Quero agradecer em especial a uma grande amiga e incentivadora deste trabalho, Dra. Daniele Matoso, e que gentilmente me emprestou sua família, a qual tão calorosamente me recebeu. Seu Darci e Dona Aurora, muito obrigada. Dani espero que nossa amizade seja para sempre, pois são raras as amizades verdadeiras. Agradeço também a sua imensa contribuição neste trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni por me receber e investir na minha formação e acima de tudo acreditar na minha capacidade de realizar este trabalho. Sua capacidade de ver amplamente, sobretudo verdades escondidas é um dádiva.

Ao meu Co-Orientador e pai científico Prof. Dr. Vladimir Pavan Margarido, o qual me apresentou a citogenética, e contribuiu imensamente para minha formação.

Ao Prof. Dr. Marcelo Vicari, pela ajuda na bancada, pelas conversas científicas e momentos de descontração. A Prof. Dra. Mara Almeida Matielo pela ajuda nas meioses, conversas no laboratório, discussão de artigos. A Prof.Dra. Viviane Vicari, pela ajuda nos experimentos.

Aos meus colegas de laboratório, com os quais eu convivi mais nestes dois últimos anos do que com a minha família, e felizmente foi uma ótima convivência: Danizinha Tasior, Edemar, Bárbara, Cleberson, Leonardo, Alan, Paulo, Talita, Carla, Thais. Aos meus colegas de laboratório e também de mestrado João Felipe, Micheli, Helena, e Neto.

Netinho, meu preto querido um dos grandes amigos que conquistei em Ponta Grossa, tenho certeza que nossa amizade será para sempre.

Ao pessoal de Manaus que tão gentilmente me recebeu. A Prof. Eliana Feldberg que me recebeu em seu laboratório, obrigada professora. Ao Carlos e a Maria Claudia, muito obrigada gente.

Aos amigos do laboratório de Citogenética de Cascavel Jocicléia, Vanessa, Carol.

Ao Miguel, nosso técnico de laboratório, e muito mais que isso nosso amigo e “Magaiver” sempre presente para resolver as mais difíceis tarefas.

A Zoli nossa secretária sempre tão prestativa.

A Universidade Estadual de Ponta Grossa, pelo suporte.

A Universidade Estadual do Oeste do Paraná pela excelente parceria.

A Capes pela bolsa concedida para a realização deste trabalho.

RESUMO

A ordem Gymnotiformes compreende os peixes elétricos, que estão amplamente distribuídos pelas Américas Central e do Sul. A família Gymnotidae possui apenas dois gêneros *Gymnotus* e *Eletrophurus*, sendo que este último foi recentemente incluído à família. O gênero *Gymnotus* é o mais especioso da ordem com 33 espécies, e é também o que comporta maior número de estudos citogenéticos. O presente trabalho teve por objetivos analisar o comportamento meiótico do sistema de cromossomos sexuais múltiplo $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ em *G. pantanal*. Isolar sequências de DNA repetitivo das três espécies que habitam em simpatria o rio Piquiri – Paraná – Brasil: *G. sylvius*, *G. paraguensis* e *G. pantanal*, e neste último a possível associação dessas sequências aos cromossomos sexuais. E mapear o DNAr 5S em *G. paraguensis* e *G. pantanal*. A Análise meiótica revelou a formação de um trivalente no estágio de paquíteno da Prófase I em *G. pantanal* formado pelos cromossomos X_1 , X_2 e Y, pareados complementarmente caracterizando um sistema de determinação sexual recente. A metáfase II apresentou células com $18+Y$ e $18+X_1X_2$ cromossomos, caracterizando uma disjunção típica dos cromossomos sexuais, dando origem a gametas balanceados. O mapeamento de sequências de DNA repetitivos isolados por *Cot* – 1 apresentou localização em região centromérica e na região das regiões organizadoras de nucléolos de todas as espécies analisadas, inclusive nos cromossomos sexuais de *G. pantanal*, padrão coincidente com blocos heterocromáticos. A hibridização com sondas de DNAr 5S revelou padrão de marcação próprio em todas as espécies analisadas. Nossos dados sugerem uma origem recente para os cromossomos sexuais de *G. pantanal* e uma dinâmica evolutiva diferenciada para distribuição do DNAr 5S no cariótipo das espécies analisadas. Sugerindo que este caráter possa ser mais amplamente utilizado entre os Gymnotidae como marcador citotaxonômico.

Palavras chaves: Gymnotidae, cromossomos sexuais de origem recente, meiose, DNAr 5S, DNA repetitivos.

Abstract

The order Gymnotiformes ranges the electrical fish. It's distributed by South and Central America. Family Gymnotidae show two genus; *Gymnotus* and *Eletrophurus*, the last one was recently included in this family. Genus *Gymnotus* is the most widespread and show 33 species and present great number of cytogenetics studies. Our objectives in the present study were analyse the meiotic behaviour of multiple sexual chromosomes system $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ of *G. pantanal*, isolate sequences of repetitive DNA from three species of *Gymnotus*; *G. sylvius*, *G. paraguensis* and *G. pantanal*, inhabiting in simpatry at Piquiri River - PR – BR, verify the association of these sequences with sexual chromosomes and mapping the rDNA 5S gene at *G. paraguensis* and *G. pantanal*. Meiotic analysis of *G. pantanal* presented one trivalent in pachytene of profase I formed by X_1 , X_2 and Y chromosomes, totally paired characterizing a recent sexual chromosomes system. In the metaphase II was visualized cells $18+Y$ and $18+X_1X_2$ chromosomes with normal disjunction of sexual chromosomes and balanced gametes. The mapping of repetitive DNA sequences, isolated by *Cot1*, presented location in centromeric and Nucleolar Organization Regions (NORs) of all analyzed species, included the sexual chromosomes of *G. pantanal*, standard similar of heterochromatin obtained by C banding. Hybridization with rDNA 5S probes presented a standard unique for all species analyzed. Our data suggest a recent origin for sex chromosomes of *G. pantanal* and a differentiate evolutionary dynamic for the distribution of rDNA 5S in the karyotype of species analyzed, suggesting that character can be broadly utilized among the Gymnotidae as cytotaxonomic marker.

Lista de figuras

Introdução

Figura 1 – Mapa da distribuição dos Gymnotiformes na região Neptropical	15
Figura 2 – Espécimes do gênero <i>Gymnotus</i> : a) <i>G. paraguensis</i> ; b) <i>G. sylvius</i> e c) <i>G. pantanal</i>	32
Figura 3 - Mapa hidrográfico do Paraná. Em destaque local de coleta	33

Capítulo I

Figura 1 - Sequências isoladas por $C_{ot} - 1$. a) DNA após 1 min. na autoclave; b) DNA após tratamento com a enzima <i>S1</i> nuclease.	48
Figura 2 - Alinhamento das Sequências clonadas de <i>G.paraguensis</i> . Os pontos indicam as bases idênticas. Os traços indicam <i>indels</i>	49
Figura 3 - Alinhamento das sequências clonadas de <i>G.sylvius</i> . Os pontos indicam as bases idênticas. Os traços indicam <i>indels</i>	49
Figura 4 - Dendograma de agrupamento entre as sequências clonadas, pelo método de parcimônia.	49
Figura 5 – Bandamento C a) <i>G. sylvius</i> ; b) <i>G. paraguensis</i> . Marcações em região pericentromérica.....	50
Figura 6 – Hibridização <i>in situ</i> com as sondas isoladas por $C_{ot} -1$: a) <i>G. sylvius</i> ; b) <i>G. paraguensis</i>	50

Capítulo II

Figura 1 - Cariótipo de <i>Gymnotus pantanal</i> : macho a) giemsa e b) banda C; fêmea c) giemsa e d) banda C.	64
Figura 2 - Prancha meiótica de <i>Gymnotus pantanal</i> a) Zigóteno; b) Paquíteno evidenciando a conformação do trivalente (seta) formado pelos cromossomos	

sexuais X_1X_2Y ; c) Desenho esquemático da figura a; d) Diplóteno com 18 bivalentes+ X_1X_2Y ; a seta grande indica a conformação dos cromossomos sexuais, e, f) metáfase II mostrando a formação de gametas balanceados..... 65

Figura 3 - Gel de agarose 1% evidenciando amostras de: a) DNA total 5 minutos em autoclaveagem; b) DNA tratado com a enzima *S1 nuclease* após autoclave; c) fragmentos de DNA isolados e clonados. 65

Figura 4 - Sinais positivos de hibridização obtidos com a sonda isolada por *Cot*-1 a) fêmea e b) foto em escala de cinza; c) macho e d) foto em escala de cinza. Todas as marcações em posição centromérica. 66

Capítulo III

Figura 1: Gel evidenciando o tamanho das bandas amplificadas de DNAr 5S..... 78

Figura 2: Alinhamento do DNAr 5S de *G. paraguensis* e o transposon Tc1-like de *Labeo rohita*. A reta preta indica o DNAr 5S, e a vermelha indica o início do alinhamento entre as sequências do NTS e Tc1-like.. 78

Figura 3: Mapeamento de DNAr 5S; a) *Gymnotus pantanal*; b) *G. paraguensis*..... 79

SUMÁRIO

Resumo	08
Abstract.....	09
Lista de figuras.....	10
Sumário	11
Introdução.....	14
2 –Justificativa e Objetivos	31
3 – Material e Métodos	32
4 - Resultados.....	36
Capítulo I – Mapeamento e composição das regiões repetitivas e heterocromáticas de <i>Gymnotus sylvius</i> e <i>Gymnotus paraguensis</i>.....	38
Capítulo II – DNA repetitivo e comportamento meiótico dos cromossomos sexuais de <i>Gymnotus pantanal</i> (Gymnotiformes, Gymnotidae)	52
Capítulo III – Mapeamento físico do DNAr 5S em duas espécies de <i>Gymnotus</i> (GYMNOTYFORMES, GYMNOTIDAE): diversidade e dinâmica evolutiva.....	69
Conclusões	81
Referências Bibliográficas	83
Anexos	96
5.1 – Protocolos – Citogenética Convencional	96
5.2 – Protocolos - Citogenética Molecular	101
6 .1– Parecer 02/2008 (protocolo 04509/08) da Subcomissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Ponta Grossa	109

6.2 – Licenças permanente para coleta de material zoológico emitida pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA (proc. no. 15115-1)	110
---	-----

Introdução Geral

1 - Peixes da Ordem Gymnotiformes

A ordem Gymnotiformes compreende os peixes elétricos ou *Knifefishes* conhecidos popularmente como túviras, sarapós e poraquês. Endêmica da região Neotropical (Campos-da-Paz, 2003) está amplamente distribuída, desde os Pampas na Argentina até o Chiapas, no México (Figura 1), e alcançam sua maior diversidade e abundância na bacia amazônica (Albert e Miller, 1995; Albert e Campos-da-Paz, 1998; Oyakawa et al., 2006). Importante componente da ictiofauna noturna de peixes de água doce da América do Sul os membros da ordem Gymnotiformes são divididos em cinco famílias: Gymnotidae, Sternopygidae, Rhamphichthyidae, Hypopomidae, Aptereronotidae (Albert e Campos-Da-Paz, 1998).

Com anatomia externa bastante diferenciada dos demais peixes neotropicais os Gymnotiformes são facilmente identificáveis. Seus representantes possuem um corpo alongado e comprimido lateralmente, escamas ciclóides, nadadeiras dorsal e caudal ausentes, nadadeira anal muito longa com mais de 150 raios, olhos pequenos e geralmente recobertos por pele, órgãos internos compactados na porção anterior do corpo e o ânus localizado na altura das nadadeiras peitorais (Alves-Gomes, 1998). A porção caudal do corpo é alongada e a postura rígida em toda a porção pós-cranial do corpo é mantida por numerosos ossos intermusculares (Albert e Campos-da-Paz, 1998; Oyakawa et al., 2006).

Mesmo com tantas características únicas talvez a característica mais notável esteja na habilidade de autogerar e utilizar campos elétricos, tanto para

eletrolocalização de objetos e outros organismos, quanto para a interação social (Campos-da-Paz, 2003). Os órgãos de descarga elétrica (ODEs) podem ser classificados como sendo do tipo “onda” ou “pulso”, dependendo da taxa de repetição (Alves-Gomes 1998). Devido as suas características incomuns, mas relativamente simples, os ODEs dos Gymnotiformes tem sido alvo de diversos estudos, principalmente sobre neurobiologia e ecologia (Heiligenberg, 1990; Stopa e Hoshino, 1999; Stoddard, 2002). As descargas elétricas são específicas para cada espécie e são utilizadas como um caráter para identificação e descrição de espécies (Albert e Crampton, 2001).



Figura 1 – Distribuição endêmica dos Gymnotiformes restrita a região Neotropical (Albert e Campos-da-Paz, 1998).

1.1 - Família Gymnotidade

Os *naked-back knifefishes* como também é conhecida a família Gymnotidae caracterizam-se morfologicamente por possuírem um corpo mais cilíndrico e cabeça achatada, em relação aos outros Gymnotiformes. Compreende os gêneros *Gymnotus* e *Eletrophurus*, sendo que o último foi recentemente incluso na família e possui somente uma espécie (Albert, 2001). São peixes de pequeno a médio porte popularmente conhecidos como morenitas ou túviras (Graça e Pavanelli, 2007).

Gymnotus é o gênero de Gymnotiformes mais amplamente distribuído e é encontrado na sua maioria em águas continentais da América do Sul, principalmente na bacia amazônica, com 18 espécies (Albert et al., 2005). É também o gênero mais especioso da ordem com 33 espécies descritas (Froese e Pauli, 2009), das quais 22 são brasileiras (Campos-da-Paz e Buckup, 2007).

Os Gymnotideos são predadores noturnos agressivos e podem exibir um comportamento territorialista e de cuidado com a prole. Com relação a respiração estes peixes podem também respirar o ar atmosférico. As espécies de *Gymnotus* são capazes de usar parte de seu sistema de bexiga-natatória em certas ocasiões, enquanto que *Eletrophorus* é considerado dependente do ar-atmosférico, possuindo um órgão respiratório oral vascularizado (Campos-da-Paz, 2003).

As espécies de *Gymnotus* possuem escamas ciclóides, boca grande e prognata e são fracamente elétricos, enquanto as espécies de *Eletrophorus*, por outro lado, não possuem escamas, a boca é terminal e quando adultos são capazes de gerar descargas elétricas de até 600 volts (Campos-da-Paz, 2003). A presença de bandas pigmentadas é talvez a característica mais chamativa de

diversidade interespecífica e da variação geográfica em *Gymnotus*. Sendo que a condição plesiomórfica é a presença de 18 a 23 bandas oblíquas e escuramente pigmentadas com ondulações nas margens que são pálidas nas fases de crescimento, resultando na aparência de pares de bandas nos adultos. O papel ecológico das bandas pigmentadas parece estar associado à função de coloração críptica e assim evitar a predação (Albert et al., 2005).

Muitas espécies de *Gymnotus* são encontradas em assembléia. Na área de Tefé na Amazônia Ocidental, por exemplo, ocorrem 11 espécies em simpatria (Crampton, 1998; Albert e Crampton, 2001; Crampton et al., 2005). A capacidade de algumas regiões suportarem a coexistência de muitas espécies ainda é pouco conhecida. Estudos sugerem o papel de fatores ecológicos e históricos, bem como a natureza dos sinais elétricos específicos para cada espécie (Crampton et al., 2005).

Segundo estes autores as assembléias de *Gymnotus* não representam o resultado de radiação local ou regional, mas de processos combinados incluindo especiação *in situ*, extinção, imigração e fatores ecológicos que permitiram a coexistência simpátrica. Margarido et al., (2007) atribuíram a condição simpátrica de três espécies de *Gymnotus* no Alto Rio Paraná a ação antrópica. A barragem do Rio Paraná para a construção da usina hidrelétrica de Itaipu permitiu o contato de espécies que até então estavam isoladas por uma barreira geográfica natural, as Sete Quedas, permitindo o contato e posteriormente levada a condição simpátrica de *Gymnotus paraguensis*, *G. sylvius* e a espécie invasora *G. pantanal*. Os autores levantaram outra hipótese também por interferência humana. O transporte da localidade de origem destas

espécies para outra região para serem utilizadas como iscas-vivas por pescadores, para a pesca de grandes peixes na região do Paraná.

Contudo em nenhum dos casos relatados acima, ocorre a formação de híbridos interespecíficos, ressaltando as barreiras pré-zigóticas de isolamento entre as espécies.

1.2 - Estudos citogenéticos na família Gymnotidae

O gênero *Gymnotus* é o que apresenta maior número de estudos citogenéticos dentre os Gymnotiformes, das 33 espécies que compõem o grupo dez apresentam descrição de cariótipo, localização da região organizadora de núcleos (AG-RONs) e heterocromatina (Margarido et al., 2007; Lacerda e Maistro, 2007; Milhomen et al., 2007). Contudo, os estudos de mapeamento de genes ribossômicos são escassos, somente *Gymnotus sylvius* e *Gymnotus carapo* possuem descrição da localização do DNAr 5S e 18S (Claro, 2008). Os estudos citogenéticos realizados na família Gymnotidae estão sumarizados na tabela 1.

O gênero *Eletrophurus* que possui uma única espécie foi recentemente cariotipado. Duas populações de *Eletrophurus electricus* uma da do rio Amazonas (Almerim - Pará) e outra do rio Araguaia (Nova Crixás – Goiás) apresentaram padrão cromossômico observado para outros membros da família com $2n = 52$ cromossomos e predomínio de morfologia meta/submetacêntricos. Contudo a localização das regiões organizadoras do nucléolo (Ag-RONs) foi divergente entre as duas populações. A população do rio Amazonas apresentou marcação pelo nitrato de Prata no par metacêntrico grande identificado como par 2, em região pericentromérica do braço longo,

com uma segunda marcação também em região pericentromérica do par metacêntrico 4, em somente um dos homólogos. A população do rio Araguaia apresentou somente um par metacêntrico, identificado como o primeiro par, também marcado pela Prata em região logo abaixo do centrômero (Fonteles et al., 2008). Este padrão se mostra divergente quando comparado ao outro gênero da família, *Gymnotus* que apresenta as RONS localizadas em região terminal do braço curto de cromossomos geralmente acrocêntricos (tabela 1).

1.2.1 - Cromossomos sexuais

A presença de cromossomos sexuais determina diferenças cariotípicas entre o sexo feminino e o sexo masculino. Essa diferença, ou seja, a heterogametia pode ocorrer tanto nos machos quanto em fêmeas. Quando a heterogametia ocorre na fêmea o sistema é designado ZZ/ZW, onde o cromossomo identificado como W é o diferenciado. Este tipo de sistema cromossômico é amplamente descrito em grupos de invertebrados como Lepidóptera (Vítková et al., 2007) e considerado uma característica compartilhada entre répteis como cobras vipérides (Beçak et al., 2003) e esta na base da filogenia das aves (Matsubara et al., 2006). Quando a heterogametia ocorre no macho o sistema é identificado como XX/XY e o cromossomo Y é o heteromórfico. O sistema XX/XY já foi descrito para espécies de peixes e outros organismos, no entanto é comumente encontrado em mamíferos como uma característica basal (Matsubara et al., 2006). Os sistemas simples de diferenciação sexual, aqueles que envolvem somente um par de cromossomos, estão geralmente associados ao processo de

heterocromatinização total ou parcial do cromossomo heteromórfico W ou X (Charlesworth e Charlesworth, 2000).

A diferenciação cromossômica entre os sexos pode também ser determinada por sistemas múltiplos de cromossomos sexuais, onde mais que um par cromossômico é responsável pela determinação sexual. São formados por eventos de translocação Robertsonianas, ou eventos de fissão e fusão, inversões com pouco ou quase nenhum envolvimento de heterocromatina como no caso dos peixes (Moreira-Filho et al., 1993).

Em peixes a diferenciação cromossômica entre os sexos não é um evento comum, entretanto, com avanço dos estudos citogenéticos no grupo várias espécies em diferentes ordens já tiveram descrição de tal diferenciação. Por se tratar de um grupo de vertebrados basal e extremamente diverso é encontrado na literatura descrições de vários tipos de sistemas de cromossomos sexuais (Bertollo et al., 1997; Bertollo e Mestriner, 1998; Maistro et al., 1998; Born e Bertollo, 2000; Wasko et al., 2001; Venere et al., 2004; Silva e Margarido, 2005; Vicari et al., 2006).

A ordem Gymnotiformes pode ser citada como um exemplo interessante para a presença de cromossomos sexuais em peixes. Das cinco famílias descritas para esta ordem três possuem espécies com cromossomos sexuais morfologicamente diferenciados, sendo que vários tipos tem sido descritos, sugerindo que o aparecimento destes sistemas seja independente, sem origem em um ancestral comum, sugerido pelas diferenças entre os cromossomos identificados como sexuais, presença de regiões heterocromáticas e principalmente pelo tipos de sistemas apresentados (Almeida-Toledo e Foresti, 2001).

Até o momento foram descritos sistemas de cromossomos sexuais nas famílias Gymnotidae (*Gymnotus pantanal*), Sternopygidae (*Eigenmannia* sp.) e Hypopomidae (*Brachyhypopomus pinicaudatus*) (Silva e Margarido, 2005; Almeida-Toledo *et al.*, 2000a; Almeida-Toledo *et al.*, 2000b).

A família Gymnotidae esta arranjada em posição basal dentro da ordem Gymnotiformes (Alves-Gomes *et al.*, 1995; Albert, 2001) e como tal, a evolução cariotípica ganha destaque, especialmente em relação a presença, origem e diferenciação de cromossomos sexuais.

1. 3 – Sequências de DNA repetitivo

Sequências de DNA repetitivo são geralmente classificadas dentro de duas classes: sequências que são repetitivas em *tandem*, e que são arranjadas em sucessivas repetições como DNA satélites e microssatélites que são compostos por poucas centenas de pares de bases repetidas um milhão de vezes ou mais em cada genoma. Também por sequências que podem estar moderadas a altamente repetitivas e que estão dispersas pelo genoma, como elementos transponíveis e retroelementos (Jurka *et al.*, 2005). Cópias deste tipo de sequência estão comumente associadas a regiões de heterocromatina, detectadas por técnicas como o bandamento C. Essas sequências não codificantes são extremamente importantes na organização estrutural e funcional do genoma eucarioto, a exemplo de regiões heterocromáticas pericentroméricas (Grady *et al.*, 1992; Schueler *et al.*, 2001).

