

**Patricia Elda Sobrinho Scudeler**

**Estudo da Estrutura Molecular dos Cromossomos  
Supranumerários em *Moenkhausia sanctaefilomenae*  
(Teleostei, Characiformes, Characidae).**

**Doutorado**

**Botucatu**

**2010**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP**  
**INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU**

**Estudo da Estrutura Molecular dos Cromossomos  
Supranumerários em *Moenkhausia sanctaefilomenae*  
(Teleostei, Characiformes, Characidae).**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Ciências Biológicas (Zoologia) do Instituto  
de Biociências de Botucatu, como parte dos  
requisitos para a obtenção do título de Doutor.

**Patricia Elda Sobrinho Scudeler**

**Orientador: Prof. Dr. Fausto Foresti**

**Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adriane P. Wasko**

**Botucatu**

**2010**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Sobrinho-Scudeler, Patricia Elda.

Estudo da estrutura molecular dos cromossomos supranumerários em  
*Moenkhausia sanctaefilomenae* (Teleostei, Characiformes, Characidae)/  
Patricia Elda Sobrinho Scudeler. - Botucatu, 2010

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de  
Biociências de Botucatu, 2010

Orientador: Fausto Foresti

Co-orientadora: Adriane P. Wasko

Capes: 20204000

1. Genética animal. 2. Hibridação. 3. Cromossomos.

Palavras-chave: Cromossomos B; Hibridação *in situ* fluorescente;  
Microdissecção cromossômica; *Moenkhausia sanctaefilomenae*;  
Sequências repetitivas.

*Dedico este trabalho...*

*Com todo o meu carinho, aos meus pais Álvaro e Clarice, aos meus irmãos Marcel e Fernando, à minha avó Elza e ao meu esposo Luciano.*

## *Agradecimentos*

A Deus, pelo dom da vida, por minha família, trabalho e amigos.

Ao professor Fausto Foresti, pela orientação, pelo exemplo e pelo incentivo em todos os momentos.

Aos professores Cláudio de Oliveira e Edmir Daniel de Carvalho, pelo exemplo como pesquisadores e dedicação ao trabalho.

A professora Adriane P. Wasko, pelas contribuições para a elaboração desta tese.

Ao técnico Renato Devidé, sempre presente e disposto a ajudar nas coletas, pelos ensinamentos nas preparações citogenéticas e pela amizade.

Aos funcionários do Departamento de Morfologia e da Seção de Pós-Graduação, a CAPES e a FAPESP.

Aos colegas do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes. Em especial aos amigos, Gleisy, Andréia Alves, Ricardo Japonês, que me ajudaram no que precisei.

As minhas amigas Débora e Rosângela, que não mediram esforços para me ajudar. Obrigada pela dedicação, carinho e amizade.

Ao amigo Zeca, obrigada pela dedicação, pelas sugestões e conselhos. Agradeço tudo o que fez por mim nesta reta final.

A minha amiga Lígia Bassetto, pelos conselhos, incentivo, pelos momentos de alegrias. Obrigada por estar presente em minha vida.

A professora Lurdes Foresti de Almeida Toledo, pela oportunidade da utilização de seu laboratório para a realização de parte do meu doutorado.

A Toninha, técnica do laboratório da Prof<sup>a</sup> Mayana Zatz, agradeço pela ajuda no meu trabalho.

Aos meus amigos Mari e Lipão da USP. Não poderia deixar de agradecer-los por tudo o que fizeram por mim, pelos ensinamentos, pelas sugestões, pela dedicação exclusiva nesta reta final do meu trabalho; sem dúvida, pelo pouco tempo que nos conhecemos vivemos momentos inesquecíveis, os quais eu jamais esquecerei.

Aos meus pais Álvaro e Clarice que admiro muito, que sempre me conduziram pelo melhor caminho e sempre me apoiaram em todas as minhas decisões.

Aos meus irmãos Marcel e Fernando por torcerem por mim, em todos os momentos de minha vida.

A minha querida avó Elza, por todo seu carinho e simplicidade.

Ao meu querido e amado Luciano, meu esposo, companheiro de minhas batalhas e estímulo para eu nunca pensar em desistir dos meus projetos, compartilhando comigo cada instante e sentimentos vividos durante esta fase. Obrigada por fazer parte de minha vida. Obrigada por ser meu amor!

## Resumo

Os chamados cromossomos supranumerários ou B, também denominados de cromossomos extras ou acessórios, são elementos genômicos adicionais e não homólogos aos do complemento A. Alguns estudiosos consideram que os cromossomos B poderiam ter sido originados dos cromossomos do complemento cariotípico e posteriormente seguido sua própria evolução, mas existem também outras hipóteses a respeito disso. A presença desse tipo de cromossomo tem sido descrita em animais e plantas e estes elementos estruturais extras constituem material genético de origem e função geralmente desconhecidas. As mudanças no complemento cariotípico relacionadas à presença dos cromossomos B e a sua distribuição têm sido descritas como participantes dos mecanismos evolutivos em vertebrados. Entre os peixes, principalmente da fauna Neotropical, a presença de cromossomos B apresenta-se de forma expressiva entre as espécies, sendo de grande interesse para estudos sobre sua estrutura, origem e função no processo de diversificação biológica. Estes cromossomos têm um comportamento diferencial, quando submetidos à coloração por bandamento C, geralmente se apresentando total ou parcialmente heterocromáticos e às vezes eucromáticos. Essas características podem ser uma forte evidência da sua provável origem e evolução independente. Portanto, sabendo-se que o entendimento sobre os cromossomos B depende de intensivas análises citogenéticas e moleculares, e com o intuito de entender a natureza dos processos envolvidos na evolução desses cromossomos, no presente trabalho foram analisados cinco populações de *Moenkhausia sanctaefilomenae* e as espécies *Moenkhausia cosmops* e *Moenkhausia oligolepis* pertencentes a diferentes bacias hidrográficas brasileiras. Foram utilizadas em exemplares de *M. sanctaefilomenae*, população do ribeirão Araquá, técnicas citogenéticas básicas (coloração com Giemsa, localização das RONS pela marcação com nitrato de Prata e bandamento C) e moleculares (marcação por fluorocromos base-específicos, hibridação *in situ* fluorescente com sondas de DNAr 18S e 5S), com o intuito de verificar as particularidades pertinentes a distribuição da heterocromatina e também aos cromossomos B, tornando-se um modelo interessante para estudos moleculares posteriores nas outras populações/espécies como a hibridação *in situ* com sondas teloméricas (TTAGGG)<sub>n</sub>, o isolamento de sequências satélites e também a microdissecção, amplificação e hibridação *in situ* com sondas produzidas a partir dos cromossomos B. Todos os exemplares das populações/espécies analisadas apresentaram número diplóide de 50 cromossomos, dos tipos metacêntricos e submetacêntricos, além da ocorrência de cromossomos B nas populações de *M. sanctaefilomenae*. Na população do Araquá, foram identificadas pela Prata, pela CMA<sub>3</sub> e pela sonda de DNAr 18S marcações correspondentes as RONS, além de outras marcações nos cromossomos do complemento A e também nos cromossomos B que não foram marcados com a Prata, o que indicaria a existência de rearranjos ocorridos em relação ao genes ribossomais. O DNAr 5S foi localizado em dois pares cromossômicos na região centromérica e a análise da heterocromatina constitutiva, através do bandamento C, revelou marcações pericentroméricas na maioria dos cromossomos, outras marcações na região centromérica e telomérica dos cromossomos do complemento A, além da presença de

cromossomos B eucromáticos e heterocromáticos. O DNA satélite *MsHinf* isolado do genoma de *M. sanctaefilomenae* do ribeirão Araquá, foi utilizado como sonda para a hibridação *in situ* fluorescente em todos os exemplares das populações/espécies analisadas e revelou marcações nas regiões pericentroméricas na maioria dos cromossomos do complemento A, não evidenciando marcações nos cromossomos B das populações de *M. sanctaefilomenae* e menos dispersas nas espécies *M. cosmops* e *M. oligolepis*, mostrando que essas sequências satélites são compartilhadas, podendo refletir algum papel importante para a manutenção no genoma destas espécies de peixes. Foi produzida uma sonda a partir de cromossomos B heterocromáticos de *M. sanctaefilomenae* do ribeirão Araquá, obtida por microdissecção cromossômica e DOP-PCR, identificada como MsB. Essa sonda evidenciou sinais de hibridação em apenas um cromossomo B da população do ribeirão Araquá, além de outras marcações nos cromossomos do complemento A, mostrando que esse cromossomo B possui homologia com os cromossomos do complemento A, sugerindo uma possível origem intra-específica para esta população. Esta sonda também foi hibridada nas preparações cromossômicas de outras populações/espécies e evidenciou apenas marcações na região pericentroméricas na maioria dos cromossomos do complemento A das populações de *M. sanctaefilomenae* e menos dispersas nas espécies *M. cosmops* e *M. oligolepis*, mostrando também que essas sequências são compartilhadas no genoma destas espécies. Por outro lado, a ausência de marcação nos cromossomos B com a sonda MsB, sugere uma origem independente ou por um outro evento com relação ao ocorrido nos cromossomos B das populações de *M. sanctaefilomenae*. Estudos desta natureza, além de trazerem informações acerca da estruturação do material genético presente nos cromossomos B, fornecem subsídios para o entendimento do processo de diferenciação cromossômica nas espécies de *Moenkhausia* estudadas.