Sequências moderadamente repetitivas dispostas em *tandem* com função conhecida na síntese de proteínas são detectadas por sondas para os DNA ribossômicos (45S e 5S) muito conservados evolutivamente, similar em

todos os eucariotos, utilizado como uma ferramenta importante para estudos evolutivos.

Em eucariotos arranjos em *tandem* dos genes RNA ribossômicos estão organizados em duas famílias multigênicas distintas, compostas por centenas de milhares de cópias. Uma família é representada pelo DNAr 45S a qual codifica os RNAr 18S, 5,8S e 28S, a qual é comumente localizada indiretamente por nitrato de prata, que se liga as proteínas envolvidas na transcrição. A outra é representada pelo DNAr 5S que codifica o RNAr 5S, um dos componentes da subunidade maior dos ribossomo. O arranjo do DNAr 5S consiste em sequências codificantes de 120 pb que são separadas umas das outras por um DNA espaçador não transcrito (NTS). Este DNAr não é localizado pelo nitrato de prata, sendo necessário a utilização de sondas específicas para a localização cromossômica através da hibridização *in situ* (Galetti, Jr. e Martins, 2006).

Além do DNAr, sequências altamente repetitivas de DNA telomérico (TTAGGG)_n que ocorre em região terminal de cada cromossomo e sequências de DNA centromérico (por ex. DNA alfa satélite humano), também são exemplos de sequências conservadas e repetidas em *tandem*, embora essa última possua geralmente grande diversidade de sequências distintas associadas (Guerra, 2004).

É consenso que sequências repetitivas de DNA constituem um componente substancial do genoma de todos os eucariotos. No entanto, pouco se conhece a cerca de possíveis funções desta fração do genoma. Frequentemente, sequências repetitivas resultam de desvios do processo de replicação ou pela dispersão de elementos transponíveis. O excesso dessas

sequências requer um gasto maior de energia para a replicação, e ainda pode interferir o mecanismo de crossing-over, gerando recombinação desigual entre elementos homólogos (Hiesh e Fire, 2000).

Contudo, é certo que as sequências repetitivas têm um papel importante na evolução da estrutura e função do genoma em vertebrados e outros eucariotos, e dada a grande porção do conteúdo de DNA as células e a variação do tamanho do genoma entre os eucariontes (Brenner et al., 1993).

1.3.1 – Associação de elementos repetitivos a cromossomos sexuais

Cromossomos sexuais ou alossomos, normalmente apresentam grandes blocos de heterocromatina (Artoni et al., 2001). Regiões heterocromáticas possuem grande quantidade de sequências repetitivas associadas, tanto de repetições em *tandem* como dispersas (Hiesh e Fire, 2000). Cromossomos em avançado estágio de diferenciação são depósitos de sequências repetitivas derivadas de elementos transponíveis como transposons e retrotransposons (Charlesworth e Charlesworth, 2000).

Segundo Charlesworth e Charlesworth (2000), o acúmulo de sequências repetitivas em proto-cromossomos sexuais é um passo inicial na diferenciação dos alossomos. O cromossomo portador de genes sexo-específico é suprimido de recombinação, e desta forma diverge, acumulando sequências repetitivas múltiplas incluindo elementos transponíveis.

O peixe Platyfish (*Xiphophorus maculatus*) teve diversas sequências repetitivas isoladas de seus cromossomos X e Y, incluindo numerosos elementos transponíveis tais como: SINEs (*Short interspersed nuclear element*), LTR (*long terminal repeat*), MITE (*miniature inverted repeat*

transposable element) e retrovírus endógenos. Alguns desses identificados pela primeira vez em peixes e em vertebrados (Schultheis et al., 2006). Estes mesmos autores propuseram que as regiões de determinação sexual em *Xiphophorus* são ricas em elementos transponíveis e outras classes de DNA repetitivo que frequentemente podem sofrer rearranjos genômicos, particularmente duplicações e deleções. Alguns desses rearranjos podem corresponder a eventos iniciais de diferenciação molecular importantes para a supressão da recombinação ao redor dos locos de determinação sexual entre os cromossomos X e Y.

Esta linha de pensamento parece se confirmar, altas concentrações de elementos transponíveis tem sido observadas em cromossomos sexuais de muito táxons distantes filogeneticamente como em grupos de invertebrados e mamíferos. Esta agregação causa remodelação dos cromossomos sexuais ocorrendo: (1) aprisionamento e acúmulo de retrotransposons; (2) silenciamento de genes que flanqueiam regiões sexo-específico; (3) duplicações de regiões do DNA; (4) deleção de genes e regiões intergênicas. Desta forma, o silenciamento e inativação de alelos do neo-Y forçam regiões homologas do neo-X em machos a adotar mecanismos de compensação de dose (Steinemann e Steinemann, 2005).

Quanto aos peixes neotropicais são poucas as espécies com que possuem sequências repetitivas sexo-específico isoladas e mapeadas. Destacam-se algumas espécies da ordem Characiformes: *Leporinus elongatus* (Nakayama et al., 1994), *Hoplias malabaricus* (Born e Bertollo, 2000), espécies do gênero *Triportheus* (Artoni e Bertollo, 2002) e recentemente espécies do gênero *Parodon* e *Apareidon* (Schemberg, 2009). Tendo em vista a grande

diversidade da ictiofauna de peixes neotropicais, ressalta-se a necessidade da expansão de estudos destas sequências em outras ordens para a compreensão da associação das mesmas e a importância na evolução de cromossomos sexuais deste grupo.

1.3.2 – Prospecção de sondas de DNA repetitivos

A hibridização *in situ* fluorescente (FISH) representa uma tecnologia direta, rápida, de alta resolução e bastante eficaz para a detecção e mapeamento de sequências alvo de DNA por meio de uma sonda complementar a sequência de interesse. A revolução crescente desta técnica, não utilizando mais sondas radioativas permitiu grande expansão nas áreas da citogenética clínica, evolutiva e de mapeamento gênico (Yonenaga-Yassuda, 2004). As variantes da FISH como a Zoo-FISH (hibridação de sondas parciais de um grupo animal com propósito de checar homologia com outro grupo animal), e o GISH (hibridação cruzada de sondas a partir do genoma total de uma espécie em outra com o propósito de comparar homologias genômicas) tem auxiliado nos estudos e na compreensão da evolução cromossômica nos mais diversos grupos de vertebrados (Nieves et al., 2005; Hass et al., 2008).

A integração de sequenciamento de DNA com o mapeamento cromossômico físico de elementos repetitivos pode prover um panorama melhor a cerca da estrutura e composição do genoma. Além disso, sequências de DNA repetitivo podem ser bons marcadores cromossômicos, utilizados em estudos evolutivos, identificação de rearranjos cromossômicos e identificação de cromossomos de determinação sexual (Teixeira et al., 2009).

A obtenção de sondas de DNA de natureza repetitiva pode ser obtida por diversas metodologias. Os procedimentos mais empregados são: Digestão do DNA genômico por enzimas de restrição. Uma enzima de restrição que produza clivagem em uma unidade de repetição produzirá cortes idênticos em todas as demais unidades desse DNA repetitivo organizado em *tandem* podendo ser visualizada como banda específica em gel de eletroforese. Esta pode ser recortada do gel e seu DNA extraído e utilizado como sonda (Guerra, 2004).

Bibliotecas genômicas são coleções de fragmentos de DNA inseridos em vetores de clonagem que juntos podem cobrir todo o genoma de um organismo, permitindo identificar sequências repetitivas dispersas por exemplo. Assim diversas sondas podem ser obtidas por reação em cadeia da polimerase (PCR), desde que se conheçam as sequências que flanqueiam o DNA alvo, para a construção de *primers* (Guerra, 2004).

O isolamento de sequências repetitivas pode ser realizado pela técnica da cinética da reassociação do DNA – C_{0t} -1. Essa técnica se baseia no aquecimento e quebra do DNA genômico sob pressão ou sonicamente, seguido pelo tratamento com a enzima *S1-nuclease* (Zwich et al., 1997; Ferreira e Martins, 2008). Utilizada primariamente para isolar sequências repetitivas que bloqueassem sinais inespecíficos na hibridização *in situ*, o C_{0t} – 1, vem sendo utilizado com sucesso na separação de sondas de DNA repetitivo de interesse para a compreensão da dinâmica evolutiva deste tipo de sequência em alguns grupos (Ferreira e Martins, 2008; Vicari et al., 2010).

Cromossomos inteiros, ou em partes, também podem ser isolados e utilizados como sondas. Para isso metodologias de citometria de fluxo e

microdissecção ou raspagem cromossômicas tem sido empregadas. Após a separação do cromossomo de interesse este é amplificado por uma reação de PCR específica DOP-PCR (degenerate oligonucleotide primed PCR). Os iniciadores *primers* utilizados nesta reação de PCR são degenerados, e assim amplificam qualquer DNA fornecido na reação (Guerra, 2004).

A utilização destas técnicas permitiu isolar todos os cromossomos de determinadas espécies, como os cromossomos da espécie humana e de camundongos. As sondas de cromossomos inteiros isolados permitiram investigar a evolução cromossômica através de pinturas nas espécies relacionadas filogeneticamente, reconstruindo a história evolutiva dos cromossomos em táxons relacionados (Pieczarka e Nagamachi, 2004).

Tabela 1: Dados citogenéticos descrito para espécies da família Gymnotidae

Espécie	2n	Fórmula cromossômica	Nº Par portador da RON	Localização da heterocromatina	Localidade	*Ref.
<i>Eletrophurus eletricus</i>	52	42m/sm+10a	2q (sm), 4q (sm)	Pericentromérica em todos os cromossomos, e associadas RONS	Rio Amazonas – Almerim – PA BR	1*
	52	42m/sm+10a	1q (sm)	Pericentromérica em todos os cromossomos, e associadas RONS	Rio Araguaia – Nova Crixás – GO BR	1*
<i>G. inaequilabiatus</i>	52	40m+10sm+2st/a	23p (sm)	Pericentromérica em todos os cromossomos, e associadas RONS	Bacia do alto rio Paraná – Rio Claro SP BR	2*
<i>G. paraguensis</i>	54	44m+8sm+2st/a	1p(m)	Pericentromérica em todos os cromossomos, e associadas RONS	Alfenas - MG	3*
	54	52/m/sm+2st/a	27p(st/a)	Pericentromérica em todos os cromossomos, e associadas RONS	Alto rio Paraná- Guaira PR	4*
	54	44m+8sm+2st/a	1p(sm)	Pericentromérica em todos os cromossomos, e associadas RONS	Alto Rio Paraná	2*
<i>G. pantherinus</i>	52	38m+8sm+6st/a	24p(st/a)	Pericentromérica em todos os cromossomos, e associadas RONS	Bacia Costeira do Leste - BR	2*
	52	38m+8sm+2st/a	24p (st/a)	Pericentromérica em todos os cromossomos, e associadas RONS	Alto Rio Paraná	2*
<i>G. sylvius</i>	40	28m+10sm+2st/a	18p(sm)	Pericentromérica em todos os cromossomos, e associadas RONS	Alto Rio Paraná	2*

	40	28m+10sm+2st/a	18p(st/a)	Pericentromérica em todos os cromossomos, e associadas RONS	Bacia Costeira do Leste BR	2*
	40	36m/sm+4st/a	20p(st/a)	Pericentromérica em todos os cromossomos, e associadas RONS	Alto Rio Paraná – Guaira PR BR	4*
	40	30m/sm+10st/a	4p(m/sm)	Pericentromérica em todos os cromossomos, e associadas RONS	Miracatu e São Simão - SP	5*
	40	36m/sm+4st/a	19p(st/a)	Pericentromérica em todos os cromossomos, e associadas RONS	Alfenas – MG BR	3*
<i>G. pantanal</i>	39/40	15m/sm+24st/a (♂) 14m/sm+26st/a (♀)	15p (st/a)	Pericentromérica em todos os cromossomos, e associadas RONS	Baixo rio Paraná – Pantanal - MT BR	6*
	39/40	15m/sm+24st/a (♂) 14m/sm+26st/a (♀)	16p (st/a)	Pericentromérica em todos os cromossomos, e associadas RONS	Alto Rio Paraná – Guairá PR-BR	4*
<i>G. cf. carapo</i>	54	54m/sm	2p(m/sm)	Pericentromérica em todos os cromossomos, e associadas RONS	Miracatu -SP	7*
	54	54m/sm	2p(m/sm)	Pericentromérica em todos os cromossomos, e associadas RONS	Botucatu – SP	7*
	52	50m/sm+2st/a	2p(m/sm)	Pericentromérica em todos os cromossomos, e associadas RONS	Brotas – SP	7*
	48	34m/sm+10st/a	-	Pericentromérica em todos os cromossomos, e associadas RONS	Humaitá- AM	7*
	42	32m/sm+10st/a	18p(st/a)	Pericentromérica em todos os cromossomos, e associadas RONS	Belém – PA	7*
	54	44m+8sm+2st/a	1p(m)	Pericentromérica em todos os cromossomos, e associadas RONS	Mogi Guaçu –SP	7*

<i>Gymnotus</i> sp	81	66m+12sm3st/a (triplóide)	1p(m)	Pericentromérica em todos os cromossomos, e associadas RONS	Rio Mogi Guaçu SP	2*
	54	44sm+8sm+2st/a	1p(m)	Pericentromérica em todos os cromossomos, e associadas RONS	Bacia Costeira do Leste - BR	8*
	52	50m/sm+2st/a	-	Pericentromérica em todos os cromossomos, e associadas RONS	Miracatu – SP	7*
	50	26m/sm+24st/a	p(m)	Pericentromérica em todos os cromossomos, e associadas RONS	Alfenas – MG BR	3*
	40	14m/sm+26st/a	p(a)	Pericentromérica em todos os cromossomos, e associadas RONS	Rio Riachuelo - ARG	9*

Referências: (1*)Fonteles et al.,2008; (2*)Fernandes-Matioli et al., 1998;(3*) Maistro e Lacerda, 2007; (4*) Margarido et al., 2007; (5*) Fernandes et al., 2005;(6*) Silva e Margarido, 2005; (7*) Foresti et al., 1984; (8*) Fernandes-Matioli e Almeida-Toledo (2001); (9*) Sánches et al., 2004.

2 – Justificativa e Objetivos

Mesmo a família Gymnotidae possuindo o maior número de estudos citogenéticos dentro da ordem Gymnotiformes, existe uma carência quanto a estudos citogenéticos moleculares dentro da família. O comportamento meiótico dos cromossomos, em especial os cromossomos sexuais. Por ocupar uma posição basal na filogenia da ordem os Gymnotidae ganham destaque para estudos evolutivos. A análise do comportamento dos cromossomos sexuais bem como as sequências repetitivas associadas são de grande interesse na compreensão da dinâmica evolutiva da estrutura cariotípica e a presença de dimorfismo cromossômico relacionado ao sexo do gênero *Gymnotus*.

Usando marcadores citogenéticos convencionais e moleculares o presente trabalho visou analisar três espécies do gênero *Gymnotus*: *G. sylvius*, *G. pantanal* e *G. paraguensis* que habitam em simpatria o rio Piquiri Bacia do alto rio Paraná na região de Formosa do Oeste – Paraná – Brasil (Figura 3), dando ênfase para o comportamento dos cromossomos sexuais em *G. pantanal*.

As seguintes metas específicas foram estabelecidas:

1 - Analisar o comportamento meiótico dos cromossomos sexuais em *G. pantanal*.

2 – Isolar sequências repetitivas nas três espécies e mapear a sua localização.

3 – Associar as sequências isoladas com os cromossomos sexuais em *G. pantanal*.

4 – Realizar o mapeamento físico do DNAr 5S em *G. pantanal* e *G. paraguensis*.

3 – Material e Métodos

3.1 – Objeto de estudo e locais de coleta

Nesse estudo foram amostrados 58 espécimes do gênero *Gymnotus*: *G. paraguensis* 12 (4 fêmeas e 8 machos), 21 espécimes *G. sylvius* (7 fêmeas e 14 machos) e 25 espécimes de *G. pantanal* (12 fêmeas e 13 machos) (Figura 2). Coletados no rio Piquiri, região de Formosa do Oeste – PR- BR, bacia do Alto rio Paraná (Figura 3).



Figura 2: Espécimes do gênero *Gymnotus*: a) *G. paraguensis*; b) *G. sylvius* e c) *G. pantanal*.

Barra 2 cm.

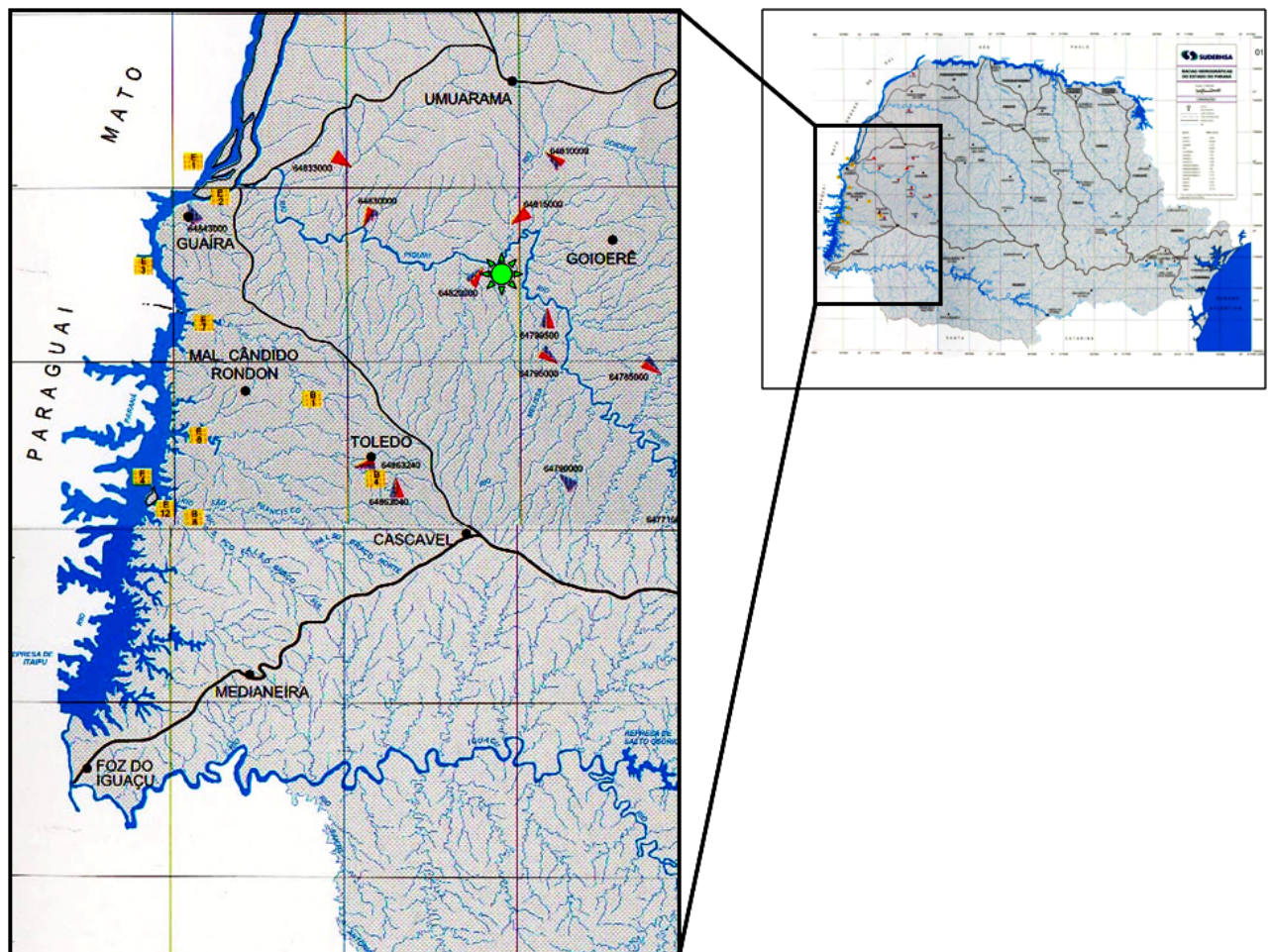


Figura 3: Mapa hidrográfico do Paraná. Em destaque local de coleta.

3.2 – Metodologias

3.2.1 – Citogenética convencional

A técnica utilizada para obtenção de cromossomos mitóticos foi a descrita por Bertollo et al., (1978) (anexo 5.1.1). A preparação e análise de

cromossomos meióticos seguiram o método descrito por Kligermann e Bloom (1977) (anexo 5.1.7). O procedimento utilizado para detecção das regiões organizadoras de nucléolos e bandamento C foi o proposto por Howell e Black (1980) e Sumner (1972), respectivamente (anexo 5.1.4 e 5.1.5).

Os cromossomos foram organizados em classes quanto ao tipo morfológico em metacêntricos (m), submetacêntrico (sm), subtelocêntrico (st) e acrocêntrico (a), dependendo da sua razão de braços (Levan et al., 1964), e arranjados em tamanho decrescente nos cariótipos (anexos 5.1.6).

3.2.2 – Citogenética Molecular

A hibridização *in situ* fluorescente (FISH) para localização de sondas de DNAr 5S e sondas obtidas por $C_{ot} - 1$, foi realizada de acordo com Pinkel et al. (1986) (anexo 5.2.1). As sondas de DNAr 5S foram obtidas através de reação em cadeia da polimerase (*polimerase chain reaction* – PCR) utilizando os *primers* 5'-TACGCCCCGATCTCGTCCGATC-3' e 5'-CAGGCTGGTATGGCCGTAAGC-3' isolados de truta arco-íris (Komiya e Takemura 1979; Martins e Galetti Jr., 1999). A amplificação foi realizada via PCR com termociclador BJI[®]: 5 min. a 94°C; 35 ciclos (1 min 95°C, 30s. a 55°C, 45s a 72°C e 5 min. a 72°C). Os produtos obtidos foram verificados em gel de agarose 1% (anexo 5.2.6). As sondas foram marcadas por reações de *nick translation*, com digoxigenina 11-dUTP (Roche[®]). Para o reconhecimento do sinal foi utilizado anti digoxigenina-rodamina (Roche[®]).