## Abstract

The so-called supernumerary or B chromosomes, also known as extra or accessory chromosomes, are additional genomic elements non-homologous to those from the standard or A complement. Some experts argue that B chromosome would have been derived from the standard karyotype that have undergone their own evolutionary history, but other hypotheses have also been proposed. The occurrence of these chromosomes has been described in both animals and plants but the origin and function of such extra structural elements remains poorly understood. Karyotypical changes related to the presence of B chromosomes and their distribution have been reported as evolutionary mechanisms in vertebrates. Among fish, mainly neotropical ones, B chromosomes are expressively found in many species, justifying their great interest for studies about structure, origin and function during biological diversification processes. These chromosomes have a differential behavior when submitted to C-banding, being entirely or partially heterochromatic or else euchromatic. These features might be a reliable evidence of their probable independent origin and evolution. Therefore, the understanding about B chromosomes depends on intensive cytogenetic and molecular analyses, and in order to comprehend the nature of their evolutionary processes, five populations of *Moenkhausia sanctaefilomenae* and the species *Moenkhausia cosmops* and *Moenkhausia oligolepis* from different Brazilian hydrographic basins were analyzed in the present work. Basic cytogenetic (Giemsa staining, silver-stained NOR location and C-banding) and molecular (base-specific fluorochromes, 18S rDNA and 5S rDNA fluorescent *in situ* hybridization) techniques were applied on specimens of *M. sanctaefilomenae* from Araquá stream, to verify particularities related to heterochromatin distribution and B chromosomes, representing an interesting model for further molecular studies in other populations/species, such as *in situ* hybridization with telomeric probes (TTAGGG)<sub>n</sub>, isolation of satellite sequences and also microdissection, amplification and *in situ* hybridization with probes from B chromosomes. All specimens from analyzed populations/species presented a diploid number of 2n=50 metacentric and submetacentric chromosomes, besides the presence of B chromosomes in populations of *M. sanctaefilomenae*. In population from Araquá stream, NOR marks were identified by both silver nitrate staining and 18S rDNA FISH, besides other marks not stained by silver nitrate, in A and B chromosomes that indicate rearrangements in ribosomal genes. The 5S rDNA was located in two chromosomal pairs at centromeric regions and the analysis of constitutive heterochromatin by C-banding revealed pericentromeric marks in most of chromosomes, some marks at centromeric and telomeric regions of A chromosomes besides the occurrence of euchromatic and heterochromatic B chromosomes. Moreover, the satellite sequence MsHinf isolated from the genome of *M. sanctaefilomenae* from Araquá stream was used as a probe for fluorescent *in situ* hybridization in all specimens from the analyzed populations/species, revealing signals at pericentromeric regions of most of A chromosomes, but not in B chromosomes in populations of *M. sanctaefilomenae* and less dispersed in the species *M. cosmops* and *M. oligolepis*, showing that they share such satellite sequences that can reflect a major role in the genome organization of these fish species. A probe was



obtained from the heterochromatic B chromosome of *M. sanctaefilomenae* from Araquá stream via chromosomal microdissection and DOP-PCR, identified, named MsB. This probe showed hybridization signals in just a B chromosome in the population from Araquá stream, besides other marks on A chromosomes, showing that this B chromosome presents homology with A chromosomes, suggesting a possible intraspecific origin in this population. This probe was also hybridized in other populations/species and revealed only marks at pericentromeric regions in most of A chromosomes in populations of *M. sanctaefilomenae* and less dispersed in the species *M. cosmops* and *M. oligolepis*, showing that this sequence is also shared by these species. On the other hand, B chromosomes not detected by MsB probe suggest a possible independent origin or another event occurred in B chromosomes from populations of *M. sanctaefilomenae*. Studies like this, besides bringing information about the structure of the genetic material in the B chromosomes, provide subsidies for our understanding about the chromosomal differentiation in the studied *Moenkhausia* species.

## Sumário

<b>1. Introdução</b> .....	01
1.1 Cromossomos Supranumerários .....	02
1.2 Cromossomos Supranumerários em peixes neotropicais.....	05
1.3 Estudos citogenéticos em peixes e a citogenética molecular.....	08
1.4 DNAs satélites.....	11
<b>2. Objetivos</b> .....	15
<b>3. Materiais e Métodos</b> .....	17
3.1 Materiais.....	17
3.2 Metodologia.....	18
3.2.1 Estimulação de mitoses .....	18
3.2.2 Obtenção de cromossomos mitóticos através de preparações diretas.....	19
3.2.3 Detecção da heterocromatina constitutiva (Banda C).....	20
3.2.4 Detecção das regiões organizadoras de nucléolos (NORs), através da impregnação com nitrato de prata .....	20
3.2.5 Coloração com fluorocromo base-específico Cromomicina CMA <sub>3</sub> .....	21
3.2.6 Análise das preparações cromossômicas .....	21
3.2.7 Extração de DNA genômico de tecidos sólidos.....	22
3.2.8 Visualização e quantificação do DNA em gel de agarose.....	22
3.2.9 Isolamento de sequências repetidas por digestão enzimática.....	23
3.3 Purificação dos fragmentos de DNA presente no gel de agarose.....	24
3.3.1 Clonagem do DNA repetitivo .....	25
3.3.2 Crescimento e estocagem dos clones recombinantes .....	25
3.3.3 <i>Direct colony PCR screening</i> .....	26
3.3.4 Transferência de DNA total de gel de agarose para a membrana de nylon- <i>Southern Blotting</i> .....	27
3.3.5 Hibridação de DNA imobilizado em membrana.....	28
3.3.6 Reação de Sequenciamento.....	29
3.3.7 Limpeza da Reação de Sequenciamento .....	30
3.3.8 Sequenciamento .....	30
3.3.9 Tríplex Coloração CMA <sub>3</sub> /DA/DAPI.....	30

3.4 Obtenção de sonda cromossômica por microdissecção.....	31
3.4.1 DOP-PCR (Degenerate Oligonucleotid Primer) .....	32
3.4.2 Primeira PCR .....	32
3.4.3 Segunda PCR .....	33
3.4.4 PCR de marcação .....	34
3.4.5 Preparação da sonda telomérica .....	35
3.4.6 Preparação das sondas de DNAr 18S e 5S .....	36
3.4.7 Hibridação <i>in situ</i> fluorescente.....	37
3.4.8 Análises cariotípicas.....	39
<b>4. Resultados e Discussão.....</b>	<b>40</b>
<b>4.1. Capítulo 1:</b> Estrutura cromossômica e mapeamento físico dos genes ribossomais 18S e 5S em <i>Moenkhausia sanctaefilomenae</i> (Teleostei, Characiformes, Characidae).....	<b>41</b>
<b>4.2. Capítulo 2:</b> Distribuição das sequências teloméricas (TTAGGG) <sub>n</sub> em três espécies do gênero <i>Moenkhausia</i> (Teleostei, Characiformes, Characidae).....	<b>57</b>
<b>4.3. Capítulo 3:</b> Isolamento e caracterização de sequências satélites em <i>Moenkhausia sanctaefilomenae</i> (Teleostei, Characiformes, Characidae).....	<b>68</b>
<b>4.4. Capítulo 4:</b> Microdissecção cromossômica e pintura total (WCP) nos cromossomos B de <i>Moenkhausia sanctaefilomenae</i> (Teleostei, Characiformes, Characidae).....	<b>84</b>
<b>Considerações finais.....</b>	<b>105</b>
<b>Referências Bibliográficas.....</b>	<b>108</b>

## 1. Introdução

Na região Neotropical a ordem mais importante em número de espécies de peixes é representada pelos Characiformes (Artoni *et al.*, 2000), um grupo ecologicamente e morfologicamente diversificado que apresenta um padrão evolutivo e biogeográfico complexo (Orti & Meyer, 1997). Dentre os Characiformes, a família Characidae apresenta-se como um grupo taxonomicamente confuso, principalmente devido à dificuldade de se estabelecer grupos que realmente tenham uma origem monofilética, diferentemente do que ocorrem com outros Characiformes como os Anostominae, Curimatidae, Prochilodontidae e Chilodontidae (Vari, 1983). Recentemente foi proposto que um grupo de Characidae, a subfamília Tetragonopterinae, seja representada apenas pelo gênero *Tetragonopterus* (Reis, 2003). No entanto, os demais gêneros foram listados como *Incertae Sedis* em Characidae (Lima *et al.*, 2003) entre eles, *Moenkhausia*. Apesar dos dados citogenéticos serem relativamente numerosos para esta subfamília, uma característica que se destaca nas espécies do gênero *Moenkhausia* é a variação do número diplóide entre  $2n=48$  e  $2n=50$ , além de variações interespecíficas quanto à presença ou ausência de cromossomos B (Foresti *et al.*, 1989). Esses cromossomos são caracterizados através do bandamento C na maioria das espécies de peixes como fortemente heterocromáticos (Pauls & Bertollo, 1990; Salvador & Moreira-Filho, 1992; Vênere, Miyazawa & Galetti Jr, 1999), podendo, entretanto, apresentarem-se eucromáticos (Oliveira & Foresti, 1993; Vênere, Miyazawa & Galetti Jr, 1999; Vissoto, Foresti e Oliveira, 1999), ou parcialmente heterocromático (Hochberg & Erdtmann, 1988; Fenocchio & Bertollo, 1990). Entre as espécies deste gênero, existem informações cromossômicas disponíveis para *M. pittieri* (Post, 1965; Scheel, 1973); *M. sanctaefilomenae* (Foresti *et al.*, 1989, Portela-Castro, 1999; Dantas *et al.*, 2007; Sobrinho-Scudeler *et al* in prep); *M. intermedia* (Portela-Castro, 1999); *M. costae* (Portela *et al.*, 1988; Pfister, 1997; Portela-Castro, 1999); *M. dichoura* (Miyazawa, 1997) e *M. gracilima* (Santos, 1999).

O gênero *Moenkhausia* é considerado um dos mais especiosos, com 58 espécies distribuídas nas redes hidrográficas da América do Sul e com um grande número de espécies ocorrendo na bacia Amazônica e nas Guianas (Benine, 2002). Este gênero é constituído por dois grupos, *Lepidura* e *Grandisquamis*, tendo como base de identificação o tamanho e a forma do corpo, dentre outras características. O primeiro inclui espécies de pequeno porte e que apresentam o corpo alongado e nele estão

incluídas as espécies *Moenkhausia intermedia*, *M. gracilima*, *M. dichoura*. No segundo grupo estão incluídas as espécies de maior porte, com altura do corpo mais elevada, como as espécies *Moenkhausia sanctaefilomenae* e *M. costae* (Gery, 1977).

No entanto, entre os representantes do gênero *Moenkhausia* o número diplóide mais frequente é  $2n=50$  cromossomos, com um número fundamental variável, ou seja, número de braços entre 88 e 100. Embora diversas espécies possuam cariótipos simétricos entre si, algumas divergências são apresentadas podendo ser citadas como exemplos citótipos com  $2n=49$  cromossomos em *Moenkhausia pittieri* e  $2n=48$  cromossomos no citótipo B de *Moenkhausia gracilima* (Portela-Castro, 2002). De acordo com Arefjev (1990), os dados obtidos em *M. Pittieri* mostraram heterogeneidade no gênero, sendo, portanto, evidências contra a proposição da ocorrência de um conservadorismo restrito sugerido para o gênero *Moenkhausia*. Dados citogenéticos mostram que estudos no gênero *Moenkhausia* indicam diferentes tendências na diversificação cariotípica durante o processo de evolução para este gênero.

Portanto, sabendo-se que os peixes são modelos interessantes para os estudos evolutivos, este trabalho tem como proposta o estudo de populações de *Moenkhausia sanctaefilomenae*, *M. cosmops* e *M. oligolepis*, assim como as particularidades pertinentes aos cromossomos supranumerários. Considera-se que esses novos dados poderão contribuir com informações que auxiliarão um melhor entendimento da estrutura genômica desses peixes, assim como os possíveis eventos envolvidos no processo de diferenciação cromossômica na evolução cariotípica deste gênero.

### **1.1 Cromossomos Supranumerários**

Os chamados cromossomos supranumerários ou B, também denominados de cromossomos extras ou acessórios, são elementos genômicos adicionais e não homólogos aos do complemento A. Em alguns indivíduos e em algumas populações, os cromossomos B parecem não portar elementos essenciais ao crescimento, desenvolvimento e reprodução dos organismos, sendo provavelmente originados dos cromossomos A e seguindo posteriormente sua própria evolução (Camacho, 1993).

As primeiras descrições sobre a ocorrência de cromossomos supranumerários foram feitas por Wilson (1907), que verificou a presença de cromossomos extras no complemento cariotípico de insetos. Randolph, em (1928), foi o primeiro a propor o termo cromossomo B para designar cromossomos adicionais àqueles considerados de ocorrência

comum, componentes do complemento A (Jones, 1975). A utilização do termo cromossomo B é recomendado para casos em que os cromossomos supranumerários apresentam uma frequência elevada dentro da população (Jones e Rees, 1982). Dentre outras características, existem mecanismos capazes de controlar o número de cromossomos B em determinados órgãos do indivíduo ou de favorecer a sua transmissão gamética, podendo, assim, apresentar alguma importância para as espécies, sem, contudo, serem portadores de genes que possam determinar alterações fenotípicas. Os cromossomos B podem, de outro modo, interferir em características críticas para as espécies, como no processo de pareamento de homólogos do complemento A, podendo influenciar na frequência de quiasmas ou na viabilidade e fertilidade dos gametas, ou ainda, aumentar o limite de transcrição de genes para RNAr. Nesses casos, considera-se que tais cromossomos poderiam conferir uma vantagem adaptativa para a espécie (Guerra, 1988).

Existe grande polêmica quanto à origem e evolução deste tipo de cromossomo. White (1973) propôs que os cromossomos supranumerários teriam sua origem a partir de fragmentos heterocromáticos portadores de centrômero e sua forma atual seria decorrente de rearranjos cromossômicos ocorridos posteriormente. Por outro lado, Volubujev (1981) propôs que os cromossomos B seriam produto da não-disjunção de cromossomos autossomos ou sexuais, seguida de processo de inativação genética por heterocromatinização destes segmentos.

De acordo com Beukeboom (1994), os cromossomos B possuem uma evolução paralela às dos cromossomos do complemento A. Estes elementos sofreriam então algumas alterações, tornando-se diferentes dentro do genoma de seus portadores. Tais alterações poderiam ser a causa da não homologia com os demais cromossomos do complemento. López-Léon *et al.* (1994) demonstraram que os cromossomos supranumerários interferem na atividade normal do DNA ribossômico, tendo sido verificado pelos autores a ocorrência de inativação de cístrons ribossomais em células de centeio, enquanto que em *Euprepocnemis plorans* (gafanhoto) foi observada a ocorrência de modificação no padrão de atividade das regiões organizadoras de nucléolos (RONs), quando detectada a presença desses cromossomos. White (1973) propôs dois modelos básicos para explicar a manutenção da frequência de cromossomos B em populações naturais; o chamado modelo heterótico, segundo o qual os cromossomos B seriam mantidos devido à vantagem adaptativa que conferem aos seus portadores, quando encontrados em número reduzido. Essa vantagem seletiva seria compensada pela perda, através da seleção natural, de indivíduos portadores de elevado número de cromossomos

B; e o modelo parasítico, pelo qual estes elementos conservam-se na população graças aos seus próprios meios de acumulação. Sob essa visão, esses cromossomos seriam considerados parasitas ou egoístas, já que sua presença na população parece não trazer nenhum tipo de vantagem para seu portador.

Como características gerais destes cromossomos alguns autores apontam para a existência de diferentes comportamentos em relação à sua ocorrência e papel nos organismos. Camacho (1993) diz que a distribuição geográfica dos indivíduos portadores de cromossomos B pode estar relacionada a fatores ecológicos e históricos. Contudo, apesar da grande distribuição dos cromossomos B entre os indivíduos de certas populações e espécies, são poucas as informações sobre o seu papel entre os organismos portadores. Para Volubujev (1981), em relação ao padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva, os cromossomos B podem ser totalmente, ou em grande parte, compostos por heterocromatina, caracterizados por processo de replicação tardia. Assim, os cromossomos B seriam replicados na segunda metade da fase S ou no final desta, durante o ciclo celular.

Por outro lado, Foresti (1998) propõe uma hipótese alternativa para a origem dos B, segundo a qual sequências de nucleotídeos presentes no núcleo das células seriam formadas continuamente pela associação ao acaso de unidades ou pela polimerização a partir de *primers* de RNA retroduplicados. A formação ao acaso de sequências centroméricas e teloméricas poderia proporcionar estabilidade a estes fragmentos, possibilitando a segregação destes elementos genômicos juntamente com os cromossomos do complemento A e permitindo a formação e manutenção dessas estruturas no genoma. A adição posterior de elementos genômicos saltatórios, como transposons, poderia conferir importância biológica definida a estes fragmentos de DNA.

Estudos do comportamento meiótico dos supranumerários também parecem indicar que os cromossomos B poderiam ter sua origem como isocromossomos. Análises ultraestruturais de sinapses de cromossomos B durante a prófase I da meiose fornecem informações de uma organização cromossômica geral. Segundo Khazanehdari e Jones (1996), uma considerável proporção de cromossomos B com centrômeros de posição mediana, nos quais o comportamento meiótico tem sido investigado, seriam isocromossomos ou derivados deles. Esta característica é encontrada em *Allium porrum*, onde os autores acima observaram pareamento dos braços do cromossomo B no paquíteno. Análises de complexo sinaptonêmico em *Astyanax scabripinnis* evidenciaram a ocorrência de 25 bivalentes que correspondem aos elementos do complemento padrão, além de um elemento extranumerário de tamanho grande (macrochromossomo B), que pode apresentar-

se como univalente ou formar figuras de auto-emparelhamento entre os braços longo e curto (Dias, 1994; Mestriner *et al.*, 2000).

Uma colocação permitida é a de que os cromossomos supranumerários não teriam um modelo de origem único, mas ao contrário, poderiam ter diferentes origens. De acordo com Camacho *et al.* (2000), embora muitas hipóteses apresentadas a respeito da origem dos cromossomos B sejam tratadas com segurança, indicando sua origem a partir de elementos do grupo A, ou de cromossomos sexuais, ou ainda a partir de elementos resultantes do cruzamento entre espécies relacionadas, parece ainda difícil determinar com exatidão o “DNA progenitor” desses elementos. Assim, o entendimento sobre os cromossomos B depende de estudos moleculares intensivos e da habilidade de se entender a rapidez e a natureza dos processos moleculares envolvidos na evolução dos cromossomos.

## 1.2 Cromossomos Supranumerários em Peixes Neotropicais

Uma das primeiras descrições de supranumerários com características pertinentes a cromossomos B em espécies de peixes da região Neotropical refere-se aos cromossomos adicionais encontrados em *Prochilodus lineatus* (cit. como *P. scrofa*) por Pauls e Bertollo (1983). A partir desse caso, muitos outros trabalhos têm descrito a ocorrência de cromossomos supranumerários em representantes de diferentes famílias de Characiformes (revisão em Carvalho *et al.*, 2008), entre elas Anostomidae (Vênere *et al.*, 1999), Characidae (Salvador e Moreira-Filho, 1992; Neo *et al.*, 2000; Moreira-Filho *et al.*, 2001; Ferro *et al.*, 2003; Dantas *et al.*, 2007; Sobrinho-Scudeler *et al.*, in prep.), Crenuchidae (Maistro *et al.*, 2001; Pansonato Alves *et al.*, 2010), Curimatidae (Vênere e Galetti Jr., 1985; Oliveira e Foresti, 1993; Vênere *et al.*, 1999; De Rosa *et al.*, 2008), Parodontidae (Falcão *et al.*, 1984), Prochilodontidae (Pauls e Bertollo, 1983; Maistro *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2003).

A ocorrência de cromossomos B dentro de uma população pode ser esporádica ou, como comumente demonstrada para muitas espécies, pode mostrar uma alta frequência entre os indivíduos. É possível encontrar também variações em relação à morfologia, tamanho e números desses supranumerários. Cromossomos B de pequeno tamanho têm sido evidenciados em diversas espécies de *Prochilodus*, embora sua frequência seja distinta entre as espécies e/ou populações até agora analisadas (Pauls e Bertollo, 1983; Pauls e Bertollo, 1990; Cavallaro *et al.*, 2000; Maistro *et al.*, 2000; Oliveira *et al.*, 2003).



Cromossomos B de tamanho bem menor do que o menor cromossomo do complemento A, foram descritos em *Prochilodus lineatus* (cit. como *P. scrofa*). Pauls e Bertollo (1983) descreveram nesta espécie a ocorrência de até 5 microcromossomos adicionais, que variavam inter e intraindividualmente. Pequenas variações quanto ao tamanho e à morfologia dos cromossomos B também puderam ser evidenciadas. Esse fato levou os autores a suspeitarem da ocorrência de mais de uma categoria de cromossomos B nessa espécie. Vênere *et al.* (1999) descreveram uma nova ocorrência de cromossomos B no gênero *Prochilodus*; em *P. Nigrans* do rio Araguaia, um entre três exemplares analisados mostrou a presença de 2 microcromossomos supranumerários, os quais apresentaram-se totalmente heterocromáticos após a aplicação da técnica de bandamento C.