Para a obtenção de sondas de DNA repetitivos de foram utilizadas as técnicas de $C_{ot} - 1$ DNA descrita por Zwick et al. (1997) (anexo 5.2.2) que está baseada na cinética de reassociação do DNA e digestão enzimática por

S1nuclease. A extração de DNA genômico foi realizada de acordo com o método fenol-clorofórmio (Sambrook e Russel, 2001), e também através do método utilizando tampão CTAB (Murray e Thompson, 1980) (anexos 5.2.4 e 5.2.5).

Clonagem dos fragmentos isolados por *Cot* – 1 foi procedido conforme protocolo do Kit de clonagem RPN5110 no plasmídeo vetor pMOSBlue Blunt ended (Amersham Biociences®) para serem posteriormente sequenciadas. O seqüenciamento das amostras foi realizado no laboratório ACTGene (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS) utilizando o sequenciador automático *ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer* armado com capilares de 50 cm e polímero POP6 (Applied Biosystems®). Os DNAs-molde (30 a 45 ng) foram marcados utilizando-se 3,2 pmol do *primer* 5'-NNNNNNNNNNNN-3'E 2µL do reagente *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-110* (Applied Biosystems®) com uma etapa de desnaturação inicial a 96°C por 3min seguida de 25 ciclos de 96°C por 10seg., 55°C por 5seg. e 60°C por 4min. Após marcadas, as amostras foram purificadas pela precipitação com isopropanol e lavagem com etanol 70%. Os produtos precipitados foram diluídos em 10µL de formamida, desnaturados a 95°C por 5 min, resfriados em gelo por 5min e eletroinjetados no sequenciador automático. Os dados de seqüenciamento foram coletados utilizando-se o programa *Data Collection v1.0.1* (Applied Biosystems®) com os parâmetros *Dye Set* "Z"; *Mobility File* "DT3100POP6{BDv3}.mob"; *BioLIMS* "3100Project1" *Run Module 1* "StdSeq50_50cm_cfv_100"; e *Analysis Module* "BC-3100SR_Seq_Fasta.saz".

A análise das metafases foram realizadas em microscópio de epifluorescência Olympus BX41®. As imagens cromossômicas foram

capturadas com a utilização de com o sistema de captura de Imagens CCD Olympus DP 71[®].

4. Resultados

Os resultados estão organizados em três capítulos correspondentes aos artigos científicos

Capítulo I

Mapeamento e composição das regiões repetitivas e heterocromáticas de *Gymnotus sylvius* e *Gymnotus paraguensis*

Capítulo I

Mapeamento e composição das regiões repetitivas e heterocromáticas de *Gymnotus sylvius* e *Gymnotus paraguensis*

Abstract

The location of repetitive DNA sequences is commonly associated at heterochromatin blocks. The sequences of these regions can represent satellites DNA of different compositions. In this study were isolated and mapped repetitive DNA sequences of *Gymnotus sylvius* and *G. paraguensis*. The localization of these sequences, when submitted to fluorescent *in situ* hybridization (FISH) showed association exclusive with centromeres of all chromosomes. The hybridization of isolated sequences of each species with other not presented positive signals of FISH, showing high level of specificity of heterochromatic sequences in these species. In conclusion the sequences that compose the heterochromatin of two species studied are considered species-specific.

Key words: FISH, Heterochromatin, repetitive DNA, *C₀t-1*

Resumo

A localização de sequências de natureza repetitiva está comumente associada a regiões coincidentes aos blocos de heterocromatina, as quais podem ter diferentes sequências satélites. No presente trabalho foram isoladas e mapeadas sequências de DNA repetitivos de duas espécies do gênero

Gymnotus: *G. sylvius* e *G. paraguensis*. A localização destas sequências quando submetidas à hibridação fluorescente *in situ* (FISH) revelou exclusiva associação com a região pericentromérica dos cromossomos das duas espécies. A hibridização cruzada de sequências isoladas de uma espécie em outra não apresentou marcação, mostrando alto nível de especificidade das regiões que compõem a heterocromatina destas espécies confirmado pelo sequenciamento, e principalmente no que se refere a composição pericentromérica, demonstrando inclusive que esse DNA de natureza repetitiva pode ser considerado um marcador espécie-específico.

Palavras-chave: FISH, Heterocromatina, DNA repetitivas, *C₀t-1*

Introdução

Sequências de DNA repetitivo estão amplamente distribuídas nos genomas dos eucariontes (Heslop-Harrison, 2000). São geralmente classificadas dentro de duas classes: sequências que são repetitivas em *tandem*, arranjadas em sucessivas repetições como DNA satélites, minissatélites e microssatélites que são compostos por poucas centenas de pares de bases repetidas um milhão de vezes ou mais em cada genoma. Também por sequências que podem estar moderadas a altamente repetitivas e que estão dispersas pelo genoma, como elementos transponíveis e retroelementos (Jurka et al., 2005). Cópias deste tipo de sequência estão comumente associadas a regiões de heterocromatina, detectadas por técnicas como o bandamento C. Essas sequências são extremamente importantes na

organização estrutural e funcional do genoma eucarioto, a exemplo de regiões heterocromáticas pericentromérica (Grady et al., 1992; Schueler et al., 2001).

A distribuição da heterocromatina nos cromossomos de peixes está preferencialmente disposta em região pericentromérica e relacionada à função estrutural dos cromossomos (Martins et al., 2006; Mazzuchelli e Martins, 2008). As sequências repetidas presentes na heterocromatina centromérica desempenham um papel fundamental no comportamento dos cromossomos durante a divisão celular, devido a afinidade com proteínas do fuso que se ligam a estas sequências (Csink e Henikoff, 1998).

Com os avanços da citogenética molecular sequências de DNA repetitivo podem prover um bom marcador cromossômico para o estudo da evolução das espécies, identificação de cromossomos sexuais e rearranjos cromossômicos (Ferreira e Martins, 2007). O mapeamento de sequências de DNA repetitivos derivadas de elementos transponíveis do tipo SINE e LINE (Oliveira e Wright, 1998; Oliveira et al., 1999) retrotransposons non-LTR da família Rex (Volf et al., 1999) no peixe *Oreochromis niloticus* revelaram fortes marcações em regiões heterocromáticas.

A ordem Gymnotiformes compreende as espécies de peixes neotropicais conhecidas como peixes elétricos. Estudos citogenéticos nestes peixes evidenciam distribuição da heterocromatina preferencialmente localizada na região pericentromérica dos cromossomos (Almeida-Toledo et al., 2001, Margarido et al., 2007). A investigação do DNA repetitivo presente na composição do genoma do grupo ainda é pouco estudada, sendo recente a descrição de alguns casos como em *Eigenmannia virescens* na família

Sternopygidae (Henning, 2007), *G. sylvius* e *G. carapo* na família Gymnotidae (Claro, 2008).

No presente estudo, foram isoladas e mapeadas sequências de DNA repetitivo em duas espécies de peixes elétricos (*G. paraguensis* e *G. sylvius*) com o intuito de ampliar o conhecimento acerca da composição das sequências que compõem a heterocromatina destas espécies, e ainda investigar a presença de sequências repetitivas originadas por introdução de elementos transponíveis.

Material e Métodos

Foram analisados 12 espécimes (4 fêmeas e 8 machos) de *G. paraguensis*, e 21 (7 fêmeas e 14 machos) de *G. sylvius*. A obtenção de cromossomos mitóticos seguiu o protocolo descrito por Bertollo et al. (1978). O bandamento C foi realizado segundo Summer (1972). A extração de DNA genômico foi realizada de acordo com o método fenol-clorofórmio (Sambrook e Russel, 2001). Para a obtenção de sondas de DNA repetitivos foram utilizadas as técnicas de *C₀t-1* DNA descrita por Zwick et al. (1997), adaptado por Vicari et al., (*in press*) que está baseada na cinética de reassociação do DNA e digestão enzimática por *S1 nuclease*. As sondas foram marcadas por reações de *nick translation* com digoxigenina 11-dUTP (Roche®). Para o reconhecimento do sinal foi utilizado anti digoxigenina-rodamina (Roche®). O procedimento de hibridização seguiu o protocolo descrito por Pinkel et al. (1986), sob condição de alta estrigência (77%) (2,5 ng/μL de cada sonda, 50 % de formamida deonizada, 10% sulfato de dextrano, 2X SSC a 37°C por 18

horas). Os cromossomos foram contracolorados com DAPI em meio de montagem Vectashield (Vector®). As preparações foram analisadas em microscópio de epifluorescência Olympus BX41® acoplado a câmera CCD Olympus DP-71®. Para a captura das imagens foi utilizado o software DP controller® (Olympus). As sondas com sinais positivos de hibridização tiveram o produto de PCR purificados e clonados com o Kit de clonagem RPN5110 no plasmídeo vetor pMOSBlue Blunt ended (Amersham Biociences®) para serem posteriormente sequenciadas. O sequenciamento das amostras foi realizado no laboratório ACTGene (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS) utilizando o sequenciador automático *ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer* armado com capilares de 50 cm e polímero POP6 (Applied Biosystems®). Os DNAs-molde (30 a 45 ng) foram marcados utilizando-se 3,2 pmol do *primer* 5'-NNNNNNNNNNNN-3'E 2µL do reagente *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-110* (Applied Biosystems®). Os dados de sequenciamento foram coletados utilizando-se o programa *Data Collection* v1.0.1 (Applied Biosystems®) com os parâmetros *Dye Set* "Z"; *Mobility File* "DT3100POP6{BDv3}.mob"; *BioLIMS* "3100Project1" *Run Module* 1 "StdSeq50_50cm_cfv_100"; e *Analysis Module* "BC-3100SR_Seq_Fasta.saz". As sequências foram alinhadas e editadas pelo programa CLUSTAL W (Thompson et al., 1994) usando os seguintes parâmetros nos alinhamentos: 6.66 e 10.0 para abertura e extensão de *gaps*, respectivamente nos alinhamentos par-a-par e 10.0 e 15.0 para abertura e extensão de *gaps* nos alinhamentos múltiplos. Um dendograma de agrupamento entre as sequências

isoladas por *C₀t-1* foi realizada com o método de Neighbor-Joining e UPGMA no programa computacional v. 4.0b10 (Swofford, 2002).

Resultados

Foram isoladas e clonadas sequências de DNA repetitivo de *G. sylvius*, e *G. paraguensis*. Os fragmentos isolados por *C₀t-1* mostraram tamanho entre 100 e 300pb (Figura 1). Quando submetidos a hibridização *in situ* (FISH) as sondas *cot-total* apresentaram marcação em região pericentromérica de todos os cromossomos das duas espécies estudadas, a exceção dos pares cromossômicos 16 e 17 em *G. sylvius* (Figura 6a). *G. paraguensis* evidenciou um heteromorfismo de tamanho no braço curto relacionado ao acúmulo diferencial de heterocromatina entre os homólogos (Figura 6b). A região em que as sondas hibridizaram é coincidente com a localização dos blocos heterocromáticos nas duas espécies.

A hibridização das sequências isoladas de uma espécie em outra (hibridização cruzada) não revelou sinais fluorescentes de hibridação. O sequenciamento das sequências isoladas de *G. paraguensis* mostrou dois fragmentos de 473pb e 206pb, respectivamente. Quando submetidas a BLAST no Gene Bank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) mostrou identidade de 95% com microssatélite de *Salmo solar* (salmão) depositada neste banco de dados. O fragmento do clone1 mostrou composição bastante heterogênea. A sequência do clone2 apresentou 206pb, com uma repetição de dinucleotídeo CA_n. O alinhamento das duas sequências mostrou pouca homologia (figura 2). Os três fragmentos sequenciados de *G. sylvius* apresentaram 124 pb, 202 pb e 123 pb cada. A composição foi também bastante heterogênea sem repetições

organizadas como mostrado no alinhamento (Figura 3), não apresentando identidade com sequências depositadas no Gene Bank.

Um dendograma de agrupamento para estimar a semelhança entre todas as sequências obtidas foi gerado através do método da parcimônia (Figura 4). As sequências de *G. sylvius* foram agrupadas em um único ramo, e as obtidas de *G. paraguensis* ficaram isoladas em dois outros ramos separados.

Discussão

As sequências que compõem a heterocromatina vêm, nos últimos anos, sendo intensamente estudada. Até pouco tempo atrás considerada DNA lixo, sabe-se hoje que estas sequências podem estar envolvidas no processo de replicação do DNA (Li et al., 2002), recombinação (Bit et al., 1999), expressão gênica (Liu et al., 2001), na diferenciação de cromossomos sexuais em peixes (Parise-Maltempi et al., 2007), ou seja, na organização estrutural e funcional do genoma em geral. Essas sequências repetidas podem também estar envolvidas em rearranjos cromossômicos, tais como deleções, duplicações, inversões e translocações recíprocas, sendo responsáveis por proporções significativas das variações cariotípicas observadas em muitos grupos (Kidwell, 2002).

A heterocromatina nas espécies de *Gymnotus* está localizada preferencialmente nas regiões próximo ao centrômero (Margarido et al., 2007, Millhomen et al., 2007). As espécies de *Gymnotus* aqui estudadas revelaram através do bandamento C heterocromatina localizada na região

pericentromérica (Figura 5a e b) da maioria dos cromossomos, uma característica muito conservada na família Gymnotidae.

Regiões ao redor dos centrômeros são associadas a uma rápida taxa evolutiva devido à supressão da recombinação e que inicia o acúmulo de sequências repetitivas (Charlesworth et al., 1994; Topp e Dave, 2006). A associação da heterocromatina com sequências repetitivas é crucial para a organização funcional de estruturas cromossômicas como os centrômeros. Resultados obtidos para *Oreochromis niloticus* através de GISH (*Genomic in situ hybridization*) indicam que a heterocromatina presente em região pericentromérica é espécie-específica (Targino et al., 2009), e que estas regiões são compostas de elementos de DNA repetitivo e elementos transponíveis (Oliveira e Wright, 1998, Oliveira et al., 1999; Grewal e Jia, 2007).

Os fragmentos de DNA repetitivo isolados de *G. sylvius* e *G. paraguensis* apresentaram localização pericentromérica, coincidente com a região heterocromática observada pelo bandamento C. Entretanto, quando as sequências isoladas de uma espécie foram utilizadas como sondas para hibridizar reciprocamente na outra, nenhuma marcação foi visualizada mostrando que estas possuem alto nível de especificidade, além disso, ficou evidenciado a natureza heterogênea das sequências que compõem a heterocromatina destas espécies. O sequenciamento revelou sequências exclusivas presente em cada espécie. Três sequências foram isoladas em *G. sylvius* e duas em *G. paraguensis*. Por outro lado a associação de sequências repetitivas a heterocromatina está presente em grupos eucariotos distantes como *Drosophila* (Pimpinelli et al., 1995) e plantas (Presting et al., 1998). Estes

dados suportam o papel estrutural proposto para estas sequências na evolução do genoma (Dimitri e Junakovic, 1999), diferentemente do que observamos para as sequências repetitivas isoladas para o genoma de *G. sylvius* e *G. paraguensis*. Neste caso, apesar de apresentarem uma distribuição ampla pelo cariótipo devido, muito provavelmente a evolução em concerto, estas sequências aparentemente não apresentem funcionalidade relacionada com sua composição.

A investigação das sequências que compõem a heterocromatina em Gymnotiformes ainda é recente. Henning et al., (2008), isolaram por microdissecção o cromossomo Y de *Eigenmannia virescens* que possui grande quantidade de heterocromatina. Em adição, realizaram o mapeamento físico dessas sequências em região centromérica e telomérica de cromossomos autossômicos de espécies próximas que não apresentam diferenciação cromossômica entre os sexos.

Somente mais duas espécies de Gymnotiformes possuem sequências repetitivas descritas. Claro (2008) isolou sequências repetitivas através de digestão enzimática com a enzima *AluI* e *HaeIII* em *G. sylvius* e *G. carapo*. Os fragmentos isolados com ~300pb apresentaram distribuição dispersa nas duas espécies, e localização semelhante dos fragmentos isolados com as duas enzimas. Em *G. carapo* ainda foi possível a identificação de um elemento transponível do tipo SINE em fragmentos isolados com *AluI* que ao serem submetidos a hibridização em *G. sylvius* apresentou marcação, mais em região diferente a apresentada em *G. carapo*. Todas essas sequências apresentaram marcações dispersas não coincidentes com bandas de heterocromatina

sugerindo que essas sequências sejam importantes na evolução e organização de regiões não codificantes do DNA (Buldyrev, 1995) o que torna o sinal de hibridização muito disperso.

As espécies analisadas no presente trabalho mostraram padrão espécie-específico das sequências repetitivas que estão presentes na região ao redor do centrômero. Embora a localização da heterocromatina seja extremamente conservada nestas espécies (Margarido et al., 2007, Milhomen et al., 2007), a composição desta região pode ser considerada um importante marcador evolutivo e para a citotaxonomia do grupo.

Referências

As referências citadas neste capítulo são apresentadas no final da dissertação no item **Referências Bibliográficas**.

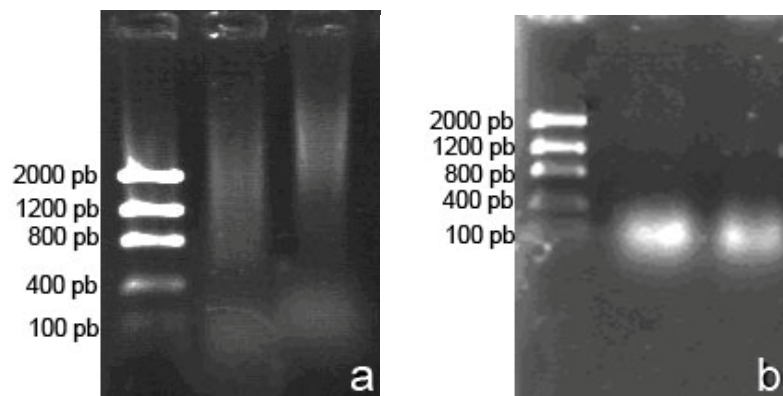


Figura 1: Gel de agarose 1% Sequências isoladas por *Cof* – 1. a) DNA após 1 min. na autoclave; b) DNA após tratamento com a enzima *S1* nuclease.

Sequências de *G. paraguensis* e *G. sylvius*

G. paraguensis clone 1 = 473 bp

GACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGG
CTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACACAGG
AAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCTAATACGACTCACTATAGGGAAAGCTTGCATGCCTG
CAGGTCGACTCTAGAGGATCTACTAGTCATATGGATTGGGGTTGGGGTCTGGGTCCATTGCATAATT
GGATCTAATTCTTTTTTGTGTTGTTGTCAGTCAGTCAAGTGTCAAGGGTCAGGGTGCACCTTATCAA
CTCAGTCCAAGAATTTGTAGGACACACCATCAGTAGTGTCCCTCAGAATCCTTGGCTAAAGGCCTGC
CAATATTAGTCCAAATGCTTTAGGGGTAGATCGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATCCTGCCTTTT
GGGG

G. paraguensis clone 2 = 206 bp

GGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCTAATACGACTCACTATAGGGAAAGCTTGCATGCC
TGCAGGTCGACTCTAGAGGATCTAATAGTCATATGGAT**ACACACACACACACACACACACACACACA**
CACACACACACACACACACACACACACACACTAATCGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATCCTG
CTTTG

G. sylvius clone 1 = 124 bp

TAACTTCCTGACCGATCTAGAGGACTACTAGTCATATGGATCTGGCTGTGCATCACTGGCTGTGCA
TCACTCCTTGTGTATCACTGGCTGTGTATCACTGGCTGTACCCCACTCCTTTGATC

G. sylvius clone 2 = 202 bp

TCATATGGATTTCTGCTGAAGCAGGACACGGCTGTTTCCTGCTGGCGTCCTGGCTTCCTGCACACT
GGACTGGTTCCCTCTATCTAATCAGTCACTGTACACTGGACAGGTTCCCTCTATCTAATCAGTCACT
GCAAACCTGGACTGGTTCCCTCTATCTATCGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATCCCTGCTTTTGGG
G

G. sylvius clone 3 = 123 bp

GAAAGGGCACCTCTGACTTGAGCGTGCATTTTTGTGATCCTCCAAAGGGCGGAGCCTATGGAAAAA
CACCAGCAAGGCGATCGGTCCCCGGGACCCGAAGCTTGGAATGCGGGGGGGTTGG

GcotP1	GACTGGAAG	CGGGCAGTGA	GCGCAACGCA	ATTAATGTGA	GTTAGCTCAC	TCATTAGGCA	CCCCAGGCTT
GcotP2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
GcotP1	TACACTTTAT	GCTTCCGGCT	CGTATGTTGT	GTGGAATTGT	GAGCGGATAA	CAATTTTACA	CAGGAAACAG
GcotP2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
GcotP1	CTATGACCAT	GATTACGCCA	AGCTCTAATA	CGACTCACTA	TAGGGAAAGC	TTGCATGCCT	GCAGGTGCGAC
GcotP2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
GcotP1	TCTAGAGGAT	CTACTAGTCA	TATGGATTGG	GGTTGGGGTC	TGGGTCCATT	GCATAATTGG	ATCTAATTCT
GcotP2	-----	...A.....	-----	-----	-----	-----	-----
GcotP1	TTTTTGTGTTG	TTTGCAGTCA	GTCAA-GTGT	CACAAGGGTC	AGGGTGCAC	TATCAACTCA	GTCCAAGAAT
GcotP2	-----		. TC.GA.	.C.CG..TA.	C.A.CT.GAA	.CCTGCT.TG	-----
GcotP1	TTGTAGGACA	CACCATCAGT	AGTGTCCCTC	AGAATCCTTG	GCTAAAGGCC	TGCCAATATT	AGTCCAAATG
GcotP2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
GcotP1	CTTTAGGGGT	AGATCGGATC	CCCGGGTACC	GAGCTCGAAT	CCTGCCTTTT	GGGG 474	-----
GcotP2	-----	-----	-----	-----	-----	---- 474	-----

Figura 2: Alinhamento das Sequências clonadas de *G.paraguensis*. Os pontos indicam as bases idênticas. Os traços indicam *indels*.

Gcots1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Gcots2	TCATATGGAT	TTCCTGCTGA	AGCAGGACAC	GGCTGTTTCC	TGCTGGCGTC	CTGGCTTCCT	GCACACTGGA
Gcots3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----GA
Gcots1	-----	TTAACTTCCT	GACCGATCTA	GAGGA-CTAC	TAGTCATATG	GATCTGGCTG	TGCATCACTG
Gcots2	CTGGTTCCCT	C..T..AATC	AGT.AC.G..	C.CTG--G..	AG..TCCC.C	T...AATCA	GT..CTG.AA
Gcots3	AAGGGCACCT	C.G....GAG	CGT....T.T	TGT..T.CT.	C.AAAGGGC.	..G.CTATG.	AAA.A...CA
Gcots1	GCTGTGC-AT	CACTCCTTGT	GTATCACTGG	CTGTGTATCA	CTGGCTGTAC	ACCCACTCCT	TTGATC 206
Gcots2	A...GA.TGG	TT.C.TC.A.	C....GGATC	.CCG.GTA.C	GA.CTC.A.T	C..TG..TT.	GG.G-- 206
Gcots3	..AAG..G..	.GG...CC.G	.ACC.GAA.C	T..GAATG.G	GG..GG..TG	G-----	----- 206

Figura 3: Alinhamento das sequências clonadas de *G.sylvius*. Os pontos indicam as bases idênticas. Os traços indicam *indels*.

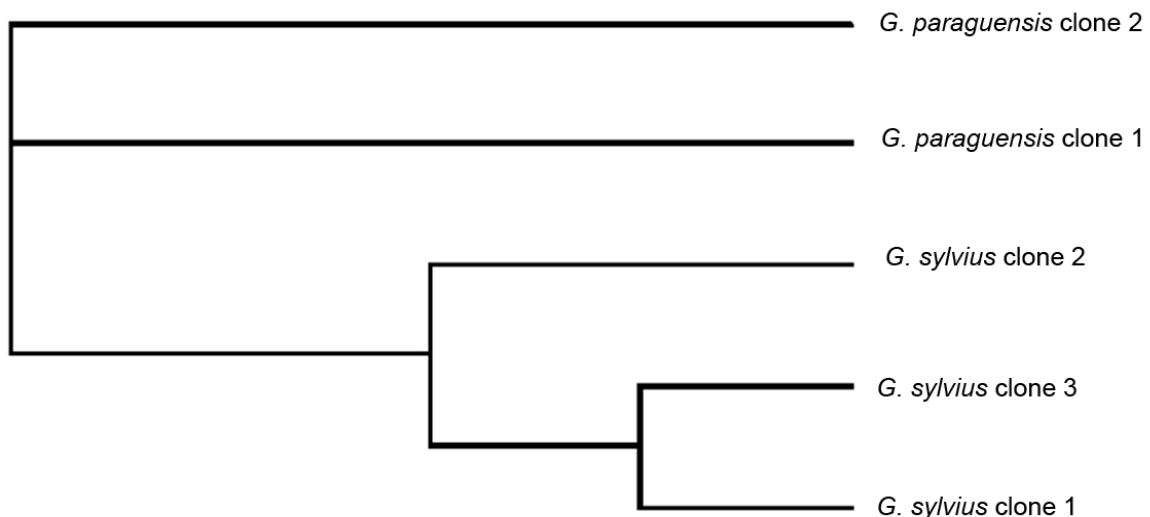


Figura 4: Dendrograma de agrupamento entre as sequências clonadas, pelo método de parcimônia.

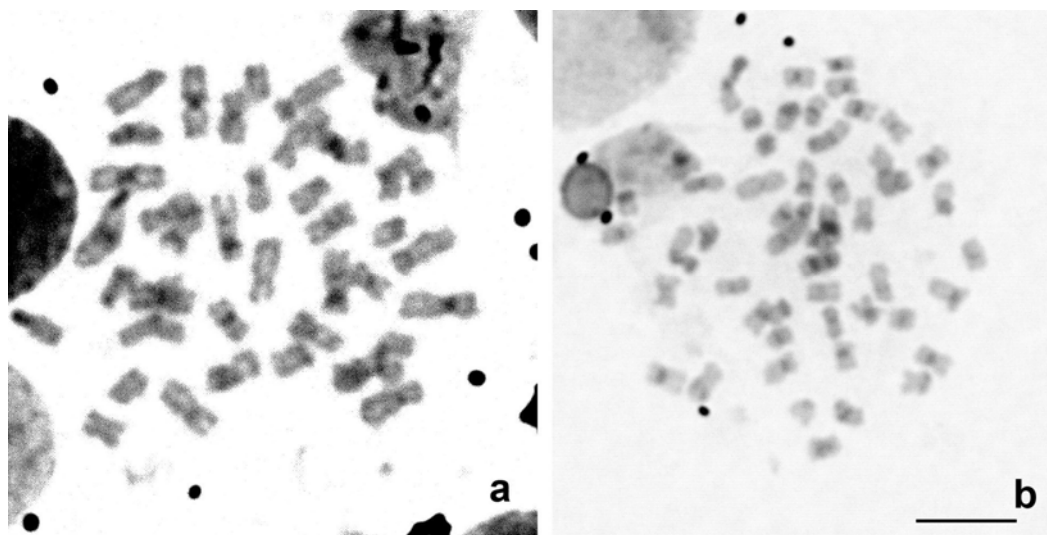


Figura 5: Bandamento C a) *G. sylvius*; b) *G. paraguensis*. Marcações em região pericentromérica. Barra 10 μ m.

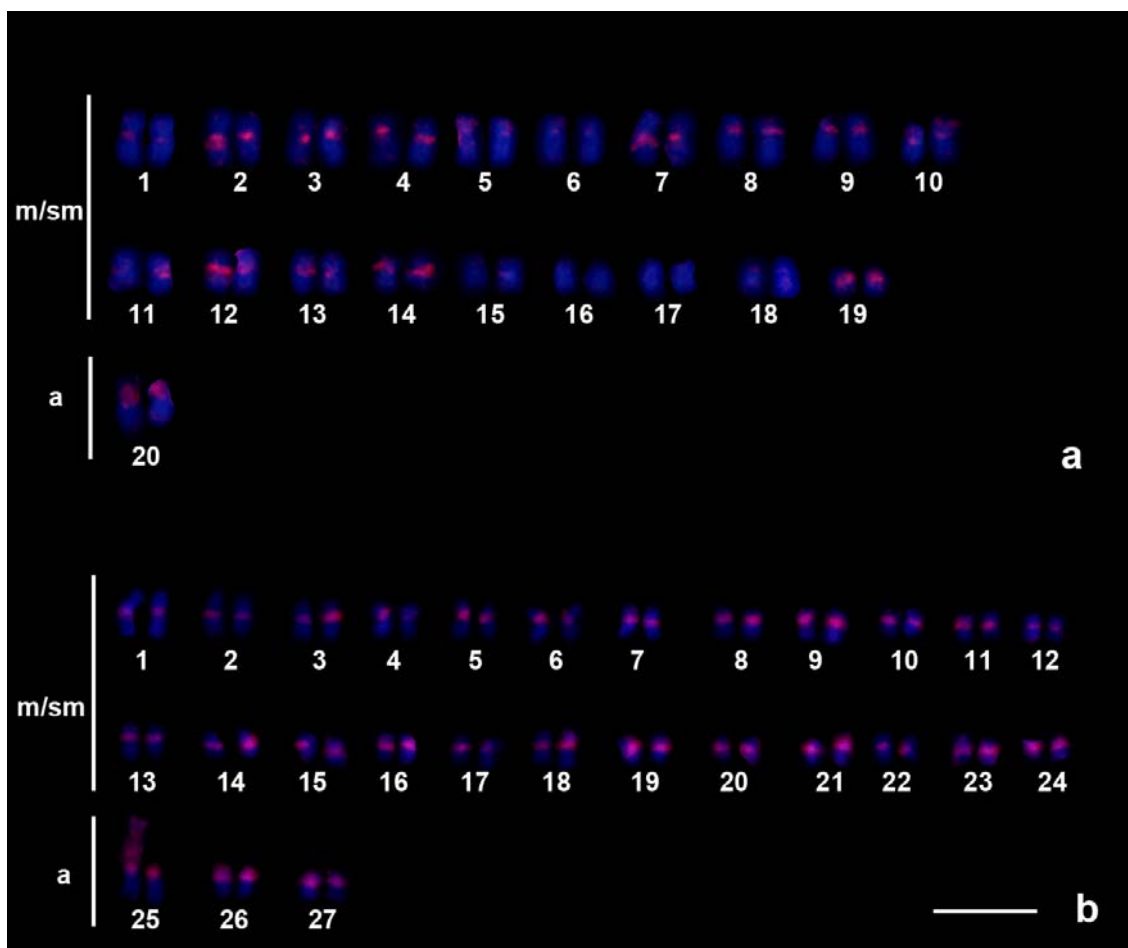


Figura 6 – Hibridização *in situ* com as sondas isoladas por C_0t-1 a) *G. sylvius*; b) *G. paraguensis*. Barra=10 μ m

Capítulo II

DNA repetitivo e comportamento meiótico dos cromossomos sexuais de *Gymnotus pantanal* (Gymnotiformes, Gymnotidae)

Capítulo II

DNA repetitivo e comportamento meiótico dos cromossomos sexuais de *Gymnotus pantanal* (Gymnotiformes, Gymnotidae)

Abstract

Neotropical fish present low rate of chromosomal differentiation between the sexes. *Gymnotus pantanal* has a multiple sexual determination system of the type $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$, with small heterochromatin, restrict only to centromeres. The meiotic behaviour of sexual chromosomes involved in this system form a trivalent totally paired at pachytene showing high level of homology. The cells of metaphase II present 19 and 20 chromosomes, normal disjunction of sex chromosomes and formation of balanced gametes with $18+X_1X_2$ and $18+Y$ chromosomes, respectively. The small amount of heterochromatin and repetitive DNA involved in this system, associate to high similarity of chromosomes, suggest a recent origin of $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ system in *G. pantanal*.

Key-words: Meiosis, Sex chromosomes, repetitive DNA

Resumo

Peixes neotropicais apresentam baixa frequência de espécies com diferenciação cromossômica entre os sexos. *Gymnotus pantanal* possui um sistema múltiplo de determinação sexual do tipo $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$, com pouca heterocromatina, restrita somente aos centrômeros. O comportamento meiótico dos cromossomos sexuais envolvidos nesse sistema implica na formação de

um trivalente no paquíteno pareado linearmente, com alto nível de homologia. A metáfase II apresenta 19 e 20 cromossomos, sugerindo a segregação típica dos cromossomos sexuais, formando gametas balanceados com $18+X_1X_2$ e $18+Y$ cromossomos, respectivamente. A pouca quantidade de heterocromatina e DNA repetitivo envolvidos nesse sistema de diferenciação cromossômica, associado à grande homologia apresentada pelo pareamento total dos cromossomos, sugerem uma origem recente para o sistema $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ verificado em *G. pantanal*.

Palavras-chave: Meiose, Cromossomos sexuais, DNA repetitivo.

Introdução

Em peixes neotropicais a heterogametia cromossômica entre os sexos aparece em taxas muito baixas (Almeida-Toledo et al., 2001), quando comparadas com grupos de vertebrados superiores como répteis, aves e mamíferos (Matsubara et al., 2006). A diferença na fórmula cariotípica pode ocorrer tanto nos machos quanto nas fêmeas, envolvendo somente um par cromossômico, caracterizando sistemas simples do tipo XX/XY ou ZZ/ZW , ou envolvendo mais de um par, formando sistemas múltiplos $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ ou $Z_1Z_1Z_2Z_2/Z_1Z_2W$, por exemplo (Almeida-Toledo et al., 2000).

O acúmulo de sequências de DNA repetitivo está intimamente relacionado à origem e diferenciação de cromossomos sexuais em peixes (Artori et al., 2001). A associação de sequências repetitivas favorece a redução da taxa de recombinação entre proto-cromossomos sexuais, sendo considerada um passo inicial na diferenciação dos cromossomos (Charlesworth et

al., 2000). Com o isolamento da recombinação entre os genes sexo-específico, as sequências ao redor destes genes podem ficar livres de restrições funcionais e divergirem livremente, dando origem a regiões heterocromáticas ou acumulando sequências repetitivas múltiplas incluindo elementos transponíveis (Steinemann e Steinemann, 1997; Charlesworth et al., 2000; Nanda et al., 2000). O aparecimento de cromossomos sexuais por rearranjos também é uma das possibilidades de diferenciação cromossômica entre os sexos, e a origem por esse tipo de ocorrência é considerada um evento recente (Charlesworth e Charlesworth, 2000).

O peixe neotropical *Gymnotus pantanal* (Fernandes et al., 2005), possui um sistema de cromossomos sexuais múltiplos do tipo $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$, com fêmeas portando 40 cromossomos e machos 39 cromossomos (citado como *Gymnotus* sp. por Silva e Margarido, 2005). Segundo estes autores, o neo-Y originou-se de uma translocação Robertsoniana entre dois autossomos acrocêntricos e seus homólogos passaram a ser denominados nomeados X_1 e X_2 . A diferenciação na fórmula cariotípica entre machos e fêmeas foi considerada uma apomorfia da espécie *G. pantanal* dentro de Gymnotidae, sendo até o momento a única espécie desta família a apresentar esse mecanismo (Silva e Margarido, 2005).

Mestriner e Bertollo (1998) estudaram o comportamento meiótico de um sistema de cromossomos sexuais múltiplos X_1X_2Y no peixe *Hoplias malabaricus*, semelhante ao encontrado em *G. pantanal*. Nos machos desta espécie, os cromossomos sexuais mostraram comportamento normal na meiose, com a formação de um trivalente no estágio de paquíteno da prófase I, apresentando apenas uma pequena região não homóloga. Os autores

sugeriram que esses cromossomos se encontravam em incipiente estágio de divergência e diferenciação evolutiva.

A análise meiótica tem sido uma ferramenta importante para checar a ocorrência de cromossomos sexuais em peixes. Mestriner et al., (1995) refutaram a presença de cromossomos sexuais XX/XY em *Leporinus lacustris* proposta por Galetti et al., (1981). Nenhum cromossomo apresentou comportamento diferenciado para qualquer fase da meiose, e a diferenciação cromossômica observada foi atribuída à presença de um polimorfismo de tamanho, no par 11 portador das regiões organizadoras de nucléolos, encontrado tanto em machos quanto em fêmeas.

Assim, o presente trabalho teve por objetivo analisar o comportamento meiótico dos cromossomos sexuais X_1X_2Y de machos da espécie *G. pantanal*, isolar sequências de DNA repetitivo e investigar a associação destas sequências aos cromossomos sexuais.

Material e Métodos

Foram estudados 25 espécimes (12 machos; 13 fêmeas) de *Gymnotus pantanal* provenientes da bacia hidrográfica do rio Piquiri, região de Formosa do Oeste, Paraná, Brasil. Os peixes foram anestesiados de acordo com Henyey et al. (2002). A identificação do sexo foi realizada por biópsia parcial das gônadas, examinadas *a fresco* em microscópio óptico com objetivas de 10x e 40x. Seguida a identificação, as gônadas foram retiradas, hipotonizadas e armazenadas em fixador metanol e ácido acético na proporção 3:1.

As preparações mitóticas foram obtidas a partir de células do rim anterior, empregando-se o tratamento “*in vivo*” com colchicina (Bertollo et al.,

1978), enquanto as preparações das células meióticas foram obtidas de acordo com o método de Kligerman e Bloom (1977). As regiões organizadoras de nucléolos (Ag-RONs) foram localizadas segundo o método de Howell e Black (1980). O DNA genômico foi extraído de acordo com o método fenol-clorofórmio (Sambrook e Russel, 2001), e também através do método utilizando tampão Brometo de Cetil Trimetil Amônio (CTAB) (Murray e Thompson, 1980). A heterocromatina foi analisada pelo bandamento C (Sumner, 1972) e por hibridização fluorescente *in situ* (FISH) com sonda de sequências repetitivas obtidas por *Cot-1* segundo Ferreira e Martins (2008). As sondas foram marcadas por reações de *nick translation* com digoxigenina 11-dUTP (Roche®). Para o reconhecimento do sinal foi utilizado anti digoxigenina-rodamina (Roche®). O procedimento de hibridização seguiu o protocolo descrito por Pinkel et al., (1986), sob condição de alta estringência (77%) (2,5 ng/μL de cada sonda, 50% de formamida deionizada, 10% sulfato de dextrano, 2X SSC a 37°C por 18 horas). Os cromossomos foram contracorados com DAPI em meio de montagem Vectashield (Vector®). As preparações foram analisadas em microscópio de epifluorescência Olympus BX41® acoplado a câmera CCD Olympus® DP-71. Para a captura das imagens foi utilizado o software DP controler® (Olympus). As sondas com sinais positivos de hibridização tiveram os produtos de PCR purificados e clonados com o Kit de clonagem RPN5110 no plasmídeo vetor pMOSBlue Blunt ended (Amersham Biociences®) para serem posteriormente sequenciadas. Sequenciamento das amostras foi realizado no laboratório ACTGene (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS) utilizando o sequenciador automático ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer armado com capilares de 50 cm e polímero POP6 (Applied

Biosystems®). Os DNAs-molde (30 a 45 ng) foram marcados utilizando-se 3,2 pmol do *primer* 5'-NNNNNNNNNNNN-3'E 2µL do reagente *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-110* (Applied Biosystems®). Os dados de sequenciamento foram coletados utilizando-se o programa *Data Collection v1.0.1*(Applied Biosystems®) com os parâmetros *Dye Set "Z"*; *Mobility File "DT3100POP6{BDv3}.mob"*; *BioLIMS "3100Project1" Run Module 1 "StdSeq50_50cm_cfv_100"*; e *Analysis Module "BC-3100SR_Seq_Fasta.saz"*. As sequências foram alinhadas e editadas pelo programa CLUSTAL W (Thompson et al., 1994) usando os seguintes parâmetros nos alinhamentos: 6.66 e 10.0 para abertura e extensão de *gaps*, respectivamente nos alinhamentos par-a-par e 10.0 e 15.0 para abertura e extensão de *gaps* nos alinhamentos múltiplos. Os cromossomos foram organizados em metacêntricos (m), submetacêntrico (sm), subtelocêntrico (st) e acrocêntrico (a), dependendo da sua razão de braços (Levan et al., 1964), e arranjados em tamanho decrescente nos cariótipos.

Resultados

Gymnotus pantanal apresentou 40 cromossomos (14m/sm, 26st/a) para fêmeas e 39 cromossomos para machos (15m/sm, 24 st/a), com NF = 54, caracterizando um sistema de cromossomos sexuais múltiplo do tipo $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ (figura 1). A heterocromatina foi localizada na região pericentromérica de todos os cromossomos do complemento (Figura 1a e d) enquanto as regiões organizadoras de nucléolos (RONS) foram localizadas na porção terminal do braço curto do par cromossômico acrocêntrico 16 (figura1). A análise meiótica de células das gônadas dos machos revelou a formação de

um trivalente formado por cromossomos completamente pareados no estágio de paquíteno (Figura 2c), evidenciando um sistema múltiplo do tipo $X_1 X_2 Y$. Neste sistema o Y se emparelha completamente com os 2 cromossomos X. Foram observados ainda cromossomos com configuração em anel e a presença de bivalentes representando 2 associações terminais, frequência de um a dois quiasmas nos bivalentes em diplóteno a diacinese (figura 2d). A metáfase II permitiu visualizar a formação de gametas balanceados apresentando 19 e 20 cromossomos respectivamente (figura 2f, 2e).

A técnica da cinética da reassociação do DNA - C_{ot} -1 permitiu isolar sequências repetitivas de tamanho entre 100 e 300pb do DNA de *G. pantanal* (Figura 3), e a posterior hibridização *in situ* pela FISH evidenciou a localização destas sequências somente na região pericentromérica de todos os cromossomos, inclusive dos sexuais, região que corresponde a blocos de heterocromatina (Figura 4). Três sequências isoladas por C_{ot} -1 foram sequenciadas. A primeira foi denominada *GPcot1* sequência apresentou 44 pares de bases (bp), com composição heterogênea. A segunda sequência denominada de *GPcot2* possui 177pb, e apresenta repetições microssatélites organizadas em ACCCA e GGTG. O terceiro fragmento também de tamanho pequeno chamado de *GPcot3* apresentou 80pb com sequência heterogênea, porém algumas repetições de dinucleotídeos GA e TA foram observadas. Nenhuma das sequências quando submetidas ao *blast* no banco de dado NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) apresentou similaridade.

Discussão

Apesar de *Gymnotus* ser o gênero mais especioso da ordem Gymnotiformes com 33 espécies descritas (Froese e Pauli, 2009), os estudos citogenéticos ainda são escassos com somente 10 espécies apresentando descrições cariotípicas (Margarido et al., 2007; Lacerda e Maistro, 2007). Adicionalmente existe a sugestão de alguns autores para a ocorrência de espécies crípticas, assim talvez este número se torne maior (Milhomem et al., 2008).

A presença de cromossomos sexuais dentro da ordem Gymnotiformes é marcante com três famílias apresentando descrições de espécies com cromossomos sexuais morfologicamente diferenciados: Sternopygidae (Almeida-Toledo et al., 1984), Hypopomidae (Almeida-Toledo et al., 2000b) e Gymnotidae (Silva e Margarido, 2005). Em Gymnotidae, *G. pantanal* é a única espécie estudada a apresentar diferenciação cromossômica entre os sexos, contudo estudos preliminares em espécies ainda não descritas sistematicamente (*Gymnotus* sp.) da região da Bahia e da Amazônia Oriental sugerem a ocorrência dos sistemas XX/XY₁Y₂ e ZZ/ZW, respectivamente (Almeida et al., 2008; Milhomen et al., 2008). Isto indica provável origem independente, a exemplo do que ocorre em espécies de *Eigenmannia* (Gymnotiformes) distribuídas em diferentes bacias hidrográficas sulamericanas (Almeida-Toledo et al., 2002, Henning e Almeida-Toledo, 2008).