Estudando o mecanismo de herança dos cromossomos B em *P. lineatus*, Oliveira *et al.* (1997) detectaram um aumento da frequência dos supranumerários na população do rio Mogi-Guaçu, que apresentou até 7 cromossomos adicionais. Nesse estudo, a quantidade de células com diferentes números de cromossomos B para cada indivíduo foi pequena, indicando um baixo grau de instabilidade mitótica para esses cromossomos, em contraste com a alta instabilidade mitótica encontrada anteriormente por Pauls e Bertollo (1983), analisando exemplares capturados no mesmo local.

Dentro da família Characidae também foram observados microcromossomos B em *Moenkhausia sanctaefilomenae*, que apresentaram variação inter e intraindividual. Nesta espécie, Foresti *et al.* (1989) relataram a presença de 1 a 8 microcromossomos B; Portela-Castro (2001) descreve a presença de até 2 microcromossomos em indivíduos do rio Paraná; Dantas *et al.* (2007) encontraram até 6 microcromossomos B e (Sobrinho-Scudeler *et al.*, in prep) verificaram a presença de até 9 microcromossomos B em exemplares capturados em tributários da Bacia do rio Tietê. A alta frequência dos microcromossomos B em *Moenkhausia sanctaefilomenae* sugere uma independência destes elementos quanto ao número e distribuição, o que poderia representar seu papel na história evolutiva deste grupo (Portela-Castro, 2001).

Um aspecto interessante a ser considerado refere-se à constância de certos valores de frequência dos microcromossomos B nas células de indivíduos de *Moenkhausia sanctaefilomenae*. (Sobrinho-Scudeler *et al.*, in prep) refere-se à tendência verificada em relação a frequência de 2 e 3 microcromossomos B por célula, valores estes considerados modais nos indivíduos das populações analisadas. Oliveira *et al.* (1997), comentando sobre este aspecto também verificado em *Prochilodus lineatus*, colocam que esta tendência

poderia estar representando um efeito adaptativo controlador de um número ideal de cromossomos B nas células desta espécie. É interessante observar que os microcromossomos B de *Moenkhausia sanctaefilomenae* mostram-se diferencialmente corados quando submetidos ao bandamento C, para a detecção da heterocromatina constitutiva. Estes cromossomos apresentam-se geralmente heterocromáticos, se não totalmente, pelo menos em parte ou ainda totalmente eucromáticos (Foresti *et al.*, 1989; Dantas *et al.*, 2007, Sobrinho-Scudeler *et al.*, in prep) nesta espécie.

Embora a maior parte dos supranumerários seja usualmente de tamanho pequeno, como aqueles encontrados em *Bergiaria wetermanni* da família Pimelodidae (Dias e Foresti, 1993), cromossomos B de tamanho médio como observado em *Rhandia hilarii* (Fenocchio e Bertollo, 1990; Fenocchio *et al.*, 2000; Maistro *et al.*, 2002) ou cromossomos B de tamanho grande observados em *Astyanax scabripinnis* também têm sido descritos (Salvador e Moreira-Filho, 1992; Neo *et al.*, 2000a, Ferro *et al.*, 2003; entre outros).

Macrochromossomos B têm sido descritos na família Characidae, ocorrendo com frequência em *Astyanax scabripinnis* e tem sido verificada sua ocorrência em diferentes populações estudadas. Salvador e Moreira-Filho (1992) estudaram uma população de Campos do Jordão (SP) e verificaram a ocorrência de 1-2 macrochromossomos B metacêntricos em exemplares de ambos os sexos. Porto Foresti *et al.* (1997) e Neo *et al.* (2000), encontraram diferenças com relação à forma, tamanho e frequência dos cromossomos B, que possibilitaram supor combinações teoricamente esperadas nas populações, de acordo com a altitude do habitat. Entretanto, a presença destes cromossomos também já foi relacionada em indivíduos de apenas um dos sexos (Rocon-Stange & Almeida-Toledo, 1993; Mizoguchi & Martins-Santos, 1997).

A ocorrência de cromossomos B em peixes evidencia a importância dos estudos que envolvem esses elementos, com o objetivo de melhor compreender sua origem, os processos envolvidos em sua fixação nas diferentes populações, assim como o seu papel dentro do genoma desses vertebrados. As respostas para o entendimento da origem desses cromossomos em peixes têm sido buscadas a partir de cromossomos do complemento A ou de eventos citológicos determinantes para a formação destes elementos genômicos. Deste modo, a espécie *Moenkhausia sanctaefilomenae* apresenta algumas peculiaridades associadas aos microcromossomos B que poderiam ser estudadas por técnicas de citogenética molecular mais resolutivas, como a microdissecção cromossômica, DNA satélite e FISH. A aplicação de tais metodologias poderia resultar em informações de

grande importância para o melhor entendimento da origem e dinâmica desse tipo de cromossomo.

### 1.3 Estudos Citogenéticos em Peixes e a Citogenética Molecular

Nos últimos 25 anos, o aumento expressivo dos trabalhos desenvolvidos em peixes e o crescente interesse relacionado à estrutura e composição cromossômica dos representantes deste grupo, fez com que a citogenética clássica e molecular passassem por importantes avanços. Técnicas para obtenção de cromossomos mitóticos, como as de Bertollo *et al.* (1978) e Foresti *et al.* (1981, 1993), impulsionaram a realização de muitos trabalhos da ictiofauna neotropical.

O aperfeiçoamento das técnicas para obtenção de cromossomos mitóticos possibilitou a implementação de novas metodologias de bandamento cromossômico, que possibilitaram uma identificação precisa de alterações cromossômicas numéricas e estruturais, da heterocromatina e as possíveis relações evolutivas existentes entre as espécies. Além disso, outras informações puderam ser obtidas com bandamentos para identificação de regiões eucromáticas - Banda-G, Bertollo *et al.* (1997) e heterocromáticas – Banda-C, Sumner (1972); Cromomicina CMA<sub>3</sub>, Schmid (1980); HSS (hot saline solution), Artoni *et al.* (1999); regiões organizadoras de nucléolos (impregnação por nitrato de prata – RON), Howell e Black (1980).

Na década de 70, o uso das técnicas de bandamento cromossômico representou um marco para a citogenética de mamíferos e outros vertebrados, possibilitando uma identificação mais clara de cada cromossomo, através da detecção de regiões específicas de heterocromatina constitutiva e das regiões organizadoras de nucléolos (RON). Em seguida, foram desenvolvidos e adaptados procedimentos para coloração com fluorocromos base-específicos, bandas de alta resolução e bandas de replicação dependente do uso de análogos de bases incorporados ao DNA durante o ciclo celular (Speicher & Carter, 2005).

A aplicação de fluorocromos se mostrou bastante útil, uma vez que essas substâncias se ligam preferencialmente às seqüências de bases AT (como por exemplo, os fluorocromos Hoechst 33258, DAPI, entre outros) ou GC (como Cromomicina A<sub>3</sub>, Mitramicina, etc.), revelando características composicionais dos blocos heterocromáticos (Rocchi, 1992). Em 1976, Schweizer iniciou o emprego de contra-corantes aliados a fluorocromos para propiciar um maior contraste das bandas produzidas. Nos vertebrados

inferiores, especialmente em peixes e anfíbios, o uso combinado desses fluorocromos revelou informações interessantes sobre a estrutura das regiões de heterocromatina. Segundo Rocchi, (1992), os diferentes padrões de coloração causados por cada fluorocromo na heterocromatina demonstram uma heterogeneidade dessas áreas, embora não necessariamente impliquem em funções diferenciadas nas células.

Uma importante ferramenta da citogenética molecular é caracterizada pelas sequências de DNA altamente repetitivo que estão dispersas no genoma, ou então organizadas em “tandem”, formando segmentos definidos e característicos, denominados DNA satélite (Jesus *et al.*, 2003). Embora a organização estrutural do DNA satélite seja relativamente bem conhecida, sua função, assim como sua regulação gênica, permanecem ainda pouco esclarecidas (Huang *et al.*, 1993).

De acordo com Abuin *et al.* (1996), a informação a respeito da caracterização molecular e da localização cromossômica de unidades repetitivas é essencial no entendimento do possível papel dessas sequências na organização estrutural dos cromossomos, assim como um maior esclarecimento nos processos envolvidos na evolução cariotípica.

Sendo assim, a citogenética molecular passou a utilizar técnicas de manipulação do material genético associadas à detecção de sequências específicas de DNA. Além disso, os fragmentos de moléculas de DNA puderam ser clonados e sequenciados. Entre os avanços metodológicos apresentados na área da pesquisa citogenética, destacar-se a utilização de sondas cromossomo-específicas associadas às técnicas de hibridação *in situ* fluorescente – FISH (Speicher & Carter, 2005).

Na técnica de FISH, uma sonda de DNA marcada é hibridada sobre alvos citológicos (cromossomos metafásicos, núcleos interfásicos, fibras de cromatina estendidas, etc). Mais recentemente, novas metodologias de FISH tem possibilitado a utilização simultânea de diversas sondas marcadas com diferentes fluorocromos, sendo que algumas destas já tem sido empregadas em vários grupos biológicos. Pieczarca *et al.* (2005) utilizou M-FISH (multiplex-FISH) em estudos evolutivos em famílias de Phyllostomidae (Chiroptera). Além desse caso, Speicher & Carter, (2005) descrevem a utilização do SKY (Spectral Karyotyping) e COBRA (Combined Binary Ratio Labelling), na identificação mais refinadas de aberrações cromossômicos, no genoma humano. Em todos estes casos, as diferentes sondas podem ser hibridadas simultaneamente no genoma do organismo em estudo, caracterizando com maior

precisão, eventos de alteração ou evolução do cariótipo. No caso dos peixes especificamente, essas técnicas apenas recentemente têm sido utilizadas.