A análise meiótica deve ser considerada fundamental para uma caracterização mais segura da presença de cromossomos sexuais e permite ainda inferir sobre o comportamento dos mesmos durante o período de divisão celular e formação dos gametas. E além disso, inferir sobre os processos de diferenciação desses cromossomos ao longo do tempo evolutivo dessas

espécies. Na maioria dos peixes a identificação de cromossomos sexuais diferenciados morfológicamente não é evidente na mitose, em pelo menos 98% dos peixes estudados citogeneticamente não existe meiose (Morreira-Filho, comunicação pessoal). Em *Oreochromis niloticus*, por exemplo, a análise do complexo sinaptonêmico permitiu identificar o par cromossômico 1 como par sexual caracterizando heterogametia masculina. Os cromossomos X e Y apresentam um comportamento diferenciado no paquíteno onde uma grande porção destes cromossomos não apresenta pareamento durante a prófase I. O mapeamento com sondas dos genes DMRT4 e *OniY227*, ambos relacionados à determinação sexual, verificou a presença nestes cromossomos, contudo sua localização não estava na região assináptica (Ocalewicz et al., 2009).

A descrição de sistemas sexuais baseada somente em cromossomos mitóticos tem ocasionado equívocos quanto a sua real existência, como o sistema XX/XY descrito para *Leporinus lacustris*, o qual não foi suportado quando submetido à análise de ultra-estrutura dos cromossomos meióticos pelo complexo sinaptonêmico (Mestriner et al., 1995).

Gymnotus pantanal apresenta um trivalente durante o paquíteno, formado pelos elementos X_1 , X_2 e Y, pareados completamente e mostrando alto grau de homologia entre os três cromossomos formadores (Figura 1b). Este comportamento na meiose é compatível com o sistema $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ proposto por Silva e Margarido (2005). Espermatócitos em metáfase II apresentaram 19 ou 20 cromossomos (Figura 2e e 2f), resultado esperado para machos com 39 cromossomos, formando gametas com $18+Y$ e $18+X_1X_2$ cromossomos, respectivamente. Um padrão semelhante foi descrito em *Hoplias malabaricus* por Bertollo e Mestriner (1998). A avaliação do complexo

sinaptonêmico nesta espécie mostrou regiões não pareadas no trivalente entre regiões do X_1 e X_2 , revelando sítios não homólogos, originados a partir de translocações e que deram origem ao sistema $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$. Em ambos os casos, a disjunção meiótica normal do trivalente gera a produção de gametas balanceados.

Mesmo apresentando poucos dados em relação ao comportamento de cromossomos meióticos, estudos recentes apresentam a interessantes configurações que os cromossomos deste grupo de vertebrados assumem na meiose. Gross et al. (2009), apresentaram a intrigante estratégia cromossômica em espécies do ciclídeo sulamericano *Symphysodon* (Acará-Disco) na meiose. Os autores identificaram a maior cadeia cromossômica observada até o momento em vertebrados. Esses peixes com relativo conservadorismo quanto a padrões de número e fórmula cariotípica na mitose, impressiona pela complexa configuração meiótica que segundo os autores resulta de uma série de translocações originadas a partir da hibridação entre espécies, com a presença de um a dois quiasmas nas fases de diplóteno e diacinese.

A presença de um a dois quiasmas parece se repetir nas poucas espécies analisadas de peixes neotropicais (Matoso, 2009; Gross et al., 2009). *G. pantanal* segue essa tendência apresentando um a dois quiasmas, com cromossomos em configuração de anel no diplóteno e diacinese.

Entre os vertebrados superiores, os cromossomos sexuais são altamente diferenciados, onde X ou Z são grandes cromossomos ricos em genes, enquanto Y ou W são relativamente pequenos e altamente heterocromáticos contendo poucos genes (Matsubara et al., 2006). A presença de grande quantidade de heterocromatina no cromossomo heteromórfico de

determinação sexual está associada à inativação de regiões intergênicas, incluindo sequências derivadas de elementos transponíveis, ao redor de genes sexos-específicos reduzindo a taxa de recombinação entre esses cromossomos (Charlesworth et al., 2005), o que não é a situação comum em peixes (Artoni et al., 2002). Contudo, sistemas de cromossomos sexuais de origem recente formados por fissões e fusões possuem pouca quantidade de heterocromatina, possivelmente uma adaptação que facilita a segregação dos gametas em sistemas múltiplos de cromossomos sexuais (Moreira-Filho et al., 1993; Charlesworth e. Charlesworth, 2000), como verificado em *G. pantanal*.

A heterocromatina presente nos cromossomos de *G. pantanal* está localizada estritamente nas regiões pericentroméricas, inclusive nos cromossomos sexuais. A utilização de sequências repetitivas obtidas por *Cot-1* corrobora o bandamento C, localizando sequências de DNA repetitivo apenas nestas regiões. O sequenciamento dos fragmentos isolados não apresentou identidade com outras sequências depositadas no NCBI, e não mostrou associação restrita aos cromossomos sexuais. Desta forma, estas sequências satélites localizadas nas proximidades do centrômero parecem estar mais envolvidas com a função estrutural, por se depositarem adjacente a essa região.

Sistemas múltiplos de origem recente ocorrem em duas outras famílias da ordem Gymnotiformes (Tabela1), os quais também estão relacionados à translocações Robertsonianas (Almeida-Toledo e Foresti, 2001). Entretanto, a origem destes sistemas não parece estar relacionada filogeneticamente, devendo representar recorrências evolutivas.

Este estudo caracteriza a primeira abordagem meiótica sobre cromossomos sexuais em Gymnotiformes. A evidência de sistemas múltiplos sugere a existência de um sistema ancestral simples com cromossomos não diferenciados morfológicamente, e ainda requer uma teoria para a origem e diferenciação cromossômica sexual na família Gymnotidae que ocupa um ramo basal em Gymnotiformes (Campos-da-Paz, 2003). Várias são as questões ainda em aberto para esse grupo de peixes neotropicais, especialmente no que se refere à origem, diferenciação e fisiologia dos cromossomos sexuais, contudo o isolamento entre as espécies é reforçado pelos cromossomos sexuais e juntamente com outros fatores ecológicos, permitem a coexistência de espécies em segmentos neste grupo de peixes neotropicais.

Referências

As referências citadas neste capítulo são apresentadas no final da dissertação no item **Referências Bibliográficas**.

Tabela 1. Sistemas de cromossomos sexuais descritos para a ordem Gymnotiformes. Destaque para os sistemas múltiplos.

Família	Espécie	2N	Sistema	Ref.
Gymnotidae	<i>G. pantanal</i>	F – 40	$X_1X_1X_2X_2$	1*
		M – 39	X_1X_2Y	
	<i>Gymnotus</i> sp. (Bahia – BR)	F – 36	XX	2*
		M – 37	$XY Y_1$	
	<i>Gymnotus</i> sp. (Amazônia Oriental - BR)	34	ZZ/ZW	3*

Sternopygidae	<i>Eigenmannia virescens</i>	38	XX/XY	4*
	<i>Eigenmannia</i> sp. 1	38	ZZ/ZW	5*
	<i>Eigenmannia</i> sp. 2	F – 32	X ₁ X ₁ X ₂ X ₂	6*
		M – 31	X ₁ X ₂ Y	
Hypopomidae	<i>Brachypopomus</i>	F – 42	X ₁ X ₁ X ₂ X ₂	7*
	<i>pinnicaudatus</i>	M – 41	X ₁ X ₂ Y	

***Referências:** (1) Silva e Margarido, 2005; (2) Almeida et al., 2008; (3) Milhomen et al., 2008; (4) Almeida-Toledo e Foresti, 1988; (5) Almeida-Toledo, 2000; (6) Almeida-Toledo et al., 2000; (7) Almeida-Toledo et al., 2000b.

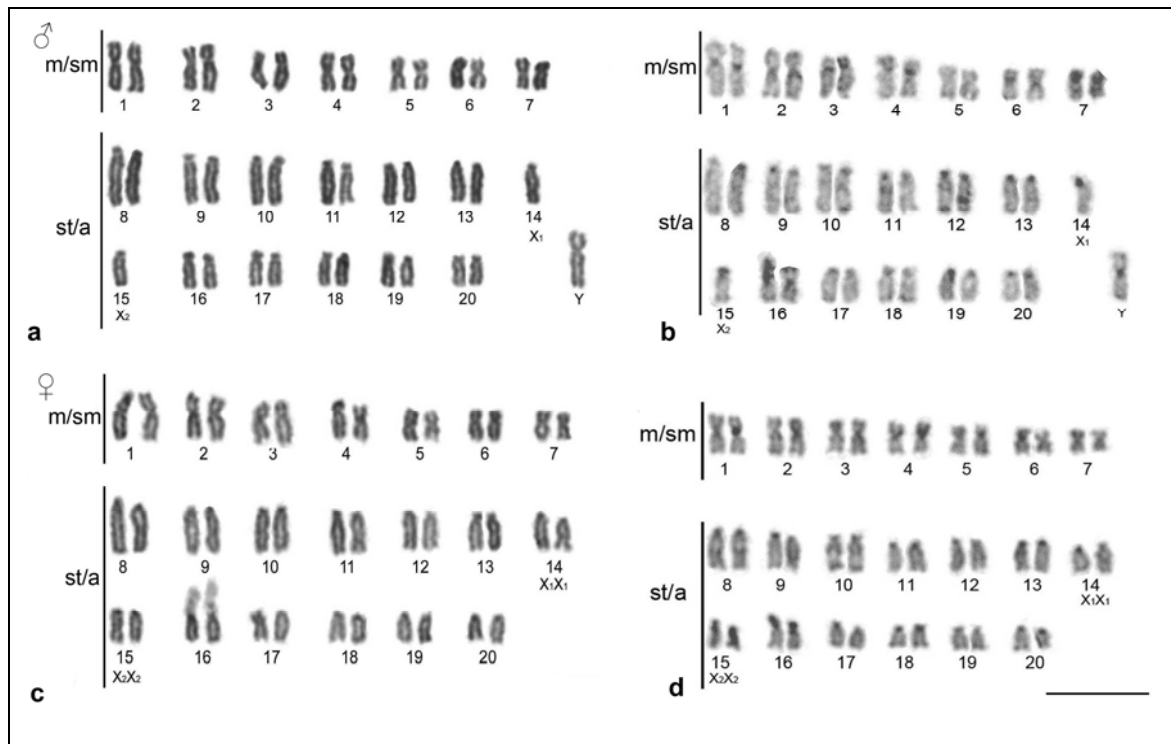


Figura 1: Cariótipo de *Gymnotus pantanal*: macho a) giemsa e b) banda C; fêmea c) giemsa e d) banda

C. Barra = 10 μ m.

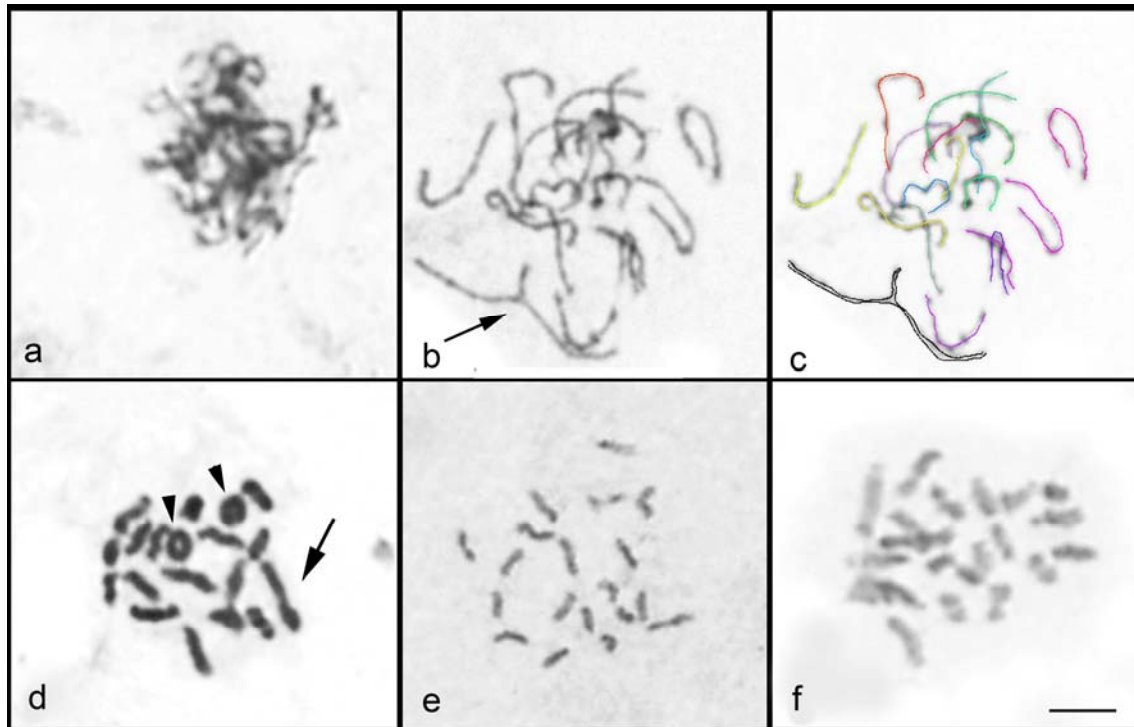


Figura 2: Prancha meiótica de macho da espécie *Gymnotus pantanal* a) Zigóteno; b) Paquíteno evidenciando a conformação do trivalente (seta) formado pelos cromossomos sexuais X_1X_2Y ; c) Desenho esquemático da sobre a figura anterior; d) Diplóteno com 18 bivalentes+ X_1X_2Y aponta as seta grande indica o trivalente, setas menores indicam a formação de dois quiasmas terminais; e, f) metáfase II mostrando a formação de gametas balanceados. Barra = 10 μ m.

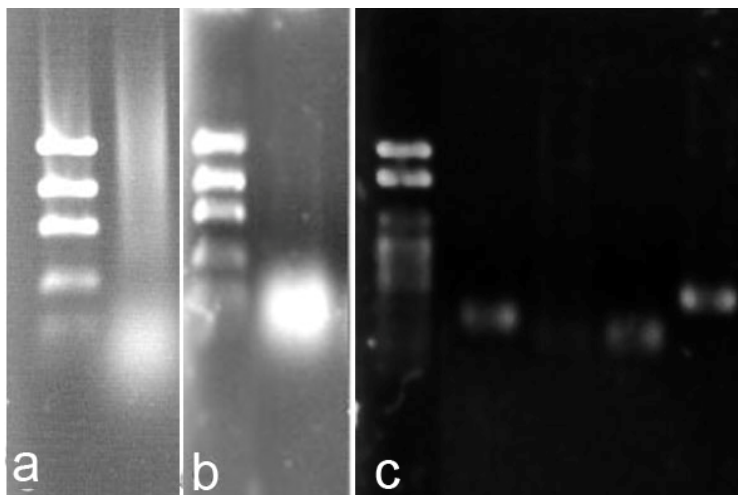


Figura 3: Gel de agarose 1% evidenciando amostras de: a) DNA total 5 minutos em autoclave; b) DNA tratado com a enzima *S1 nuclease* após autoclave; c) fragmentos de DNA isolados e clonados.

Sequências isoladas pela técnica de Cot-1 em *G. pantanal*

G. pantanal clone 1 44pb - GPcot1

CCTGATTCTGTGATCTCGATCGCGCAAGGGCGGGGGGGGGG

G. pantanal clone 2 177pb - GPcot2

GTAGTGTCTGCTTAGATTGCTGTTTCCTTACCCAGGTGTTCTGCTCAGATCGCTGTTTCCTTACCCAGGTG
TACTGCTTAGATCGCTGTTCTTTACCCAGGTGTTCTGCTTAGATCGCTGTTTCATTACAAAGGTGTTCTGC
TCAGATCTCTGTTTCCTTACCCAGGTGATCGGATCCC

G. pantanal clone 3 80pb - GPcot3

TTAACGCGGNCGATCTAGAGGACTACTAGTCATATGGATTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGCCCCC
TTTTAATTT

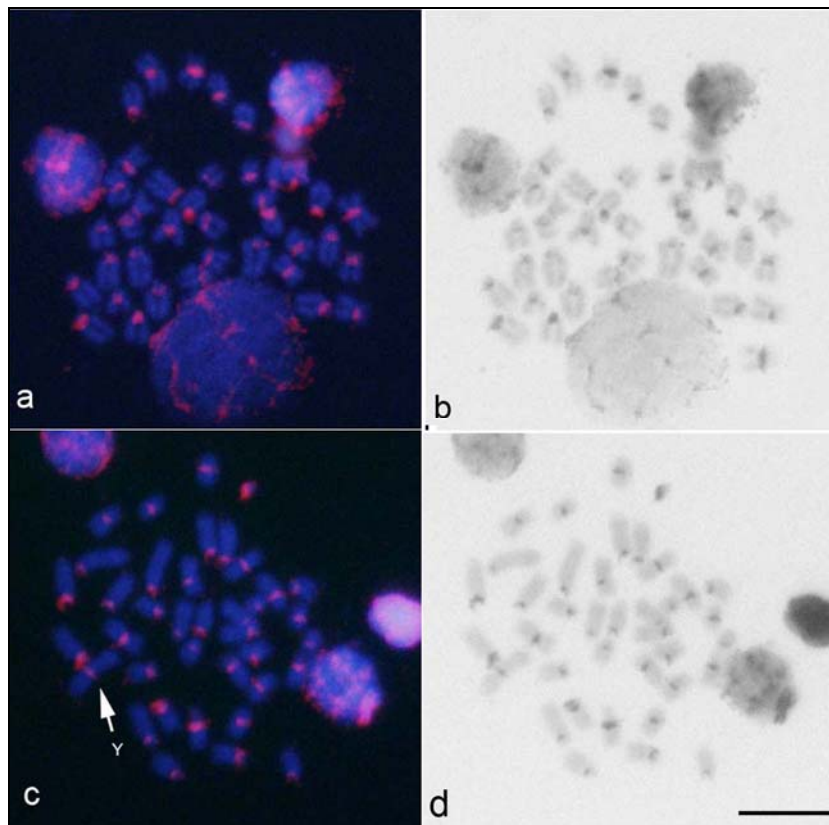


Figura 4: Sinais positivos de hibridização obtidos com a sonda isolada por C_0t-1 a) fêmea e b) foto em escala de cinza; c) no macho a seta indica o cromossomo Y e d) foto em escala de cinza. Todas as marcações em posição centromérica. Barra 10 μ m.

Capítulo III

Mapeamento físico do DNAr 5S em duas espécies de *Gymnotus* (GYMNOTYFORMES, GYMNOTIDAE): diversidade e dinâmica evolutiva

Capítulo III

Mapeamento físico do DNAr 5S em duas espécies de *Gymnotus* (GYMNOTYFORMES, GYMNOTIDAE): diversidade e dinâmica evolutiva

Abstract

The order Gymnotiformes comprehend the electrical fish, also called Knifefishes, and the genus *Gymnotus* is the most specious of order. Studies about the distribution of rDNA 5S sequences in the karyotype are few in the group and only two species have description of this ribosomal DNA. The rDNA 5S gene and its non-transcription sequence (NTS) are considered good genetic markers, because the gene evolved by concerted mechanism evolution and the NTS has fast evolution. Considering the few studies of rDNA 5S gene location at *Gymnotus* was possible identify here a great diversity of distribution of these sequences in the chromosomes of four species mapped. Each species analyzed in this study presented a standard own of distribution of rDNA 5S sequences. *G. pantanal* has two pairs signalized white minor rDNA, while *G. paraguensis* showed 19 pairs marked. On the basis of these results we suggest rDNA 5S sequences location as a cytogenetic marker of high potential for identification of *Gymnotus* species.

Key-words: FISH, ribosomal genes, cytotaxonomy.

Resumo

A ordem Gymnotiformes compreende os peixes elétricos, conhecidos como *Knifefishes*. O gênero *Gymnotus* é o mais especioso dentro da ordem. Estudos quanto a distribuição de DNAr 5S no cariótipo são escassos neste grupo de peixes com apenas duas espécies descritas sobre este aspecto. O DNAr 5S em conjunto com seu espaçador não transcrito (NTS) é sugerido como um bom marcador genético por evoluir em concerto e seu NTS apresentar evolução muito rápida. Considerando os poucos estudos sobre a localização do DNAr 5S em *Gymnotus*, foi possível identificar aqui uma grande diversidade de distribuição destas sequências sobre os cromossomos de quatro espécies mapeadas. Cada espécie possui um padrão próprio de distribuição. Aqui foram isolados e mapeados o DNAr 5S em duas espécies de *Gymnotus*. *G. pantanal* possui 2 pares com sítios de DNAr menor, enquanto *G. paraguensis* possui 19 pares com localização deste gene ribossômico. Com base nestes resultados sugerimos a localização cromossômica do DNAr 5S como um importante marcador citogenético para identificação de espécies do gênero *Gymnotus*.

Palavras-chave: FISH, genes ribossomais, citotaxonomia.

Introdução

A família Gymnotidae compreende os *Knifefishes* e apresenta apenas dois gêneros *Gymnotus* Linnaeus, 1758 e *Eletrophurus* Gill, 1864 (Campos-Da-Paz, 2003). Estes peixes possuem distribuição endêmica na região Neotropical, e encanta pesquisadores pela sua capacidade de autogerar campos elétricos

através de órgãos de descarga elétrica, que são utilizados para defesa, eletrolocalização e para interação social (Albert et al., 2003).

O gênero *Gymnotus* é o que apresenta maior número de estudos citogenéticos dentre os Gymnotiformes, das 33 espécies que compõem o grupo dez apresentam descrição de cariótipo, identificação das regiões organizadoras de núcleos (Ag-RONs) e localização da heterocromatina (Margarido et al., 2007; Lacerda e Maistro, 2007). Contudo, os estudos de mapeamento de genes ribossômicos são escassos, somente *Gymnotus sylvius* e *Gymnotus carapo* possuem descrição da localização do DNAr 5S e 18S (Claro, 2008).

Em eucariotos arranjos em *tandem* dos genes de RNA ribossômicos estão organizados em duas famílias multigênicas distintas, compostas por centenas de milhares de cópias. Uma família é representada pelo DNAr 45S que codifica os RNAr 18S, 5,8S e 28S, a qual é comumente localizada indiretamente por nitrato de Prata, que se liga as proteínas envolvidas na transcrição do DNA. A outra família é representada pelo DNAr 5S que codifica o RNAr 5S, um dos componentes da subunidade maior do ribossomo. O arranjo do DNAr 5S consiste em sequências codificantes de 120 pb que são separadas umas das outras por um DNA espaçador não transcrito (NTS). Este DNAr não é marcado pela Prata, sendo necessário a utilização de sondas específicas para a sua localização cromossômica através da hibridização *in situ* (Galetti, Jr. e Martins, 2006).