A preparação de uma sonda para FISH, independentemente da sua natureza composicional, é um processo que envolve vários passos. As sondas de regiões cromossômicas específicas ou de cromossomos inteiros podem ser produzidas por microdissecção, seguida por reação de amplificação independente da sequência via PCR. A obtenção de sondas cromossômicas por microdissecção tornou-se viável graças ao desenvolvimento de primers universais que permitem a amplificação por PCR de grandes regiões de DNA (DOP-PCR ou DNA Degenenerate oligonucleotide- Primed) (Kao, 1990, Meltzer *et al.*, 1992, Phillips & Reed, 1996). Após a amplificação, o DNA é marcado, funcionando como uma sonda de FISH.

A microdissecção já vinha sendo aplicada principalmente em citogenética humana e em outros grupos de mamíferos, como no caso dos macacos (Taguchi *et al.*, 2003), em roedores (Marchal *et al.*, 2004), em lagartos (Ezaz *et al.*, 2005), etc. Phillips *et al.* (2001), aplicaram essa metodologia no grupo dos peixes, mostrando que os cromossomos sexuais entre diferentes gêneros de Salmonidae parecem evoluir de forma independente. Neste caso duas sondas específicas, a sonda (Yp), obtida a partir do braço curto e a sonda (Yq), obtida a partir do braço longo do cromossomo Y de *Salvelinus namaycush*, foram hibridadas nos cromossomos de *Oncorhynchus mykiss* e *O. tshawytscha*. As sondas foram conjuntamente hibridadas nos cromossomos dessas espécies, evidenciando sinais de hibridação em dois diferentes pares de autossomos, em cada uma delas, evidenciando ausência de homologia entre os cromossomos sexuais no gênero *Salvelinus* e *Oncorhynchus*.

Mais recentemente no grupo dos peixes neotropicais, Diniz *et al.* (2008) obteve uma sonda específica do cromossomo Z, de *T. nematurus*, através de microdissecção. Essa sonda foi utilizada para pintura cromossômica total (WCP - Whole Chromosome Painting) por FISH, em várias espécies de *Triporthus*, assim como em espécies de outros gêneros de Characidae relativamente próximos de *Triporthus*, com o objetivo de analisar o processo evolutivo do sistema ZW no grupo. Henning *et al.* (2008) utilizaram esta metodologia na preparação de sondas cromossômicas em *Eigenmannia*, que foram utilizadas na identificação de cromossomos específicos do complemento normal A e do cromossomo X nas espécies do grupo. Atualmente outros trabalhos neste âmbito vêm sendo desenvolvidos como exemplo os cromossomos Bs de *Moenkausia sanctafilomenae* (Sobrinho-Scudeler, presente trabalho), *Corydoras aeneus*

(Shimabukuro-Dias, com. Pessoal) e em espécies de *Characidium* (Pansonato-Alves *et al.*, in prep). Essa ferramenta inova a metodologia de FISH no grupo dos peixes, uma vez que a mesma pode auxiliar na elucidação de mecanismos de evolução cromossômica em grupos de vertebrados, envolvendo polimorfismos cromossômicos (Diniz & Bertollo, 2003, Vicari *et al.*, 2006), composição e origem de cromossomos B (Ziegler *et al.*, 2003, Jesus & Moreira-Filho, 2003), detecção de regiões sexo-específicas ou mesmo de loco(s) determinante(s) do sexo (Phillips *et al.*, 2001, Devlin *et al.*, 2002, Diniz *et al.*, 2008). Portanto, a incorporação dessas metodologias nos estudos cromossômicos mostra-se bastante promissora, uma vez que possibilita uma abordagem evolutiva mais precisa e um conhecimento mais refinado da estrutura molecular dos cromossomos, permitindo um melhor entendimento das relações existentes entre espécies e populações.

#### 1.4 DNAs Satélites

Atualmente, o termo DNA satélite é usado para descrever sequências de DNA altamente repetitivas. Por definição, esse tipo de DNA compreende segmentos nucleotídicos de diferentes tamanhos que podem variar de 100 a 300 pb (pares de bases) e se repetem de dezenas a milhares de vezes no genoma (organizado em tandem), em geral não é um DNA codificador (Griffiths *et al.*, 2001).

Tem-se demonstrado que as sequências repetidas são importantes na organização estrutural e variação do tamanho dos genomas (Schueler *et al.*, 2001), envolvendo-se em rearranjos cromossômicos como deleções, duplicações, inversões e translocações, responsáveis por grande parte da variação cariotípica de muitos grupos (Kidwell, 2002). Entretanto, o papel mais importante dessas sequências relaciona-se à manutenção e segregação do material nuclear, o que se infere, sobretudo em função de sua presença nos centrômeros e telômeros dos cromossomos de eucariotos.

As sequências repetidas presentes na heterocromatina centromérica desempenham um papel fundamental no comportamento dos cromossomos durante a divisão celular, devido a várias proteínas que se ligam por afinidade a estas sequências (Csink e Henikoff, 1998). Além disso, a eucromatina, rica em genes, também pode conter algumas sequências repetidas. No entanto, sequências repetidas parecem causar mutações prejudiciais aos genes, sendo eventualmente eliminadas pela pressão seletiva (Deininger *et al.*, 2003). Portanto, vários estudos têm sugerido o envolvimento de sequências repetidas nos processos de replicação do DNA (Li *et al.*, 2002),

recombinação (Biet *et al.*, 1999), expressão gênica (Liu *et al.*, 2001) e diferenciação de cromossomos sexuais (Galetti Jr e Foresti, 1986, Parise-Maltempi *et al.*, 2007).

Através da técnica de hibridação *in situ* conjugada a outros procedimentos, é possível observar que os DNAs satélites estão localizados especificamente nas regiões heterocromáticas dos cromossomos. Existem vários exemplos em que a distribuição de DNAs satélites coincide com o padrão de bandas C, correspondente à heterocromatina constitutiva dos cromossomos. Este fato sugere que os DNAs satélites são um importante componente da heterocromatina, senão o principal (Miklos, 1985; Lohe *et al.*, 1993; Lohe e Hilliker, 1995).

Clivagens do DNA genômico com endonucleases evidenciam as sequências de DNA altamente repetitivo que, quase sempre possuem sítios de restrição também repetidos. Assim, clivagens com endonucleases geram vários fragmentos de DNA de mesmo tamanho, os quais podem ser vistos em géis de agarose ou poliacrilamida submetidos à eletroforese. Quando essas sequências são dispostas em tandem, a clivagem com endonucleases pode gerar fragmentos de tamanhos múltiplos entre si, o chamado padrão escada. Isso ocorre quando algumas das cópias em tandem sofreram mutações que lavaram a perda de sítios de restrição para a referida endonuclease (Bachmann *et al.*, 1993). Quando milhares de cópias (ou unidades de repetição) são encontradas arranjadas em tandem, formando extensas cadeias homogêneas ao longo de um ou mais cromossomos, diz-se que estas cópias fazem parte de uma mesma família de DNA satélite.

A localização cromossômica dos DNAs satélites é muito importante, na medida em que identifica fisicamente regiões específicas dos cromossomos, sugerindo um papel funcional e estrutural dessas regiões. Em revisão da literatura, verifica-se que cópias de uma mesma família de DNA satélite podem ser encontradas em apenas um cromossomo, em vários cromossomos ou em todos os cromossomos do cariótipo de uma determinada espécie. Existem também exemplos de DNA satélite encontrados em cromossomos B (Gutknecht *et al.*, 1995; Mestriner *et al.*, 2000; Jesus *et al.*, 2003) e em cromossomos sexuais (Nakayama *et al.*, 1994; Matsuda *et al.*, 1997; Devlin *et al.*, 1998; Vicente *et al.*, 2003).

Adicionalmente, a localização de DNAs satélites auxilia na construção de mapas genômicos das espécies analisadas. Recentemente, Martins *et al.* (2004), obtiveram o mapeamento físico do genoma de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com o auxílio da hibridação de fragmentos repetitivos de DNA no cariótipo, trazendo

importantes informações de valor econômico e científico, acerca da estrutura e evolução do genoma dessa espécie visto que os ciclídeos, família a qual pertence, tiveram uma rápida e extensiva radiação evolutiva.

De modo geral, o estudo das sequências satélites do DNA, efetuadas por meio de diferentes técnicas e abordagens, tem apresentado uma gama de informações que tem auxiliado no entendimento do papel evolutivo e estrutural dessa porção representativa do genoma de eucariontes. Diferentes aspectos já foram extensivamente abordados por inúmeros autores. Em peixes, entretanto, ainda é pequeno o número de informações que se tem a respeito da organização molecular dessa fração do genoma e de sua localização cromossômica. No entanto, já se pode notar que as sequências satélites identificadas até o momento encontram-se localizadas principalmente na região centromérica dos cromossomos e, como mostrado para outros organismos, devem desempenhar papel importante na estrutura e função do centrômero nos peixes (Galetti e Martins, 2004).

Alguns grupos de peixes já tiveram seu DNA satélite mapeado resultando em descobertas interessantes como no caso de estudos realizados em *Cyprinus carpio* por Datta *et al.* (1988) foram os primeiros autores a clonar e sequenciar um DNA satélite neste grupo. Em outro estudo, duas sequências de DNA satélite de tilápia *Oreochromis niloticus*, foram clonadas e sequenciadas. O primeiro satélite denominado SATA (de aproximadamente 237pb) está presente no genoma de vários ciclídeos africanos, com um número de cópias variando de 0,1 a  $5,4 \times 10^5$  (Wright, 1989, Franck *et al.*, 1992). Essa sequência foi utilizada para inferência das relações filogenéticas entre os três principais gêneros da tribo *tilapiini* (Franck *et al.*, 1994). O satélite denominado SATB, ainda que não tão abundante com o SATA, é também uma sequência altamente repetida ( $1-10 \times 10^3$  cópias), com 1.900pb, estando presente no genoma da tilápia e de outras espécies intimamente relacionadas da tribo *Haplochromiini*, mas não no genoma de outros ciclídeos africanos ou Neotropicais (Franck e Wright, 1993).

Vicente *et al.* (2003) isolaram duas sequências de DNAs satélites em *Parodon hilarii*, um monômero de 200pb e um dímero de 400pb, que perdeu o sítio de restrição para a enzima *EcoRI*. A aplicação da técnica de FISH mostrou que a localização desses DNAs repetitivos coincide com regiões heterocromáticas terminais de alguns cromossomos, mas que nem toda heterocromatina observada no cariótipo desta espécie é marcada, o que indica a existência de pelo menos outra família de DNA satélite presente nessa espécie.