O NTS presente neste gene tem tamanho variável, cuja variação esta relacionada com a ocorrência de inserções, deleções ou a presença de pseudogenes (Wasko et al., 2001). Esta região quando comparada com a

região transcrita, possui uma evolução muito rápida, apresentando grande valor para estudos taxonômicos de espécies próximas (Baum e Johnson, 2007).

A família de DNAr 5S é um ótimo exemplo de evolução em concerto, na qual todas as unidades evoluíram como unidade levando a um alto nível de identidade entre todas as cópias (Nei e Rooney, 2005). Assim, o estudo deste DNAr é interessante para a compreensão da evolução destas famílias multigênicas e um bom candidato a marcador citogenético entre espécies e populações (Martins e Galetti, Jr., 2001).

O presente trabalho teve o objetivo de isolar, sequenciar e mapear o DNAr 5S das espécies *G. pantanal* e *G. paraguensis*, pertencentes a família Gymnotidae e assim contribuir para o entendimento da dinâmica evolutiva desta família multigênica e do seu espaçador não transcrito no gênero *Gymnotus*.

Material e Métodos

Os espécimes de *G. pantanal* (8 fêmeas e 7 machos) e *G. paraguensis* (4 fêmeas e 8 machos) foram coletados no rio Piquiri, região de Formosa do Oeste – Paraná – Brasil. Os cromossomos mitóticos foram obtidos através do método adaptado por Bertollo et al., 1978. O DNA genômico foi extraído de acordo com o método fenol-clorofórmio (Sambrook e Russel, 2001), e também através do método utilizando tampão Brometo de Cetil Trimetil Amônio (CTAB) (Murray e Thompson, 1980). As sondas de DNAr 5S foram obtidas através da *polimerase chain reaction* (PCR) utilizando os *primers* 5'-TACGCCCGATCTCGTCCGATC-3' e 5'-CAGGCTGGTATGGCCGTAAGC-3'

isolados da truta arco-íris (Komiya and Takemura 1979; Martins e Galetti Jr., 1999). As sondas foram marcadas com biotina 14-dATP por *nick translation*, seguindo as instruções do fabricante (Bionick Labelling System – Roche®). O procedimento geral de hibridização seguiu o protocolo descrito por Pinkel et al. (1986) sob as condições de estringência de 77%. A análise foi realizada em microscópio de epifluorescência Olympus BX41®. As imagens cromossômicas foram capturadas com a utilização de câmara CCD Olympus® DP71 e o software de captura de Imagens DP controler (Olympus®). O seqüenciamento das amostras foi realizado no laboratório ACTGene (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS) utilizando o sequenciador automático ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer armado com capilares de 50 cm e polímero POP6 (Applied Biosystems®). Os DNAs-molde (30 a 45 ng) foram marcados utilizando-se 3,2 pmol do *primer* 5'-NNNNNNNNNNNN-3'E 2µL do reagente *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-110* (Applied Biosystems®). Os dados de seqüenciamento foram coletados utilizando-se o programa *Data Collection v1.0.1* (Applied Biosystems®) com os parâmetros *Dye Set* "Z"; *Mobility File* "DT3100POP6{BDv3}.mob"; *BioLIMS* "3100Project1" *Run Module 1* "StdSeq50_50cm_cfv_100"; e *Analysis Module* "BC-3100SR_Seq_Fasta.saz". As seqüências foram alinhadas e editadas pelo programa CLUSTAL W (Thompson et al., 1994) usando os seguintes parâmetros nos alinhamentos: 6.66 e 10.0 para abertura e extensão de *gaps*, respectivamente nos alinhamentos par-a-par e 10.0 e 15.0 para abertura e extensão de *gaps* nos alinhamentos múltiplos.

Resultados

Os resultados obtidos através do mapeamento físico do DNAr 5S nas duas espécies de *Gymnotus*, *G. pantanal* e *G. paraguensis*, apresentaram características de distribuição cariotípica e localização cromossômica próprias. O isolamento de DNAr 5S através de *primers* específicos permitiu a visualização de duas bandas com aproximadamente 200pb e 600pb em gel de agarose (Figura 1). O mapeamento físico deste DNA ribossômico em *G. pantanal* revelou a presença de dois sítios localizados na região pericentromérica do par metacêntrico 5, e no braço curto do par metacêntrico grande número 3 não apresentando qualquer relação com o sistema de cromossomos sexuais $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ presente nesta espécie (Figura 3a). O seqüenciamento das regiões de 5S nesta espécie revelou sequência com 600pb incluindo o seu espaçador não transcrito, o BLAST Gene Bank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) mostrou 97% de identidade com sequências de 5S de *Leporinus friderici*, além de outras espécies deste mesmo gênero com igual identidade.

A outra espécie estudada, *G. paraguensis*, apresentou apenas uma banda com aproximadamente 600pb em gel de agarose (Figura 1b). O mapeamento cromossômico destas sequências revelou marcação em 19 pares cromossômicos, distribuídas em região pericentromérica (Figura 3b). O seqüenciamento destas regiões mostrou a presença do gene 5s com aproximadamente 100 a 110 pb, e seu NTS com 400 pb. Quando submetidos ao BLAST no Gene Bank, além de mostrar identidade com a região 5s de *Leporinus friderici*, *Geophagus brasilienses*, o seu NTS apresentou grande

identidade com um elemento móvel Tc1-like descrito no peixe Cypriniforme *Labeo rohita* 90% de identidade no blast como pode ser observado no alinhamento (Figura 2).

O alinhamento das sequências de *G. pantanal* e *G. paraguensis* mostrou grande identidade na região do gene 5S, salvo por algumas poucas bases. Entretanto a região do NTS se mostrou extremamente divergente entre as espécies, com apenas algumas bases alinhando. Já o alinhamento do NTS de *G. paraguensis* mostrou semelhança com a sequência parcial do transposon Tc1-like isolado do *L. rohita* apresentou alinhamento quase total a partir da base 403 até 745 (Figura 2).

Discussão

Os genes de DNAr 5S tem sido amplamente mapeados em muitas espécies de peixes. Casos interessantes de duplicação gênica dessa sequência, pseudogenes (Martins et al., 2006), co-localização com 45S (Diniz et al., 2008) e associação com elementos transponíveis tem sido descritas (Claro, 2008).

A localização do DNAr 5S é conhecida em apenas 4 espécies do gênero *Gymnotus*: *G. sylvius*, *G. carapo* (Claro, 2008), *G. pantanal* e *G. paraguensis* (presente trabalho). A localização desta família gênica nestas espécies tem sido muito particular em relação a distribuição no cariótipo e localização cromossômica, favorecendo inferências citotaxonômicas e evolutivas. *G. sylvius* evidencia uma única marcação com DNAr 5S no braço longo de um par de cromossomos metacêntricos em região próxima ao centrômero, enquanto

G. carapo apresenta um padrão mais diversificado com sete pares de cromossomos portadores destes sítios ribossomais com marcações também pericentroméricas no braço longo dos cromossomos (Claro, 2008).

As espécies estudadas no presente trabalho também se mostraram divergentes em relação ao padrão de distribuição e localização do DNAr 5S. A espécie *G. pantanal* apresentou dois pares com sítios de DNAr 5S, uma marcação no braço longo de um par de cromossomos metacêntricos medianos, e a outra em região intersticial do braço curto de um par de cromossomos metacêntricos grandes. Sítios de DNAr 5S estão frequentemente localizados em posição intersticial em várias espécies de peixes e outros vertebrados (Martins e Galetti, Jr., 2001). A localização cromossomal de DNAr 5S já foi realizada em mais de 70 espécies de peixes de diversos grupos como: Acipenseriformes, Anguiliformes, Cypriniformes, Characiformes, Perciformes e Tetraodontiformes, e que tem mostrado um padrão de distribuição conservado (Martins e Wasko, 2004).

Entre os Characiformes neotropicais se destacam os gêneros *Leporinus* e *Schizodon* com várias espécies estudadas em relação ao mapeamento de genes do DNAr menor (Martins e Galetti, Jr., 1999, 2000, 2001).

A investigação de DNAr 5S na ordem Gymnotiformes é recente. No entanto, as poucas espécies estudadas apresentam um padrão muito diversificado. Verificamos que a espécie *G. paraguensis* apresenta 19 pares cromossômicos marcados com sonda de DNAr 5S próximas aos centrômeros, resultado inédito para a ordem. O seqüenciamento destes genes em *G. carapo* revelou a presença de um elemento transponível do tipo SINE (*short*

interspersed nucleotide elements) associado às sequências de DNAr 5S (Claro, 2008), que poderia estar presente também em *G. paraguensis* proporcionando sua grande dispersão pelo cariótipo. Contudo, o seqüenciamento revelou a presença de um outro elemento móvel associado ao gene ribossômico 5S, um transposon da família Tc1-like, inserido no seu espaçador não transcrito com aproximadamente 288pb (Figura 3) descrito para o peixe Cypriniformes *Labeo rohita*. O elemento transponível Tc1-like foi identificados vários outros vertebrados, incluindo muitas espécies de peixes como medaka (*Oryzias latipes*), truta arco-iris (*Oncorhynchus mykiss*) e Zebrafish (*Danio rerio*) (Krasnov et al., 2005).

O complexo de espécies proposto para o peixe *Hoplias malabaricus* foi extensamente estudado em relação ao cariótipo. Cinco cariomorfos distintos são propostos com base na fórmula cariotípica, número cromossômico e cromossomos sexuais bem definidos entre as populações (Bertollo et al., 2000). O isolamento de um DNA repetitivo 5S *Hind*III, que evolui apartir do DNAr 5S apresenta marcações específicas em cada um dos cariomorfos, e ainda possibilita separar dois grupos distintos entre as cinco formas encontradas (Cioffi et al., 2009). Este DNA repetitivo tem sido proposto ainda apresentar função estrutural relacionada ao centrômero e envolvimento na diferenciação de cromossomos sexuais múltiplos no gênero *Hoplias* (Ferreira et al., 2007; Cioffi et al., 2009). Ao contrário do que ocorre nesta espécie, *G. pantanal* não apresentou qualquer relação de sequências 5S com o sistema de cromossomos sexuais $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ que possui.

Dada a posição basal da família Gymnotidae na ordem Gymnotiformes (Alves-Gomes et al., 1995; Albert, 2001), a ampliação de dados de caracterização e localização de sequências do DNAr 5S podem ser de grande interesse para a sistemática e para a própria história evolutiva e diversificação desta classe de DNA. Os dados aqui levantados reforçam o potencial de análise evolutiva baseado em marcadores de DNAr 5S, principalmente nas espécies de *Gymnotus*.

Referências

As referências citadas neste capítulo são apresentadas no final da dissertação no item **Referências Bibliográficas**.

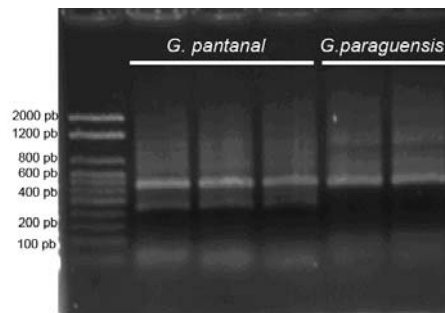


Figura 1: Gel de agarose 1% evidenciando o produto de amplificação do gene ribossomal 5S. Coluna 1 marcador de massa molecular. Coluna 2 a 5 DNA 5S *G. pantanal*. Coluna 6 e 7 DNA 5S *G. paraguensis*.

	5	15	25	35	45	55	65	75	85	95
<i>G. parag.5S</i>	TCCTCGGCTG	GGATCGTTTA	GAGCCCTCTG	AATCTGCATT	TAAACTACAT	GTGGAAGTT	CAAAATCGGG	GCACCAATAA	AGICTAGTAT	ATGGAGAAAA
Tc1-like	TCCTCGGCTG	GGATCGTTTA	GAGCCCTCTG	AATCTGCATT	TAAACTACAT	GTGGAAGTT	CAAAATCGGG	GCACCAATAA	AGICTAGTAT	ATGGAGAAAA
	105	115	125	135	145	155	165	175	185	195
<i>G. parag.5S</i>	ATCCTGAAAT	GCTTTCCTCA	AAAACCAAA	AACCTATGGG	ACCTGAAGGA	TTTTTTTGAA	GAACACGGG	CAGTTTAACT	GTTCAGGACA	AACAAGGGAC
Tc1-like	ATCCTGAAAT	GCTTTCCTCA	AAAACCAAA	AACCTATGGG	ACCTGAAGGA	TTTTTTTGAA	GAACACGGG	CAGTTTAACT	GTTCAGGACA	AACAAGGGAC
	205	215	225	235	245	255	265	275	285	295
<i>G. parag.5S</i>	ACACCAATTC	CTTGAATGT	TACCTCCAGT	ATTTCTGATA	TCCTCCTCAT	CTGAACATATC	GAA-GCTCTC	GTTCCTGTTA	TTTATCTTTT	CACATGATT
Tc1-like	ACACCAATTC	CTTGAATGT	TACCTCCAGT	ATTTCTGATA	TCCTCCTCAT	CTGAACATATC	GAA-GCTCTC	GTTCCTGTTA	TTTATCTTTT	CACATGATT
	305	315	325	335	345	355	365	375	385	395
<i>G. parag.5S</i>	TTTCG--TTGC	CCCTGCGGCG	TTTAAATTA	CTTAATATC	TTTTCCTTCC	ATTAAGAGCA	GAATTTTCT	CACTT--TC	AAITGTCTT	GCCT--TCC
Tc1-like	TTTCG--TTGC	CCCTGCGGCG	TTTAAATTA	CTTAATATC	TTTTCCTTCC	ATTAAGAGCA	GAATTTTCT	CACTT--TC	AAITGTCTT	GCCT--TCC
	405	415	425	435	445	455	465	475	485	495
<i>G. parag.5S</i>	CCTTGACAG	GCTTCATGAC	TTCATCATCA	ATCTCATCG-	CTCCTAACAT	CTTTTGAAT	CGGATCCCGG	GGTACCGAGC	TCGAATTCAC	TGGCCCTCGT
Tc1-like	CCTTGACAG	GCTTCATGAC	TTCATCATCA	ATCTCATCG-	CTCCTAACAT	CTTTTGAAT	CGGATCCCGG	GGTACCGAGC	TCGAATTCAC	TGGCCCTCGT
	505	515	525	535	545	555	565	575	585	595
<i>G. parag.5S</i>	TTTACAACGT	CGTGACTGGG	AAAACCCCTGG	CGTATCCCAA	CTTAATCGCC	TTGCAGCACA	TCCCCCTTTC	GCCAGCTGGC	GTAATAGCGA	AGAGGCCCGC
Tc1-like	TTTACAACGT	CGTGACTGGG	AAAACCCCTGG	CGTATCCCAA	CTTAATCGCC	TTGCAGCACA	TCCCCCTTTC	GCCAGCTGGC	GTAATAGCGA	AGAGGCCCGC
	605	615	625	635	645	655	665	675	685	695
<i>G. parag.5S</i>	ACCGATCGCC	CTTCCCAACA	GTTCGCGAGC	CTGAATGGCG	AATGGAAATT	GTAAGCGTTA	ATATTTTGT	AAAATTCGCG	TTAAATTTT	GTAAATCAG
Tc1-like	ACCGATCGCC	CTTCCCAACA	GTTCGCGAGC	CTGAATGGCG	AATGGAAATT	GTAAGCGTTA	ATATTTTGT	AAAATTCGCG	TTAAATTTT	GTAAATCAG
	705	715	725	735	745	755	765	775	785	795
<i>G. parag.5S</i>	CTCATTTTTT	AACCAATAGG	CC-GAAATCG	GCAAAATCCC	TT-ATAAATC	A--				
Tc1-like	CTCATTTTTT	AACCAATAGG	CC-GAAATCG	GCAAAATCCC	TT-ATAAATC	A--				
	805	815	825	835	845	855	865	875	885	895
<i>G. parag.5S</i>	TTGGGAACAA	GAANGCCNCC	TATTTAAAGA	ATCGNNTGGA	CTCCAACNT	NTCAANNNGG	GCCGGTAAAA	AAAACCCCGG	TATTCATAG	GGNCGANTGG
Tc1-like	TTGGGAACAA	GAANGCCNCC	TATTTAAAGA	ATCGNNTGGA	CTCCAACNT	NTCAANNNGG	GCCGGTAAAA	AAAACCCCGG	TATTCATAG	GGNCGANTGG
	905	915	925	935	945	955	965	975	985	995
<i>G. parag.5S</i>	GGCCCTCTTA	CCGTGGAACC	CATTTACCCC	TAATCAACG	GCTTCTTTTG	GCGGGCCTCG	TCTTCGGTCT	GCCNCTCGAT	CGCNTTCTAT	TCGGGTACCC
Tc1-like	GGCCCTCTTA	CCGTGGAACC	CATTTACCCC	TAATCAACG	GCTTCTTTTG	GCGGGCCTCG	TCTTCGGTCT	GCCNCTCGAT	CGCNTTCTAT	TCGGGTACCC

Figura 2: Alinhamento do DNA 5S de *G. paraguensis* e o transposon Tc1-like de *Labeo rohita*. A reta preta indica o DNA 5S, e a vermelha indica o início do alinhamento entre as sequências do NTS e Tc1-like.

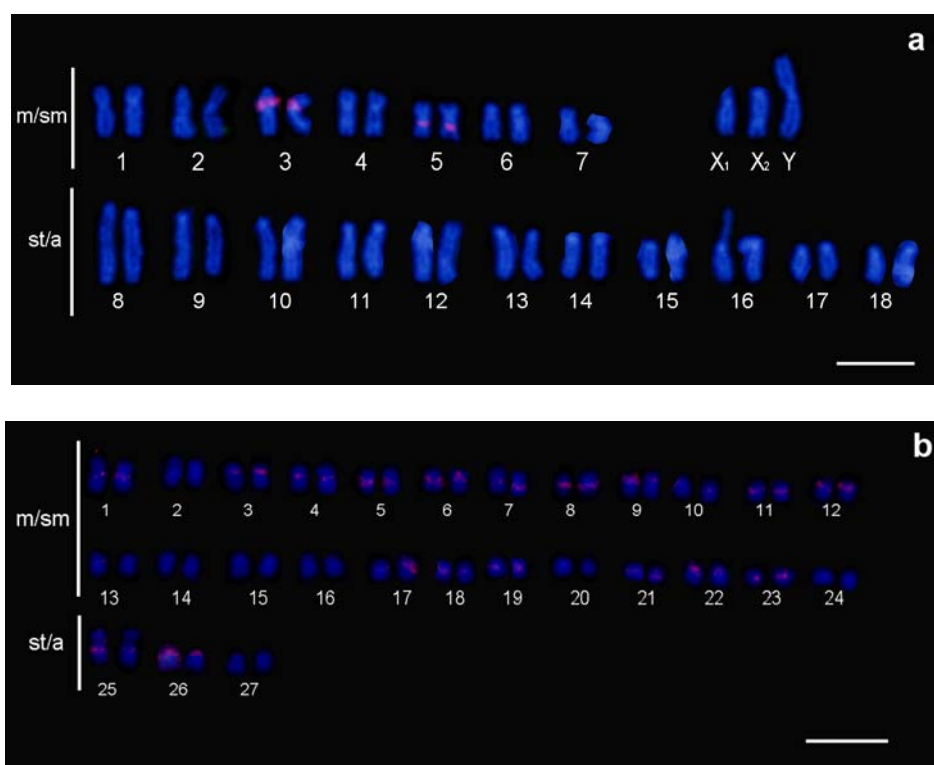


Figura 3: Mapeamento de DNAr 5S; a) *Gymnotus pantanal*; b) *G. paraguensis*.

Conclusões

No presente trabalho três espécies de *Gymnotus*: *G. pantanal*, *G. paraguensis* e *G. sylvius* foram analisados com ferramentas da citogenética clássica e molecular.

O isolamento de sequências repetitivas através da técnica de $C_{ot} - 1$ permitiu isolar e clonar as sequências que compõem as regiões heterocromáticas das três espécies estudadas, que sendo submetidas a FISH mostraram-se localizadas ao redor dos centrômeros, coincidindo com a heterocromatina identificada com o bandamento C. Essas sequências foram identificadas como espécie-específica, apresentando marcação somente nos cromossomos da espécie a qual foram isoladas.

Análise meiótica em *G. pantanal* revelou a formação de um trivalente pareado completamente no paquíteno, mostrando alto nível de homologia. Esta homologia completa poderia caracterizar um sistema recente formado pela fusão de elementos cromossômicos de pares autossômicos formando o Y (neo-Y) e os respectivos homólogos autossômicos passariam a se comportar como X_1 e X_2 . A metáfase II sugere a formação de gametas balanceados. A utilização de sequências isoladas por $C_{ot} - 1$ permitiu identificar sequências de DNA repetitivo somente na heterocromatina em região pericentromérica dos cromossomos de determinação sexual.

O mapeamento de DNAr 5S em *G. pantanal* e *G. paraguensis* revelou um padrão de dispersão peculiar em cada espécie. A primeira espécie apresentou dois pares marcadas. *G. paraguensis* apresentou 19 pares cromossômicos

marcados em região próxima aos centrômeros, e a presença de um trasposon intercalado em seu NTS. Mapeamento desta família ainda é atual no gênero *Gymnotus*. Contudo as espécies estudadas apresentam padrão muito diverso, sendo difícil a elaboração de uma teoria para dispersão desses genes no gênero.

A constituição cariotípica, presença de cromossomos sexuais e composição genômica são bastante diversa no gênero *Gymnotus*, o qual se faz um grupo interessante para aprofundamento em estudos evolutivos.

Referências Bibliográficas

- Albert, J. S. e Miller, R. R. (1995) *Gymnotus maculosus*: a new species of electric fish from Middle America (Teleostei: Gymnotoidei), with a key to the species of *Gymnotus*. *Proceedings Biological Society Washington* 108: 662-678.
- Albert, J. S. e Campos-da-Paz, R. (1998) Phylogenetic systematics of America knifefishes: a review of the available data. In: Malabarba L, Reis R E, Vari R P, de Lucena C A S, de Lucena Z M S (eds). *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Museu de Ciências e Tecnologia, Porto Alegre.
- Albert, J.S. (2001). Species diversity and phylogenetic systematics of American knifefishes (Gymnotiformes, Teleostei). *Miscellaneous Publications Museum Zoology* 190: 1-127.
- Albert, J.S e Crampton, W.G.R (2001) Five new species of *Gymnotus* (Teleostei: Gymnotiformes) from an Upper Amazonian floodplain, with descriptions of electric organ discharges and ecology. *Ichthyological Exploration of Freshwaters* 12(3), 241– 226.
- Albert, J.S.; Crampton, W.G.R.; Thorsen, D.H.; Lovejoy, N.R. (2005). Phylogenetic systematics and historical biogeography of the neotropical electric fish *Gymnotus* (Teleostei, Gymnotidae). *Systematic and Biodiversity* 2: 375-417.
- Almeida, J.S.; Miguez, V.H.; Bitencourt, J.A.; Affonso, P.R.A.M. e Carneiro, P.L.S. (2008). Evidência de sistema de cromossomos sexuais em uma nova espécie de *Gymnotus* (Teleostei: Gymnotiformes) da Bahia, Brasil. . *Resumos do 54º Congresso Brasileiro de Genética*: 16 a 19 de setembro - Salvador – Bahia –Brasil.

- Almeida-Toledo, L.F., F. Foresti e S.A. Toledo-Filho (1984). Complex sex chromosome system in *Eigenmannia* sp (Pisces, Gymnotiformes). *Genetica* 64: 165–169.
- Almeida-Toledo, L.F., F. Foresti, M.F.Z. Daniel e S.A. Toledo-Filho. (2000a). Sex chromosome evolution in fish: the formation of the neo-Y chromosome in *Eigenmannia* (Gymnotiformes). *Chromosoma* 109: 197–2000.
- Almeida-Toledo, L.F., F. Foresti, M.F.Z. Daniel, C.E. Lopes e S.A. Toledo-Filho. (2000b). Sex chromosome evolution in fish. II. Second occurrence of an X1X2Y sex chromosome system in Gymnotiformes. *Chromosoma Research*. 8: 335–340.
- Almeida-Toledo, L.F., F. Foresti, E.V. Pe' Quignot e M.F.Z. Daniel-Silva. (2001a). XX/XY sex chromosome system with X heterochromatinization: an early stage of sex chromosome differentiation in the Neotropic electric eel *Eigenmannia virescens*. *Cytogenet. Cell Genet.* 95: 73–78.
- Almeida-Toledo e Foresti, F. (2001b). Morphologically differentiated sex chromosomes in neotropical freshwater fish. *Genetica*, 111: 91-100.
- Alves-Gomes, J., Ortí, G., Haygood, M., Heiligenberg, W. E. e Meyr, A. (1995). Phylogenetic analysis of the South American electric fishes (Order Gymnotiformes) and the evolution of their electrogenic system: a synthesis based on morphology, electrophysiology and mitochondrial sequence data. *Molecular Biology and Evolution*, 12: (2) 298 – 318.
- Alves-Gomes, J.A. (1998). The phylogenetic position of the South American electric fish genera *Sternopygus* and *Archolaemus* (Ostariophysi: Gymnotiformes) according to 12S and 16S mitochondrial DNA sequences. In *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes* (Malabarba, R.M.; Reis, R.E.; Vari, R.P.; Lucena, C.A.; Lucena, Z.M.S.V., eds), 1st ed., Porto Alegre. Edipucrs, p 419-440
- Artoni, R. F. e Bertollo, L. A. C. (2001). Trends in the karyotype evolution of Loricariidae fish (Siluriformes). *Hereditas*, 134: 201 – 210.

- Beçak, M. L., Beçak, W., e Pereira, A. (2003) Somatic pairing, endomitosis and chromosome aberrations in snakes (Viperidae and Colubridae). *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 75(3): 285-300
- Bertollo, L. A. C., Fontes, M. S., Fenocchio, A. S. e Jesus, C. (1997). The X_1X_2Y sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus*. I. G-, C- and chromosome replication banding. *Chromosome Research*, 5: 493 – 499.
- Bertollo, L. A. C. e Mestriner, C. A. (1998). The X_1X_2Y sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus*. II. Meiotic analyses. *Chromosome Research*, 6: 141 – 147.
- Bertollo, L.A.C., Born, G.G., Dergam, J.A., Fenocchio, A.S. e Moreira-Filho, O. (2000). A biodiversity approach in the Neotropical fish *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic distribution of cytotypes and cytotaxonomic considerations. *Chromosome Res*, 8: 603–613
- Biet, E., Sun, J. e Dutreix, M. (1999). Conserved sequence preference in DNA binding among recombinant proteins: abnormal effect of sDNA secondary structure. *Nucleic Acids Research*, 27: 596-600.
- Born, G.G.; Bertollo, L.A.C; (2000) An XX/XY sex chromosome system in a fish species, *Hoplias malabaricus*, with a polymorphic NOR-bearing X chromosome. *Chromosome Research* 8:111-118.
- Brenner, S., Elga,r G., Sandford, R., Macrae, A., Venkatesh, B., Aparício, S. (1993) Characterization of the pufferfish (*Fugu*) genome as a compact model vertebrate genome. *Nature* 366: 265–268
- Brum, M. J. I., Galetti Jr, P. M., Correa, M. M. O. e Aguilar, C. T. (1992). Multiple sex chromosomes in South Atlantic ash, *Brevoortia aurea*, Clupeidae. *Brazilian Journal Genetics*, 15: 547 – 553.
- Buldyrev, S.V., Goldberger, A.C., Harlin, S., Mategna, R.N., Matsa, M.E., Peng, C.K., Simmons, M., Stanley, H.E., (1995) Long-range correlation proprieties of coding and noncoding DNA sequences. Gene Bank. Analysis. *Phys. Rev. E*, 51: 5084-5091.

- Claro (2008). *Gymnotus carapo* e *Gymnotus sylvius* (Teleostei: Gymnotidae): Uma abordagem citogenética-Moleccular. Dissertação de Mestrado – Universidade de São Paulo.
- Campos-da-Paz, R; Albert, J.S. (1998) The Gymnotiform “Eels” of tropical America: A history of classification and Phylogeny of the South American eletric knifefishes (Teleostei:Ostariophysi: Siluriphysi). In *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes* (Malabarba, R.M.; Reis, R.E.; Vari, R.P.; Lucena, C.A.; Lucena, Z.M.S.V., eds), 1st ed., Porto Alegre. Edipurcs, p 401-446.
- Campos-da-Paz, R. (2003). Family Gymnotidae. In *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central* (Reis, R.E.; Kullander, S.O.; Ferraris Jr, C.J., eds), Porto Alegre. Edipurcs, p 483-486.
- Campos-da-Paz, R.; Buckup, P.A. (2007). Família Gymnotidae. In *Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil*. (Buckup, P.A.; Menezes, N.A.; Ghazzi, M.S., eds), ed. Museu Nacional do Rio de Janeiro, p 120-122.
- Centofante, L., Bertollo, L. A. C. e Moreira-Filho, O. (2002). ZZ/ZW sex chromosome system in a new species of the genus *Parodon* (Pisces, Parodontidae). *Caryologia*, 55: 139 – 150.
- Chalesworth, B., Sniegowski, P. e Stephan, W. (1994). The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eucaryotes. *Nature*, 371: 215 – 220.
- Charlesworth, B. Charlesworth, D. (2000). The degeneration of Y chromosomes. *Phil Trans R Soc Lond B* 355:1563–1572.
- Crampton W. G. R. (1998). Effects of anoxia on the distribution, respiratory strategies and electric signal diversity of gymnotiform fishes. *Journal Fish Biology* 53, 502–520.

- Crampton, W.G.R., Thorsen, D.H., Albert, J.S. (2005) Three new species from a diverse and sympatric assemblage of the electric fish *Gymnotus* (Ostariophysi: Gymnotidae) in the lowland Amazon Basin, with notes on ecology. *Copeia* 2005.
- Csink, A.K. e Henikoff, S. (1998). Large-scale Chromosomal Movements During Interphase Progression in *Drosophila*. *The Journal of Cell Biology*, 143, (1):13-22.
- Dimitri, P., e Junakovic, N. (1999). Revising the selfish DNA hypothesis. New evidence on accumulation of transposable elements in heterocromatin. *Trends in Genetics*, 15:123-124.
- Diniz, D., Moreira-Filho, O. e Bertollo LAC: (2008). Molecular cytogenetics and characterization of a ZZ/ZW sex chromosome system in *Triportheus nematurus* (Characiformes, Characidae). *Genetica* 133: 85–91
- Fenocchio, A. S., Venere, P. C., Cesar, A. C. G., Dias, A. L. e Bertollo, L. A. C. (1991). Short term culture from solid tissues of fishes. *Caryologia*, 44: 161 – 166.
- Fernandes, F. M. C., Albert, J. S., Danielsilva, M. F. Z. , Lopes. C. E., Crampton, W. G. R. e Almeida-Toledo, L.F. (2005) A new *Gymnotus* (Teleostei: Gymnotiformes: Gymnotidae) from the Pantanal Matogrossense of Brazil and adjacent drainages: continued documentation of a cryptic fauna. *Zootaxa* 933: 1-14.
- Ferreira, I., Bertollo, L.A.C. e Martins, C. (2007). Comparative chromosome mapping of 5S rDNA and 5S *Hind*III repetitive sequences in Erythrinidae fishes (Characiformes) com emphasis on the *Hoplias malabaricus* “species complex”. *Cytogenetic Genome Resarch*. 118: 78-83.
- Ferreira, I.A., Martins, C. (2008) 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* 39: 411–418

- Fonteles, S.B.A., Lopes, C.E., Akama, A., Fernandes, F.M.C., Porto-Foresti, F., Senhorini, J.A., Daniel-Silva, M.F.Z., Foresti, F. e Almeida-Toledo, L.F. (2008). Cytogenetic characterization of the strongly electric Amazonian eel, *Electrophorus electricus* (Teleostei, Gymnotiformes), from the Brazilian rivers Amazon and Araguaia. *Genetic and Molecular Biology*, 31: (1) 227 – 230.
- Froese, R. & Pauly, D. (Ed.) (2007). FishBase. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org, version (04/2007).
- Galetti Jr., P. M., Foresti, F., Bertollo, L. A. C. e Moreira-Filho, O. (1981) Heteromorphic sex chromosomes in three species of the genus *Leporinus* (Pisces, Anostomidae). *Cytogenetic Cell Genetics*, 29: 138 - 142.
- Graça, W.J.; Pavanelli, C.S. (2007). Peixes da planície de inundação do Alto rio Paraná e áreas adjacentes. Eduem, 241p.
- Grady, D.L., Ratliff, R.L., Robinson, D. L., McCanlies, E.C., Meyne, J., Moyzis, R. K. (1992) Highly conserved repetitive DNA sequences are present at human centromeres. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 1695–1699.
- Grewal, S.I.S., Jia, S. (2007) Heterochromatin revisited. *Nat Rev Genet* 8:35–46.
- Gross, M.C., Feldberg, E., Cella, D.M., Schneider, M.C., Schneider, C.H., Porto, J.I.R., Martins, C. (2009) Intriguing evidence of translocations in *Discus* fish (*Symphysodon*, Cichlidae) and a report of the largest meiotic chromosomal chain observed in vertebrates. *Heredity* 102: 435-441.
- Guerra, M. (2004) FISH conceitos e aplicações na citogenética. Editora: Sociedade Brasileira de Genética. Ribeirão Preto, Brasil, p 1-32.
- Hass, I., Sbalqueiro, I. J., Müller, S. (2008) Chromosomal phylogeny of four Akodontini species (Rodentia, Cricetidae) from Southern Brazil established

by Zoo-FISH using *Mus musculus* (Muridae) painting probes. *Cytogenetic and Genome Research* 16, 75-88.

Hatanaka T. e Galetti Jr., P. M. (2004). Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetica*, 122: 239 – 244.

Henning, F., Trifonov, V. e Almeida-Toledo, L.F.(2008) Used of chromosome microdissection in fish molecular cytogenetic. *Genetics and Molecular Biology*, 31: 279-281.

Heiligenberg, W. (1990) Eletrosensory system in fish. *Synapse* 6: 196-206.

Howell, W. M. e Black, D. A. (1980). Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, 36: 1014 – 1015.

Jurka,J., Kapitonov, V.V., Pavlicek, A., Klonowski, P., Kohany, O., Walichiewicz, J. (2005) Repbase Update, a database of eukaryotic repetitive elements. *Cytogenetic and Genome Research* 110, 462-467.

Kidwell, M.G. (2002). Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. *Genetica*, 115, 49-63.

Kligerman A. D. e Blomm, S. E (1977). Rapid chromosome preparations from solid tissues of Fishes. *J Fish Res Bd Can* ,34: 266 - 269.

Komiya, H. e Takemura, S. (1979). Nucleotide sequence of 5S ribosomal RNA from rainbow trout (*Salmo gairdnerii*) liver. *J. Biochem*, 86: 1067–1080.

Krasnov, A., Koskinen, H., Afanasyev, S., Mölsä, H. (2005) Transcribed Tc1-like transposons in salmonid fish. *BMC Genomics*, 6: 1-10.

Lacerda, M.C.V. e Maistro, E.L. (2007) Cytogenetic Analysis of Three Sympatric *Gymnotus* species (Teleostei: Gymnotidae) from the Fundo Stream, MG, Brazil. *Cytologia* 72, (1):89-93.

- Levan, A., Fredga K. e Sandberg, A. A. (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52: 201 – 220.
- Li, Y.C., Kord, A. B., Fahima, T., Berles, A. e Nero, E. (2002). Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutation mechanisms: a review. *Molecular Ecology*, 11: 2453-2465.
- Liu, Z., Li, P., Kocabas, A., Karsi, A. e Ju, Z. (2001). Microsatellite containing genes from the channel catfish brain: evidence of trinucleotide repeat expansion in the coding region of nucleotide excision repair gene RAD23B. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 289: 317-324.
- Matoso, D.A. (2009) Contribuição a conservação genética do peixe surubim (Teleostei: Siluriformes). Tese de Doutorado. Universidade Federal do Paraná.
- Margarido, V. P., Bellafronte E., Moreira-Filho, O. (2007). Cytogenetic analysis of three sympatric *Gymnotus* (Gymnotiformes, Gymnotidae) species verifies invasive species in the Upper Paraná River basin, Brazil. *Journal of Fish Biology*, 70: 155-164.
- Martins, C. e Galetti Jr., P. M. (1999). Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). *Chromosomal Research*, 7: 363 – 367.
- Martins, C. e Galetti, Jr. P.M. (2000). Conservative distribution of 5S rDNA loci in *Schizodon* (Pisces, Anostomidae) chromosomes. *Chromosome Research* 8:353–355
- Martins, C. e Galetti, Jr. P.M. (2001). Organization of 5S rDNA in species of the fish *Leporinus* : two different genomic locations are characterized by distinct nontranscribed spacers. *Genome* 44: 903–910.
- Martins, C. e Wasko, A.P.(2004). Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish genome. In Williams C.R. (ed): *Focus on Genome Research*. Nova Science Publishers, Hauppauge, NY.

- Martins, C., Ferreira, I. A., Oliveira, C., Foresti, F., Galetti, Jr., P.M. (2006).A tandemly repetitive centromeric DNA sequence of the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) is derived from 5S rDNA. *Genetica* 127: 133–141
- Mazzuchelli, J.e Martins C. (2009).Genomic organization of repetitive DNAs in the cichlid fish *Astronotus ocellatus*. *Genetica* 136: 461–469.
- Mestriner, C. A, Bertollo, L. A. C e Galetti Jr, P. M. (1995) Chromosome banding and synaptonemal complexes in *Leporinus lacustris* (Pisces, Anostomidae): analysis of a sex system. *Chromosome Research*, 3: 440 – 443.
- Milhomem, S.S.R., Pieczarka, J.C., Crampton, W.R., Souza, A.C.P., Carvalho, Jr., J.R. e Nagamachi, C. Y. (2007) Differences in karyotype between two sympatric species of *Gymnotus* (Gymnotiformes:Gymnotidae) from the eastern amazon of Brazil. *Zootaxa* 1397: 55-62.
- Milhomem, S.S.R.; Silva, D.S.; Pieczarka, J.C. e Nagamachi, C.Y. (2008). Um novo cariótipo indica a ocorrência de uma espécie não descrita de *Gymnotus* (Gymnotidae – Gymnotiformes) na Amazônia Oriental. *Resumos do 54º Congresso Brasileiro de Genética*: 16 a 19 de setembro - Salvador – Bahia –Brasil.
- Morreira-Filho, O., Bertollo, L.A.C. e Galetti Jr., P.M. (1993) Distribution of Sex chromosome Mechanisms in Neotropical fish and description of a ZZ/ZW system in *Parodon hilarii* (Parodontidae). *Caryologia* 46, 115-125.
- Murray, M. G. e Thompson, W. F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 8, 4321 – 4326.
- Nei, M. e Rooney, A. P. (2005). Concerted evolution and birth and death evolution of multigene families. *Annu. Rev. Genet.* 39:121-152.
- Ocalewicz, k., Mota-Velasco, J.C., Campos-Ramos, R. e Penman, D. J. (2009). FISH and DAPI staining of the synaptonemal complex of the Nile tilapia

(*Oreochromis niloticus*) allow orientation of the unpaired region of bivalent 1 observed during early pachytene. *Chromosome Resarch*.

Oliveira, C., Joyce, S., Chew, K., Porto-Foresti, F., Dobson, M. J. e Wright, J. M. (1999). A LINE2 repetitive DNA sequence from the cichlid fish, *Oreochromis niloticus*: sequence analysis and chromosomal distribution *Chromosoma*, 108, 457 – 468.

Oliveira, C., Wright, J. M. e Foresti, F. (2002). Chromosome Structure in Fishes. Some Aspects of Chromosome Structure and Functions. R. C. Sobti et al. eds. *Narosa Publishing House*, New Delhi, India.

Oyakawa, O T, Akama A, Mautari K C, Nolasco J C (2006) Peixes de riachos da Mata Atlântica nas Unidades de Conservação do Vale do Rio Ribeira de Iguape no Estado de São Paulo. São Paulo. Ed. Neotrópica, SP.

Parise-Maltempi, P.P., Martins, C., Oliveira, C. e Foresti, F. (2007) Identification of new repetitive element in the sex chromosome of *Leporinus elongates* (Teleostei: Characiformes: Anostomidae): new insights for the sex chromosome in *Leporinus*. *Cytogenetic Genome Res.*, 1163: 218-223.

Pieczarka, J.C., Nagamachi, C. Y. (2004) Pintura cromossômica como instrumento para estudos filogenéticos. In: *FISH: conceitos e aplicações na citogenética*. Guerra, M. Ediotra; Sociedade Brasileira de Genética. Ribeirão Preto, Brasil.

Pimpinelli, S., Berloco, M., Fanti, L., Dimitri, P., Bonaccors, S., Marchettib, E. e Caizzi R (1995) Transposable elements are stable structural components of *Drosophila melanogaster* heterochromatin. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:3804–3808.

Sambrook, J.e Russell, D. W. (2001). Molecular cloning: a laboratory manual. cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.

- Sambrook, L. B., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989). 2 ed. Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, New York, Cold Spring Harbor.
- Sánchez, S., Laudicina, A., Jorge, L.C. (2004) A New Report of Multiple Sex Chromosome System in the Order Gymnotiformes (Pisces). *Cytologia*, 69(2), 155–160.
- Scheimberg, M. O. (2009) Citogenética Molecular de em espécies da família Parodontidae (PISCES; CHARACIFORMES). Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Ponta Grossa.
- Schueler, M.G., Higgins, A.W, Rudd M.K, Gustashaw, K., Willard, H. (2001). Genomic and genetic definition of a functional human centromere. *Science* 294: 109–115
- Shibatta, O. A. e Bockmann, F. A. (2007). Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil. In: Buckup, P. A., Menezes, N. A., Ghazzi, M. S. Série Livros 23. Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, p. 109 – 113.
- Silva, E.B.; Margarido, V.P. (2005). An $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ multiple sex chromosome system in a new species of the genus *Gymnotus* (Pisces, Gymnotiformes). *Environmental Biology of Fishes* 73, 293-297.
- Steinemann, S. e Steinemann, M. (2005). Retroelements: Tools for sex chromosome evolution. *Cytogenetic Genome Research* 110: 134-143.
- Stoddard, P. (2002) Electric signals: Predation, sex, and environmental constraints. In: Slater P J B, Rosenblatt J S, Snowdon C T, Roper T J (eds.) *Advances in the Study of Behaviour*, Academic Press, New York
- Stopa, R. M. e Hoshino, K. (1999) Eletrolocation communication discharges of the fish *Gymnotus carapo* L. (Gymnotidae: Gymnotiformes) during behavioral sleep. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 32: 1223-1228.

- Sumner, A. T. (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Expl. Cell. Res.*, 74, 304-306.
- Swofford, D. L. (2002). PAUP* Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Teixeira, W.G., Ferreira, I.A., Cabral-de-Mello, D.C., Mazzuchelli, J., Valente, G.T., Pinhal, D., Poletto, A.B., Venere, P.C., Martins, C. (2009) Organization of Repeated DNA Elements in the Genome of the Cichlid Fish *Cichla kelberi* and Its Contributions to the Knowledge of Fish Genomes. *Cytogenetic Genome Research* 125: 224-234.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. e Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22, 4673-4680.
- Topp, C.N. e Dawe, R.K. (2006) Reinterpreting pericentromeric heterochromatin. *Curr Opin Plant Biol* 9:647–653.
- Vanzela, A.L.L., Swarça, A.C., Dias, A.L., Ruas, P.M., Sbalqueiro, I., Stolf, R. e Caetano-Guiliano, L. (2002). Differential distribuição of (GA)_n microsatellite on chromosome of some animal and plant species. *Cytologia*, 67: 9-13.
- Valente, G. T., Schneider, C.H., Gross, M.C., Feldeberg E. e Martins, C. (2009). Comparative cytogenetics of cichlid fishes through genomic in-situ hybridization (GISH) with emphasis on *Oreochromis niloticus*. *Chromosome Research*.
- Venere, P. C., Ferreira, I. A., Martins, C. e Galetti Jr., P.M.. (2004) A novel ZZ/ZW sex chromosome system from the genus *Leporinus* (Pisces, Anostomidae: Characiformes). *Genetica* 121, 75-80.
- Vicari, M. R., Artoni, R. F., Moreira-Filho O. e Bertollo, L. A. C. (2008). Colocalization of repetitive DNAs and silencing of major rRNA genes. A

case report of the fish *Astyanax janae*. *Cytogenetic and Genome Research*, 122: 67 – 72.