A localização cromossômica de duas sondas, H1 e A5, obtidas de *Centropomus mexicanus*, mostrou que ambas participam da formação da heterocromatina constitutiva observada na região pericentromérica de todos os cromossomos. O sequenciamento dessas duas sondas revelou ainda que elas pertencem a uma mesma família satélite, pois compartilham uma região de 310pb. A aplicação da técnica de FISH nos núcleos interfásicos permitiu também a observação do comportamento dos cromossomos durante a interfase. Eles apresentam a tendência de se organizarem preferencialmente nos pólos do núcleo, com os telômeros dos braços curtos dos cromossomos, todos acrocêntricos, presos à membrana nuclear (Netto, 2000).

Dessa forma, DNAs satélite espécie-específicos têm sido usados como excelentes marcadores genéticos para resolver problemas específicos em taxonomia, bem como o estudo de famílias de DNAs satélites compartilhadas por 3 ou mais espécies, têm permitido muitas vezes o estudo de suas relações filogenéticas. Um exemplo dessa aplicação em peixes foi descrito em Perciformes, onde Garrido-Ramos *et al.* (1999) clonaram uma família de sequências de DNA satélite do genoma de *Sparus aurata*. Essa família satélite, denominada família *EcoRI* foi, juntamente com outra família de DNA repetitivo, *DraI*, isolada de *Pagrus auriga*, hibridizada pela técnica de hibridação em membrana com o DNA de vários gêneros e espécies da família *Sparidae*. Os resultados mostraram que a família de DNA satélite *EcoRI* de *S. aurata* está conservada nas espécies dos gêneros *Lithognathus*, *Diplodus*, *Spondylisoma* e, em menor grau de homologia, em *Pagellus*. Por outro lado, o DNA satélite isolado de *P. auriga* ficou restrito às espécies do gênero *Pagrus* e a *Pagellus erythrinus*. A existência de uma família de DNA satélite *DraI* restrita aos gêneros *Pagrus* e *Pagellus* oferece evidências de que esses dois gêneros estão mais intimamente relacionados do que qualquer outro gênero da família *Sparidae*. Assim, fica evidente a existência de grupos nessa subfamília, um composto por espécies pertencentes aos gêneros *Sparus*, *Lithognathus*, *Diplodus*, *Spondylisoma* e outro compreendendo espécies de *Pagrus* e *Pagellus* (Garrido-Ramos *et al.*, 1999).

Em outro estudo enfocando o relacionamento de sequências satélites em estudos de filogenias, Robles *et al.* (2004) isolaram e identificaram as relações filogenéticas do DNA satélite no genoma do esturjão, denominado *PstI*. Este satélite foi encontrado com alto grau de conservação em 13 espécies analisadas e é um dos mais antigos DNA satélite datado até o momento.

Em estudos realizados por Azevedo *et al.* (2005) isolaram e caracterizaram um família de DNA satélite da espécie *Achirus lineatus*, constituído por 204pb e rico em 63,72% de AT. Experimentos de hibridação em membrana demonstraram que este fragmento estava ausente nas espécies *A. declives*, *Gymnachirus nudus* e *Trinectes paulistanus*, indicando a existência de um marcador molecular específico para *A. lineatus*.

De modo geral, o estudo de sequências satélites do DNA, efetuadas por meio de diferentes técnicas e abordagens, tem apresentado uma gama de informações que tem auxiliado sobremaneira o entendimento do papel evolutivo e estrutural dessa porção representativa do genoma de eucariontes. Diferentes aspectos já foram extensivamente abordados por inúmeros autores. Em peixes, entretanto, ainda é pequeno o número de informações que se tem a respeito da organização molecular dessa fração do genoma e de sua localização cromossômica.

## 2. Objetivos

Embora já existam diversos estudos identificando características estruturais e moleculares relacionadas aos cromossomos B em peixes, estes dados ainda são pouco expressivos, principalmente levando-se em consideração a grande diversidade de espécies deste grupo de vertebrados. Portanto, o objetivo desse estudo é melhor caracterizar os microcromossomos B de *Moenkhausia sanctaefilomenae* com o uso de técnicas citogenéticas e moleculares, buscando informações para uma melhor compreensão sobre a estrutura e constituição destes segmentos genômicos e dos mecanismos envolvidos na sua origem e evolução nesta espécie. Desta forma, os objetivos específicos deste trabalho são:

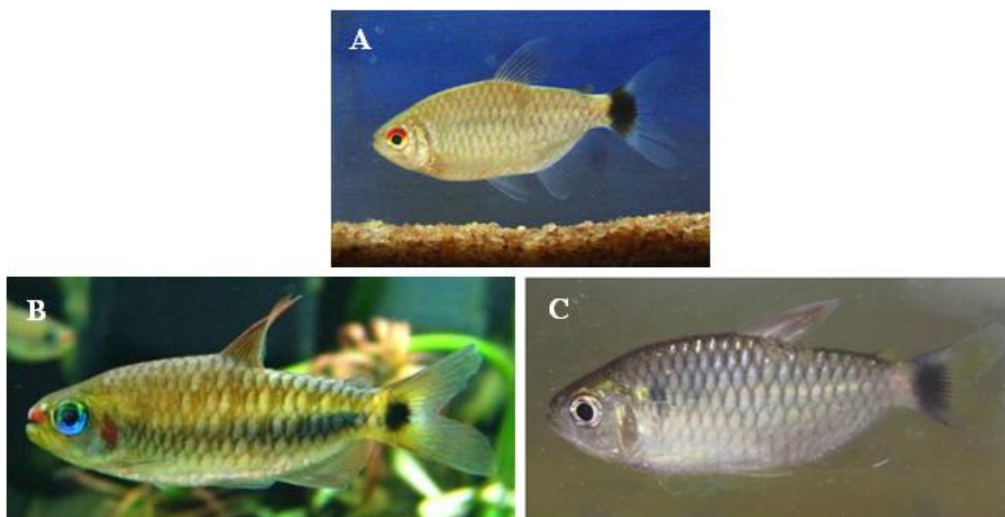
- 1) Caracterizar o cariótipo da espécie *Moenkhausia sanctaefilomenae*, com ênfase nos cromossomos B, pela análise da heterocromatina constitutiva, Ag-RONs, coloração por fluorocromos base específicos e FISH com sondas de DNAr 18S e 5S com intuito de identificar particularidades estruturais e moleculares dos cromossomos B eucromáticos e heterocromáticos desta espécie.

- 2) Caracterizar a estrutura molecular e mapear sequências repetitivas no genoma de *Moenkhausia sanctaefilomenae* e comparar estes resultados com outras populações e outras espécies próximas
- 3) Realizar a microdissecção do cromossomo B de *Moenkhausia sanctaefilomenae* e a amplificação do seu material genético por DOP-PCR, com a obtenção de sonda específica para pintura cromossômica no genoma de outras populações de *M. sanctaefilomenae* e em outras espécies próximas, verificando o grau de homologia entre os cromossomos B e os cromossomos do complemento cariotípico, contribuindo para a elucidação de sua origem.
- 4) Contribuir com subsídios para estudos complementares sobre as relações cromossômicas entre diferentes espécies do gênero *Moenkhausia* e conseqüentemente para outras espécies próximas.

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1. Materiais

Foram capturados exemplares de diferentes populações de *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Figura 1-A) coletados no ribeirão Araquá, ribeirão Alambari, ribeirão Capivara – região de Botucatu-SP, córrego Olaria – região de Penápolis-SP e ribeirão Cubatão – região de Marapoama-SP, todos pertencentes a bacia hidrográfica do Rio Tietê, e exemplares das espécies *M. cosmops* (Figura 1-B) coletados no rio Verde e *M. oligolepis* (Figura 1-C) coletados no rio do Sangue - município de Campo Novo dos Parecis-MT, pertencentes à bacia Amazônica. Os animais capturados foram acondicionados para transporte e o processamento do material foi realizado no Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, do Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, UNESP-Botucatu-SP. Todos os exemplares coletados foram fixados em formol 10% e posteriormente conservados em álcool 70%, identificados e mantidos na coleção de peixes do Laboratório. Os locais de coleta estão indicados na Figura 2.



**Figura 1.** Exemplares de *Moenkhausia* estudados no presente trabalho. A) *Moenkhausia sanctaefilomenae*, B) *Moenkhausia cosmops* e C) *Moenkhausia oligolepis*.



**Figura 2:** Mapa indicando os locais de coleta de populações e espécies de *Moenkhausia*. Populações de *Moenkhausia sanctaefilomenae*: 1-ribeirão Araquá, 2-ribeirão Alambari, 3-ribeirão Capivara, região de Botucatu-SP, 4-córrego Olaria, região de Penápolis-SP, 5-ribeirão Cubatão, região de Marapoama-SP; *Moenkhausia cosmops*: 6-rio Verde, Campo Novo dos Parecis-MT e *Moenkhausia oligolepis*: 7-rio do Sangue, Campo Novo dos Parecis-MT.

### 3.2. Metodologia

#### 3.2.1 Estimulação de mitoses

Antes do início das preparações cromossômicas, com a intenção de aumentar o índice mitótico, os exemplares foram submetidos a tratamento específico com o objetivo de estimular a divisão das células do tecido hematopoiético dos peixes (rim), conforme

descrito abaixo, seguindo protocolo de técnica inicialmente descrita para anfíbios e répteis por Cole e Leavens (1971), utilizada em pequenos mamíferos por Lee e Elder (1980) e em peixes por Oliveira *et al.*, (1988).

Estímulo de divisão celular: Injetar, intraperitonealmente nos animais, suspensão de levedura (0.5g de fermento de padaria, 1.5g de dextrose e 6ml de água; na proporção de 1ml/100g de peso do animal). Os animais foram mantidos em aquário aerado durante um período de 48 horas antes da retirada dos tecidos de interesse.

### 3.2.2 *Obtenção dos cromossomos mitóticos através de preparações diretas*

Para obtenção de cromossomos mitóticos foi utilizada a técnica convencional de preparação direta (“air-drying”), descrita por Egozcue (1971) e por Cestari (1973), e posteriormente adaptada por Foresti *et al.* (1993). A metodologia utilizada encontra-se descrita abaixo.

Obtenção de cromossomos mitóticos: Injetar solução aquosa de colchicina 0,0025% (na proporção de 1ml/100g de peso do animal) intra-abdominalmente nos animais, com uma seringa entre as nadadeiras peitorais e ventrais. Os animais foram mantidos em aquário bem aerado, por um período de 40 minutos. Este tempo foi padronizado para a espécie analisada. Após este período, o animal era sacrificado para a retirada do rim (porção anterior), com o auxílio de tesoura e pinças e colocado em uma pequena placa de Petri contendo 7ml de solução hipotônica (KCL 0,075M). Com o auxílio de pinças e uma pipeta Pasteur, o tecido era dissociado até se obter uma suspensão celular homogênea, que era transferida para um tubo de centrifuga e mantida em estufa a 37°C, durante 21 minutos. Após este tempo, o material era ressuspensão com cuidado, com o auxílio de uma pipeta Pasteur. Algumas gotas de fixador (metanol + ácido acético) recém-preparado eram acrescentadas ao material, que era ressuspensão de modo suave e deixado em temperatura ambiente por 5 minutos. A seguir, a suspensão era centrifugada por 10 minutos a 1000rpm e o sobrenadante descartado. Esse procedimento de fixação do material era repetido por mais duas vezes e, após a última centrifugação e eliminação do sobrenadante, aproximadamente 1ml de fixador era adicionado para ressuspender o material obtido, para obtenção da suspensão final.

As preparações celulares obtidas podem ser armazenadas em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ , acondicionadas em tubos de 1,5ml ou utilizadas para as preparações de lâminas que é feita pingando-se 2 gotas da suspensão sobre a lâmina, secando o material ao ar e depois corando com solução de Giemsa diluída a 5% em tampão ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,06M e  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,449M, pH 6.8) durante 10 minutos. Após este tempo a lâmina era lavada com água destilada ou água corrente e deixada para secar ao ar.

### *3.2.3 Detecção de heterocromatina constitutiva (Bandas C)*

Para visualização da heterocromatina constitutiva (Bandas C), foi utilizada a técnica descrita por Sumner (1972), com algumas modificações, conforme descrito abaixo.

*Bandamento C:* tratar o material preparado, segundo a técnica descrita para cromossomos mitóticos, com HCL 0,2N à temperatura ambiente durante 30 minutos. Lavar a lâmina com água corrente e deixar secar ao ar. Logos após este processo, mergulhar a lâmina em solução aquosa de hidróxido de bário ( $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ ) 5% a  $60^{\circ}\text{C}$  durante 5-12 segundos. Para interromper a ação do bário, submergir rapidamente a lâmina em solução de HCL 1N a  $60^{\circ}\text{C}$ , lavá-la em água corrente ou destilada e logo após, colocar a lâmina em solução salina 2xSSC a  $60^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos, em seguida corar com solução de Giemsa diluída a 2% em tampão fosfato (pH=6,8), durante 10 minutos.

### *3.2.4 Detecção das regiões organizadoras de nucléolos (RONs), através de impregnação com nitrato de prata*

A metodologia que utiliza impregnação com nitrato de Prata ( $\text{Ag-NO}_3$ ) foi utilizada para identificação das regiões organizadoras de nucléolos que se encontram ativas na interfase precedente. A técnica, descrita por Howell & Black (1980), encontra-se detalhada abaixo.

*Coloração com nitrato de Prata:* hidrolisar as lâminas contendo a preparação cromossômica por 3 minutos em HCL 1N a  $60^{\circ}\text{C}$ , em seguida lavar em água destilada. Sobre a lâmina preparada conforme a técnica adotada para cromossomos mitóticos, pingar 1 gota de solução aquosa de gelatina a 2% (acrescida de ácido fórmico na

proporção de 1ml para cada 100ml de solução) mantida em frasco escuro e em geladeira. Adicionar sobre a gota anterior, 2 gotas de solução aquosa de nitrato de prata a 50% mantida em frasco escuro a 4°C. Cobrir a lâmina com uma lamínula e incubar sobre um suporte em banho-maria a 60°C, por aproximadamente 3 minutos. Após o tempo apropriado, lavar a lâmina em água destilada ou corrente, possibilitando que a lamínula seja retirada pela própria água. Pode-se corar com Giemsa a 5% diluído em tampão fosfato (pH=6.8), durante 20 a 30 segundos. Lavar em água corrente e deixar secar ao ar.

### 3.2.5 Coloração com o fluorocromo base-específico cromomicina A<sub>3</sub>

O tratamento dos cromossomos com o corante fluorescente GC-específico Cromomicina A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>) foi realizado de acordo com a metodologia de Schweizer (1976), conforme descrito abaixo.

Coloração com Cromomicina A<sub>3</sub>: colocar as lâminas em cubetas contendo solução de tampão McIlvaine/MgCl<sub>2</sub> (ácido cítrico 0,1M; fosfato dissódico 0,2M; MgCl<sub>2</sub> 10mM; pH 7) em temperatura ambiente durante 10 minutos. Aplicar 150µl de CMA<sub>3</sub> (0,5mg/ml) sobre cada lâmina, cobrir com uma lamínula e manter no escuro por 15 minutos à temperatura ambiente. Retirar as lamínulas através da lavagem das lâminas em tampão McIlvaine. Incubar as lâminas em solução de metil-green/Hepes (NaCl 0,15M/Hepes 5mM; pH 7) por 15 minutos. Lavar as lâminas em solução de metil-green/Hepes por 15 minutos e posteriormente em solução de Hepes/NaCl 0,15M/Hepes 5mM; metil-green 0,012%; pH 7). Secar as lâminas e aplicar sobre estas, solução de glicerol com propilgalato 2,5%. Colocar uma lamínula sobre as lâminas e mantê-las no escuro e na geladeira por pelo menos 30 dias antes de analisá-las.

### 3.2.6 Análises das preparações cromossômicas

As imagens das preparações com cromossomos metafásicos foram capturadas utilizando microscópio óptico Olympus BX-62, software de captura Image-Pro MC v 6.0 e processada em Adobe Photoshop v 7.0. Os cariótipos foram montados a partir de medidas cromossômicas realizadas nas metáfases, conforme proposto por Levan *et al.*, (1964).



### 3.2.7 Extração de DNA genômico de tecidos sólidos

Esta técnica, descrita por Sambrook e Russel, 2001, envolve fundamentalmente a purificação do DNA pela ação combinada de detergentes, proteinase K e RNase, lavagem com fenol/clorofórmio e posteriormente, precipitação pelo cloreto de sódio e etanol, conforme descrito a seguir:

Extração de DNA: Fragmentar os pedaços de fígado, brânquias e músculos (fixados em etanol) em cadinhos com N<sub>2</sub> líquido. Adicionar ao tecido 3,98 ml de solução digestão (NaCl 0,1M; Tris-HCL 0,01 M pH=8,0; EDTA 0,025M pH=8,0; SDS 0,5%; RNase 100 µg/ml; H<sub>2</sub>O q.s.p.). Transferir o tecido macerado com 3,98 ml de solução de digestão para tubos Falcon de 15 ml. Colocar em banho-maria a 50 °C por meia hora. Passado esse tempo, cada tubo falcon receberá 20 µL de proteinase K 100 µg/ml, permanecendo por mais duas horas no banho a essa temperatura. Retirar os tubos do banho-maria e adicionar 4 ml de Fenol: Clorofórmio: Álcool isoamílico (50:48:2). Agitar os tubos (bem fechados) suavemente por cerca de 15 minutos, até misturar bem os componentes. Centrifugar por 15 minutos a 3.000 rpm. Transferir a camada superior do tubo (DNA) para tubos novos, tomando cuidado para não pegar a camada de proteínas. Acrescentar 0,2 volumes de NaCl 1M de acordo com o volume obtido no item anterior + 2 volumes de etanol 100% gelado e movimentar suavemente o tubo para precipitar o DNA. Centrifugar por 15 minutos a 3.000 rpm. Descartar o sobrenadante, acrescentar cerca de 4 ml de etanol 70% gelado e centrifugar como no item anterior. Descartar o sobrenadante e levar o tubo para a estufa a 37 °C por até 30 minutos. Deixar overnight até secar o DNA. Adicionar até 1 ml de água MilliQ autoclavada. Deixar na bancada ou na geladeira por pelo menos 24 horas para hidratação.

### 3.2.8 Visualização e quantificação do DNA em gel de agarose

A integridade do DNA foi analisada através de eletroforese em gel de agarose 1% de acordo com a metodologia descrita por Sambrook & Russel (2001), como a seguir:

Quantificação do DNA: Montar a placa de eletroforese. Diluir a agarose (Ultra Pure™ Agarose - Invitrogen Life Technologies) em um volume apropriado de tampão

TAE 1X (Tris-Ácido acético-EDTA) para que o gel fique em uma concentração de 1 %. Aquecer a solução até que esta fique translúcida. Deixar a solução esfriar um pouco e aplicar no suporte da cuba de eletroforese horizontal; ajustar o pente na cuba e deixar a solução de agarose polimerizar; preencher a cuba de eletroforese com tampão TAE 1X. Preparar o DNA a ser aplicado utilizando 2 µL de tampão LB e realizar a aplicação no gel. Aplicar DNA marcador de peso molecular conhecido (Low DNA Mass Ladder) e submeter a eletroforese a 110V/150mA por 1 hora. Corar o gel em solução de brometo de etídio (10 mg/ml) diluída a 0.1% em tampão TAE 1X. Realizar a observação do gel em transiluminador (Hofer UV-25), sob luz ultravioleta, e posteriormente a fotodocumentação através do programa EDAS (*Electrophoresis Documentation and Analysis System 120 - Kodak Digital Science 1D*). Os pesos moleculares das amostras foram estimados através da comparação com o marcador.

### 3.2.9 Isolamento de sequências repetidas por digestão enzimática

O DNA genômico extraído de *Moenkhausia sanctaefilomenae* foi submetido a restrição enzimática com o intuito de serem identificadas bandas em gel de agarose contendo fragmentos repetidos de DNA. Para tanto, foram testadas 24 enzimas de restrição, sendo elas: *MspI*, *ApaI*, *HinfI*, *HindIII*, *KpnI*, *PstI*, *SacI*, *BamHI*, *XbaI*, *EcoRI*, *Acc65I*, *BclI*, *AvaI*, *Bsp119I*, *AluI*, *Bsh1236*, *Csp6I*, *HhaI*, *RsaI*, *HaeIII*, *PvuII*, *NruI*, *XmnI*, *EcoRV*.