Vitkova, M., Fukova, I., Kubicková, S., Marec, F. (2007) Molecular divergence of the W chromosomes in pyralid moths (Lepidoptera). *Chromosome Research*, 15: 917–930.

Vissoto, P. C., Foresi, F. e Oliveira, C. (1999). Karyotype description of five species of Pimelodidae (Teleostei, Siluriformes). *Chromosome Science*, 3: 9 – 13.

Volff, J.N., Korting, C., Sweeney, K. e Scharl, M. (1999). The non-LTR retrotransposon *Rex3* from the fish *Xiphophorus* is widespread among teleosts. *Molecular and Biology Evolution*, 16: 1427–1438.

Yonega-Yassuda, Y. (2004) Contribuição da FISH à citogenética de mamíferos e répteis. In: *FISH: conceitos e aplicações na citogenética*. Guerra, M. Editora: Sociedade Brasileira de Genética. Ribeirão Preto, Brasil.

Zwick, M. S., Hanson, R. E., McKnight, T. D., Islam-Faridi, H. M., Stelly, D. M., Wing, R. A. e Price, J. H. (1997). A rapid procedure for the isolation of *Cot-1* DNA from plants. *Genome*, 40: 138-142.

Wasko, A.P., Martins, C., Wright, J. M. e Galetti, Jr., P.M. (2001). Molecular organization of 5S rDNA in fishes of the genus *Brycon*. *Genome*, 44: 893-902.

Anexos

5 – Anexos

5.1 – Protocolos – Citogenética Convencional

5.1.1 – Obtenção de metáfases mitóticas – método direto (Bertollo et al., 1978)

Injetar intraperitonealmente no peixe, entre as nadadeiras peitorais e ventrais, solução de colchicina (0,025%), na proporção de 1ml por 100g de massa corpórea do animal;

Deixar o peixe em aquário bem aerado, por um período de 40 minutos sacrificando-o posteriormente para a retirada de seu órgão hematocitopoiético: rim anterior ou posterior;

Colocar o tecido em 10 ml de solução hipotônica de KCl (0,075M) previamente aquecida a 37°C;

Fragmentar esse material, com auxílio de pinça de dissecação desprovida de agulha, aspergindo e expirando o material até que fique homogêneo;

Transferir o sobrenadante, com o auxílio de uma pipeta Pasteur, para um tubo de centrífuga. Deixá-lo em estufa ou banho-maria a 37°C por 20 minutos (pedaços de tecidos ainda não desfeitos são descartados);

Acrescentar 1ml de fixador Carnoy recém preparado (álcool metílico : ácido acético 3:1), e ressuspender o material deixando-o em temperatura ambiente por 5 minutos, centrifugá-lo durante 10 minutos a $1,19 \times 10^12g$;

Descartar o sobrenadante com uma pipeta Pasteur;

Adicionar 6-8 ml de fixador;

Ressuspender o material com o auxílio de uma pipeta Pasteur e centrifugar por 10 minutos a $1,19 \times 10^12g$;

Descartar o sobrenadante e repetir esse procedimento;

Após a última centrifugação e eliminação do sobrenadante, adicionar uma quantidade de fixador suficiente para se obter uma suspensão celular que não esteja muito diluída e nem muito concentrada (cerca de 1 ml de fixador para 0,5 ml de sedimento). Ressuspender o material com cuidado até ficar homogêneo; Colocar uma lâmina limpa em água a 60° C. Pingar três gotas da suspensão com o auxílio de uma pipeta Pasteur sobre a lâmina pré-aquecida e secar ao ar;

O material deve ser guardado em tubos tipo eppendorf e mantidos em freezer à -20°C.

5.1.2 – Obtenção de metáfases mitóticas – método indireto in vitro (Fenocchio et al., 1991)

Retirar aproximadamente 3mm³ da porção anterior do rim e colocar em uma placa de Petri contendo 5 ml de meio de cultura RPMI mais 20% de soro bovino fetal e antibiótico;

Desagregar o material com pinça de ponta fina com posterior aspersão e expiração da solução com uma seringa de vidro sem agulha;

Incubar a solução de células em estufa a 29° C por 7 horas em média;

Pingar três gotas de colchicina (0,025%) em cada recipiente 25 minutos antes de completar o tempo. Agitar suavemente a placa de Petri para homogeneizar o material e manter em estufa até o término do tempo;

Transferir a cultura para um tubo de ensaio e centrifugar por 10 minutos a 9,64x10¹¹g;

Descartar o sobrenadante e completar o tubo de ensaio até 8 ml com solução hipotônica de KCl (0,075M). Ressuspender a solução e incubar por cerca de 30 minutos a uma temperatura de 37° C;

Preparar solução fixadora com três partes de metanol para uma parte de ácido acético e manter sob refrigeração. Após o tempo da hipotonização, pingar algumas gotas do fixador em cada tubo;

Ressuspender o material até ficar homogêneo, e centrifugar por 10 minutos a 9,64x10¹¹g;

Descartar o sobrenadante e em seguida completar o tubo até o volume de 8 ml;

Novamente ressuspender o material e centrifugar por 10 minutos a 9,64x10¹¹g;

Repetir a etapa anterior por duas vezes;

Descartado o sobrenadante, colocar 1,5 ml do fixador e ressuspender o material. Armazenar a solução em tubo tipo eppendorf mantendo-o em freezer à -20° C.

5.1.3 - Método de coloração convencional Giemsa

Para analisar o número e morfologia dos cromossomos, as lâminas preparadas com a suspensão celular foram coradas com solução do corante Giemsa, diluído em tampão fosfato pH 6,8 (KH₂PO₄ + Na₂HPO₄) a 5% durante aproximadamente 10 minutos e em seguida foram lavadas em água corrente e secas ao ar.

5.1.4 – Coloração das regiões organizadoras de nucléolos Ag-RONs (Howell e Black, 1980)

Em lâminas previamente preparadas para a obtenção de cromossomos mitóticos pingar uma gota da solução coloidal reveladora (1g de gelatina dissolvida em 50 ml de água destilada acrescida de 0,5 ml de ácido fórmico) e duas gotas da solução de nitrato de prata (1g de AgNO_3 dissolvida em 2 ml de água destilada) sobre o material na lâmina;

Cobrir a lâmina com lamínula;

Levar a lâmina à estufa a 60°C até que a mistura das soluções alcance uma coloração marrom-dourada;

Lavar a lâmina em água corrente e deixar secar ao ar;

Se necessário, corar com Giemsa diluída a 1% em tampão fosfato pH 6,8 por 30 segundos.

5.1.5 – Detecção da heterocromatina - (Sumner, 1972)

Colocar a lâmina recentemente preparada para a obtenção de cromossomos mitóticos em solução de HCl 0,2N, a 42°C, por 5 minutos;

Lavar a lâmina com água destilada e deixar secar ao ar;

Colocar a lâmina em solução de hidróxido de bário a 5% (Ba(OH)_2) à 28°C por aproximadamente 20 segundos;

Imergir a lâmina rapidamente em ácido HCl 0,2N e lavar com jatos de água;

Colocar a lâmina em uma solução de 2xSSC (15,53 g de NaCl + 8,82 g de Citrato Trissódico + Água deionizada) por uma hora à 60° C;

Lavar a lâmina em água destilada e secar ao ar;

Corar o material com giemsa.

5.1.6 – Identificação cromossômica

A identificação cromossômica foi realizada baseada nos critérios da relação de braços (RB), proposta por LEVAN et al., (1964) e classificados como metacêntricos (m) (RB= 1,00 a 1,70); submetacêntricos (sm) (RB= 1,71 a 3,00); subtelocêntricos (st) (RB= 3,01 a 7,00) e acrocêntricos (a) (RB>7,00). As metáfases foram capturadas por câmara CCD Olympus DP71 com resolução de 13mp acoplada a um Microscópio Olympus BX 40 com o programa ImageProPlus 5.0.

5.1.7 – Obtenção de células meióticas para análise da meiose convencional (Kligerman e Bloom, 1977)

Retirar as gônadas cortando-as em pequenos pedaços;

Colocar o tecido em uma cubeta com água destilada ou solução hipotônica de KCl 0.075M;

Deixar o tecido hipotonizando por aproximadamente uma hora e 20 minutos;

Após esse período colocar o material em fixador (metanol: ácido acético 3:1) por 30 minutos;

Repetir a fixação trocando o fixador e manter o material por mais 30 minutos;

Após a segunda fixação trocar o fixador colocando-o em um tubo tipo eppendorf de 2 ml e estocar a -20°C .

5.1.8 – Preparação das lâminas para análise meiótica convencional

Colocar a gônada em uma cubeta apropriada para macerar o tecido;

Cortar o tecido em pequenos pedaços;

Pingar duas a três gotas de uma solução de ácido acético 60% e com ajuda de um bastão macerar o material até obter uma solução homogênea;

Pingar duas a três gotas da solução em uma lâmina limpa aquecida a aproximadamente 40°C;

Esperar o ácido acético evaporar tomando o cuidado de homogeneizar a solução sobre a lâmina sem deixá-la aquecer muito para não estragar a preparação;

Corar a lâmina em solução de Giemsa 5% com tampão fosfato.

5.2- Protocolos Citogenética Molecular

5.2.1 – Hibridização fluorescente in situ (FISH) (Pinkel et al., 1986).

Para a identificação das regiões de DNAr 5S foi utilizada a sonda obtida usando os primers A 5'-TACGCCCGATCTCGTCCGATC-3' e B 5'-GCTGGTATGGCCGTAGC-3' (MARTINS e GALETTI, 1999),.

I - Marcação da sonda por nick translation

II – Tamanho dos fragmentos em gel

Misturar 1 µl da reação de nick translation com 1 µl de azul de bromofenol e aplicar em gel de agarose 0,8% e 1 µl brometo de etídio;

Aplicar a amostra por 20 a 30 minutos e checar o tamanho dos fragmentos;

III – Hibridação fluorescente in situ (FSH)

Lavar as lâminas em tampão PBS uma vez durante 5 minutos em temperatura ambiente sob agitação;

Desidratar o material em série alcoólica 70%, 85% e 100%, 5 minutos cada (secar);

Incubar as lâminas em 90 µl de RNase (0,4% RNase/ 2xSSC) a 37°C por 1 hora em câmara úmida com água milli-Q;

Lavar três vezes por 5 minutos em 2xSSC;

Lavar durante 5 minutos em PBS uma vez;

Fixar em formaldeído 1% em PBS uma vez, 50 mM MgCl₂ durante 10 minutos à temperatura ambiente;

Lavar em PBS uma vez por 5 minutos sob agitação;

Desidratar o material em série alcoólica 70%, 85%, 100% por 5 minutos cada;

Desnaturar em série alcoólica, a solução de hibridação à 100°C por um período de 10 minutos e passá-la imediatamente ao gelo;

Desnaturar o DNA cromossômico com formamida 70% em 2xSSC a 70°C por 5 minutos;

Desidratar o material em série alcoólica 70%, 85% e 100% durante 5 minutos cada;

Preparar câmara úmida à 37°C;

Montar cada lâmina com 50 µl de solução de hibridização, cobrir com lamínula e deixar 12h à 37°C;

IV - Lavagens

Lavar duas vezes em formamida 15%/ 0,2xSSC pH 7.0 a 42°C durante 10 minutos cada sob agitação;

Lavar as lâminas três vezes em 0,1xSSC a 60°C, por 5 minutos cada sob agitação;

Lavar durante 5 minutos em solução de Tween 0,5%/ 4xSSC, à temperatura ambiente sob agitação;

Incubar as lâminas em tampão 5% NFDM/ 4xSSC por 15 minutos;

Lavar duas vezes por 5 minutos com Tween 0,5%/ 4xSSC, à temperatura ambiente sob agitação;

Incubar as lâminas com 90 µl de FITC (0,8 µl FITC/ 800 µl NFDM) durante 30 minutos em câmara úmida e escura, à temperatura ambiente;

Lavar três vezes por 5 minutos com Tween 0,5%/4xSSC, à temperatura ambiente sob agitação;

Incubar com 90 µl de anti-avidina (8 µl anti-avidina/ 792 µl de NFDM) durante 30 minutos em câmara úmida e escura, à temperatura ambiente;

Lavar três vezes por 5 minutos com Tween 0,5%/ 4x SSC, à temperatura ambiente sob agitação;

Incubar as lâminas com 90 µl de FITC (0,8µl FITC/800µl NFDM) durante 30 minutos em câmara úmida e escura, à temperatura ambiente;

Lavar três vezes por 5 minutos com Tween 0,5%/4x SSC, à temperatura ambiente sob agitação;

Incubar com 90 µl de anti-avidina (8 µl anti-avidina/ 792 µl de NFDM) durante 30 minutos em câmara úmida e escura, à temperatura ambiente;

Lavar três vezes por 5 minutos com Tween 0,5%/ 4xSSC, à temperatura ambiente sob agitação;

Incubar as lâminas com 90 µl de FITC (0,8 µl FITC/800 µl NFDM) durante 30 minutos em câmara úmida e escura, à temperatura ambiente;

Lavar três vezes por 5 minutos com Tween 0,5%/ 4xSSC, à temperatura ambiente sob agitação;

Desidratar em série alcoólica 70%, 85% e 100%, 5 minutos cada e secar ao ar;

V – Montagem da lâmina

Misturar 200 µl de antifading mais 1 µl de DAPI – 4'-6 diamidino – 2 - phenilindole (50 µg/ml);

Colocar 25 µl da solução e cobrir com lamínula. Guardar no escuro.

5.2.2 – Isolamento de sequências repetitivas obtidas pela cinética de reassociação do DNA (Cot-1) (Zwick et al., 1997).

Diluir o DNA genômico a 100-500 ng/ul em 0,3M NaCl;

Colocar 500 ul de DNA em tubos de 1,5 ml;

Autoclavar por 3 a 5 minutos a 1.0 atm/120oC;

Aplicar 3 ul do DNA autoclavado em gel de agarose 1% para checar o tamanho dos fragmentos obtidos (ideal obter fragmentos entre 100 e 1.000 pb);

Desnaturar 3 alíquotas (tubos 0, 1 e 5) com 50 µl do DNA autoclavado em banho a 95oC por 10 minutos;

Passar os tubos para gelo por 10 segundos: tratar imediatamente o tubo 0 com S1 nuclease e colocar os tubos 1 e 5 em banho a 65oC para renaturação.

Após 1 minuto, retirar o tubo 1 e tratar com S1 nuclease e após 5 minutos, retirar o tubo 5 e tratar com S1 nuclease;

Para o tratamento com S1 nuclease, utilizar 1U da enzima para 1ug de DNA e 5,5 µl tampão 10X para o volume final de 50 µl.

Incubar a 37oC por 8 minutos;

Congelar imediatamente em nitrogênio líquido;

Adicionar igual volume de fenol/clorofórmio (1:1);

Centrifugar por 5 minutos a 13.000 rpm. Coletar a fase aquosa e passar para um tubo novo;

Precipitar o DNA com 2,5 volumes de etanol absoluto gelado;

Deixar no freezer a –75oC por 30 minutos;

Centrifugar por 15 minutos a 18,75x10¹¹g a 4oC. Secar e ressuspender em 50 ul de água milliQ autoclavada.

Checar o DNA em gel de agarose 1%.

5.2 .3 - Análise dos Marcadores citogenéticos

Para cada uma das técnicas aplicadas foram examinadas 30 células metafásicas ou meióticas. As preparações foram visualizadas em microscópio de epifluorescência Olympus BX 40 e capturadas com câmera digital CCD Olympus DP71 13 mp. Para a análise com DAPI foi utilizado filtro de comprimento de onda variando de 360 a 390 nm.

5.2.4 – Extração de DNA – (Sambrook e Russel, 2001).

Colocar o tecido (1/1 cm³) em um almofariz e macerá-lo com nitrogênio líquido com auxílio de um bastão de louça;

Adicionar 250 µl de solução de lise (NaCl 0.4M, EDTA 0.1M pH 8.0, Proteinase K 100 µg/ml, SDS 0.1%) e homogeneizar a amostra;

Transferir o material para um tubo tipo eppendorf e mantê-lo em banho-maria à temperatura de 50°C durante uma hora e 30 minutos;

Adicionar 250 µl de RNase (100 mg/ml) mantendo-o em banho-maria à 37°C por 1 hora, procedendo a leve agitação periódica;

Acrescentar 500 µl de uma solução contendo fenol: clorofórmio: álcool isoamílico na proporção 50: 48: 2;

Agitar suavemente o tubo por 30 minutos;

Centrifugar o material por 10 minutos a 8,33x10¹³g;

Transferir com auxílio de pipeta o sobrenadante, sem a camada fenólica;

Adicionar NaCl 1M para a precipitação do DNA juntamente com 2 volumes de etanol gelado absoluto;

Inverter o tubo diversas vezes para a visualização do DNA;

Centrifugar o material por 5 minutos a 8,33x10¹³g e descartar o sobrenadante;

Adicionar 500 µl de etanol 70% e deixar descansar por 5 minutos;
Centrifugar o material por 5 minutos a $8,33 \times 10^3 g$ e descartar o sobrenadante;
Secar o DNA em estufa à 37°C por 12h;
Ressuspender o DNA em 30 µl de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM)
ou água autoclavada e armazenar em freezer a - 20°C.

5.2.5 – Extração de DNA – Método CTAB (Murray e Thompson, 1980)

Preparar o Tampão CTAB para um volume final de 15 ml seguindo a formulação:

6 ml CTAB 5% (concentração final 2%)

3 ml de NaCl 5M (concentração final 1M)

3 ml EDTA 0,5M (concentração final 0,1M)

3 ml TRIS-HCl 1M pH 8.0 (concentração final 0,1M)

Guardar o tampão de extração em temperatura ambiente.

I - Processo de extração:

Colocar em um tubo 0,2g de tecido muscular, 600 µl de tampão CTAB, 13 µl de proteinase K (10 mg/ml) e 15 µl de DTT (1M);

Colocar a 60°C por 10 horas ou até que o tecido esteja totalmente digerido;

Adicionar ao tubo 10 µl de RNase (10 mg/ml) e manter à 37°C por 3 horas;

Adicionar 600 µl de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1);

Agitar durante 5 minutos (vórtex suave). Centrifugar a $5,33 \times 10^4 g$ por 5 minutos;

Retirar sobrenadante e transferir para um novo tubo;

Adicionar 450 µl de Isopropanol e deixar a -20°C por 2 horas ou 12h;

Centrifugar a $1,63 \times 10^4 g$ por 15 minutos (alinhar os tubos na centrífuga).

Descarta-se o sobrenadante;

Lavar o pellet com 450 μl de etanol 70%. Centrifugar por 2 minutos e retirar o sobrenadante.

Deixar secando na estufa a 37°C e ressuspender em 150 μl de água mili-Q.

5.2.6 – Preparação do gel de agarose 0,8% e 3% para eletroforese e visualização do DNA

Pesar 0,8 ou 3 gramas de agarose e colocar num Erlenmeyer de 250 ml;
Diluir a agarose em 100 ml de tampão TBE uma vez, aquecendo a solução em forno microondas e cuidando para que não permaneçam blocos não dissolvidos no frasco;

Esperar a solução esfriar a temperatura ambiente e em seguida colocá-la na cuba de eletroforese na presença de um pente para formar poços para aplicação das amostras;

Aguardar a polimerização do gel;

Retirar cuidadosamente o pente para não estragar os poços e adicionar o tampão TBE uma vez na cuba até cobrir os eletrodos;

Injetar o DNA nos poços junto com o tampão de aplicação (azul de bromo fenol);

Inserir os eletrodos nas posições indicadas da cuba, ligar a fonte na corrente elétrica programando-a para 100 Volts;

Deixar o DNA migrar no gel por 5 horas;

Retirar o gel da cuba e corá-lo com brometo de etídeo (10mg/ml) diluído em TBE uma vez por 15 minutos;

Retirar o gel do tampão TBE, colocando-o sobre o transiluminador;

Ligar a luz ultravioleta, visualizar as bandas rapidamente para evitar degradação e fotografar o gel.

6 - Parecer 02/2008 (protocolo 04509/08) da Subcomissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Ponta Grossa.



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA



Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

**SCEEa**

SUB-COMISSÃO DE ÉTICA EM ANIMAIS

PARECER Nº 02/2008
Protocolo: 04509/08

Em reunião ordinária realizada nesta data, a Comissão de Ética em Pesquisa, **APROVOU** o protocolo de pesquisa intitulado "**Biodiversidade, Citogenética e Preservação dos Peixes dos Campos Gerais II**" de responsabilidade do Pesquisador Roberto Ferreira Artoni.

Ponta Grossa, 08 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

Av. Carlos Cavalcanti, 4748 - CEP: 84030-900 - Ponta Grossa - PR - BRASIL
Bloco M Sala 12 - Campus Universitário em Uvaranas
Fone (42) 3220-3108 - Fax: (42) 3220-3102
e-mail: seccoept@uepg.br Home page: www.uepg.br

6.1 - Licença permanente para coleta de material zoológico emitida pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA (proc. no. 15115-1).



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: 15115-1		Data da Emissão: 02/04/2008 10:47
Dados do titular		
Registro no Ibama: 550248	Nome: Roberto Ferreira Artoni	CPF: 138.549.798-00
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	Táxon(s)
1	ORDEM	Characiformes, Gymnotiformes, Tetraodontiformes, Siluriformes, Synbranchiformes, Perciformes
2		

Destino do material biológico coletado

#	Nome e local destino	Tipo Destino
1	UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA	Laboratório de Citogenética e Evolução

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 deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 85979796



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: 15115-1		Data da Emissão: 02/04/2008 10:47
Dados do titular		
Registro no Ibama: 550248	Nome: Roberto Ferreira Antoni	CPF: 138.549.798-00
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: 85979796



Página 2/2