Digestão Enzimática: Colocar em um tubo estéril de 1,5 ml, para cada enzima de restrição, 30 µL de DNA genômico (100 ng/µL); 30U da enzima a ser utilizada; 10 µL de tampão de digestão e completar com água milli-Q para um volume final de 100 µL. Digerir *overnight* em banho-maria a 37 °C. Para precipitação e purificação do DNA digerido, acrescentar 2 µL de NaCl 5M gelado e 2 volumes de etanol (100%) gelado, agitar levemente e colocar em freezer a 76 °C negativos por 1 hora. Centrifugar a 13.000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Descartar o sobrenadante e acrescentar 300 µL de etanol 70% gelado. Centrifugar a 13.000 rpm por 5 minutos a 4 °C. Descartar o sobrenadante, deixar secar a temperatura de 37 °C por aproximadamente 15 minutos e ressuspender em seguida em 12 µL de água milli-Q estéril.

Eletroforese em gel de agarose: Submeter os produtos de digestão enzimática (12µl) à eletroforese em gel de agarose 1% imerso em tampão TAE 1x (Tris-Ácido acético-EDTA), durante 4-6 horas a 50V/100mA. Visualizar o produto de DNA digerido em transiluminador (Hofer UV-25), sob luz ultravioleta, após coloração do gel de agarose com brometo de etídio (10mg/ml) (Sambrook & Russell 2001). Fotografar o gel com auxílio do programa computacional EDAS (Electrophoresis Documentation and Analysis System 120 - Kodak Digital Science 1D) e estimar os pesos moleculares dos fragmentos através de comparação com um marcador de peso molecular conhecido (1Kb Plus DNA Ladder - Gibco.Brl).

### *3.3 Purificação dos fragmentos de DNA presente no gel de agarose*

Para a purificação do fragmento de DNA produzido pela restrição enzimática, foi utilizado o kit *GFX<sup>TM</sup> PCR DNA and Gel Band Purification* (Amersham Pharmacia Biotech), seguindo as especificações do fabricante:

Purificação de fragmentos de DNA de gel de agarose: Pesar um tubo de 1.5 ml vazio e anotar o peso. Cortar a banda de interesse do gel de agarose, corado com brometo de etídio (10 mg/ml) sob transiluminador ultravioleta, e colocá-la no tubo. Cortar o pedaço de gel em vários pedaços menores, utilizando uma tesoura ou uma pinça. Pesar novamente o tubo e calcular o peso do fragmento de agarose. Adicionar 10 µL de “Capture Buffer” para cada 10 mg de gel e misturar em vortex. Incubar a 60 °C em banho-maria até que a agarose dissolva (5-15 minutos). Centrifugar brevemente o tubo e coletar, com uma micropipeta, a amostra de agarose dissolvida. Transferir a amostra para uma coluna GFX colocada em um tubo coletor e incubar a temperatura ambiente por 1 minuto. Centrifugar o tubo coletor com a coluna GFX a 10.000 rpm por 30 segundos. Descartar o líquido do tubo coletor e colocar a coluna GFX novamente no tubo coletor. Adicionar 500 µL de “Wash Buffer” (tampão de lavagem) à Coluna GFX e centrifugar a 10.000 rpm por 30 segundos. Descartar o tubo coletor e transferir a Coluna GFX para um novo tubo de 1.5 ml. Aplicar 50 µL de tampão de eluição TE (Tris-HCl 10 mM pH 8.0; EDTA 1 mM pH 8.0) diretamente sobre a fibra de vidro da Coluna GFX. Incubar a amostra à temperatura ambiente por 1 minuto e centrifugar a 10.000 rpm por 1 minuto

para recuperar o DNA. Estocar o DNA purificado a  $-20^{\circ}\text{C}$  e estimar o produto final em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

### 3.3.1 Clonagem do DNA repetitivo

Os fragmentos de DNA digerido e extraído do gel de agarose foram clonados com o Kit Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit with One Shot® TOP10 Electrocomp™ *E. coli* (Life Technologies - Invitrogen). O protocolo consistiu em:

Ligação com o vetor: Para cada fragmento clonado preparar uma reação (solução disponibilizada no kit). Colocar em um eppendorf 4μl do produto a ser clonado, 1μl de dilute salt solution (1:4) e 1μl de pcrII-Blunt-TOPO, incubar a  $22^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos e colocar no gelo por 2 minutos.

Transformação: Adicionar 2μl da ligação às células competentes e misturar cuidadosamente, transferir às células competentes para uma cubeta própria para efetuar a eletroporação, eletroporar a 2000 v, imediatamente adicionar 250μl de SOC na cubeta a temperatura ambiente, transferir pra outro tubo e incubar a  $37^{\circ}\text{C}$  por 1 hora, enquanto isso, adicionar 30μl de X-Gal 2% para cada placa que será usada, incubar a  $37^{\circ}\text{C}$  *overnight* e estocar a  $4^{\circ}\text{C}$  em saco plástico fechado.

### 3.3.2 Crescimento e estocagem dos clones recombinantes

Bactérias transformadas foram plaqueadas em meio LB/Agar contendo ampicilina e X-gal. A placa foi deixada na estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  *overnight*. As colônias recombinantes (colônias brancas) foram retiradas com ponteiras estéreis e inoculadas em 5 ml de meio LB líquido contendo ampicilina, conforme descrito abaixo:

Crescimento e estocagem: fazer 200 ml de meio LB (1g Select Peptone 140; 0,5g Select Yeast extract; 1g de NaCl; 96 ml H<sub>2</sub>O), colocar 5 ml de meio nos tubos de ensaio autoclavados e quando o meio estiver morno, adicionar ampicilina (200μl H<sub>2</sub>O/0,010ng de ampicilina), selecionar as bactérias transformadas (colônias brancas) e, com uma

ponteira estéril, raspá-las e colocá-las no tubo de ensaio, colocar os tubos de ensaio no shaker a 37°C *overnight* com 225 rpm.

### 3.3.3 Direct colony PCR screening

*Screening*: raspar da placa de Petri uma colônia branca de aproximadamente 1 mm de diâmetro usando uma ponteira estéril, transferir para um eppendorf de 1,5ml contendo 50µl de H<sub>2</sub>O milli-Q, colocar o eppendorf contendo as bactérias com as ponteiras no termociclador com a tampa aberta a 94°C por 5 minutos, utilizar a micropipeta para retirar qualquer vestígio de água que provavelmente fique na ponteira, armazenar a 4°C.

*Reação de PCR M13 screening utilizando os seguintes primers :*

Primers: M13 F 5' TGT AAA ACG ACG GCC AGT 3'  
M13 R 5' CAG GAA ACA GCT ATG ACC 3'

Reagentes /Concentração inicial	Quantidades	Concentração final
H <sub>2</sub> O	10,6 µl	----
Buffer (10x)	2,0 µl	1x
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	1,6 µl	2 mM
dNTPs (2mM)	2,0 µl	0,2 mM
Primer M13 F (5µM)	0,8 µl	0,2 µM
Primer M13 R (5µM)	0,8 µl	0,2 µM
Taq polymerase (5U/ µl)	0,2 µl	0,05 U/µl
DNA	2,0	----
<b>Total</b>	<b>20,0µl</b>	

*Programa do termociclador utilizado para a amplificação dos fragmentos na reação de PCR screening:*

	1- 94°C – 1 min						
3 ciclos	<table style="border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 0 5px;">2-</td> <td>94°C – 30 seg</td> </tr> <tr> <td style="padding: 0 5px;">3-</td> <td>61°C – 30 seg</td> </tr> <tr> <td style="padding: 0 5px;">4-</td> <td>74°C – 45 seg</td> </tr> </table>	2-	94°C – 30 seg	3-	61°C – 30 seg	4-	74°C – 45 seg
2-	94°C – 30 seg						
3-	61°C – 30 seg						
4-	74°C – 45 seg						
32 ciclos	<table style="border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 0 5px;">5-</td> <td>94°C – 30 seg</td> </tr> <tr> <td style="padding: 0 5px;">6-</td> <td>58°C – 30 seg</td> </tr> <tr> <td style="padding: 0 5px;">7-</td> <td>72°C – 45 seg</td> </tr> </table>	5-	94°C – 30 seg	6-	58°C – 30 seg	7-	72°C – 45 seg
5-	94°C – 30 seg						
6-	58°C – 30 seg						
7-	72°C – 45 seg						
	8- 72°C – 10 min						
	9- 12°C - ∞						

*3.3.4 Transferência de DNA total de gel de agarose para a membrana de nylon – “Southern Blotting”.*

O DNA foi transferido para a membrana de nylon de acordo com o procedimento descrito por Southern (1975). Amostras de DNA total íntegro e DNAs parcialmente digeridos com *HinfI* em diferentes tempos de digestão (10 minutos, 30 minutos, 60 minutos e *overnight*) foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1%. Após a corrida, o gel foi fotografado em um transiluminador (MacroVue-Hoefer) e capturado em um Vilber Lourmat digital.

*Desnaturação e Neutralização:* Transferir o gel de agarose para um recipiente plástico pequeno, cobrir o gel com 100 ml do tampão de desnaturação (NaOH 0,5N/NaCl 1,5M). Periodicamente, agitar o recipiente por 15 minutos. Escorrer o tampão desnaturante e colocar novamente 100 ml desse tampão. Periodicamente, agitar o recipiente por 15 minutos. Escorrer o tampão desnaturante e enxaguar brevemente o gel com 100 ml de água destilada. Escorrer a água destilada e adicionar 100 ml de tampão de neutralização (Tris 0,5M/ pH7,5/ NaCl 1,5M). Agitar periodicamente durante 15 minutos. Escorrer o tampão de neutralização e substituir por 100 ml do mesmo tampão. Agitar periodicamente o gel por mais 15 minutos. Escorrer o tampão de neutralização e enxaguar brevemente o gel com 100 ml de água destilada.

Montagem do Blotting e Transferência: Preparar um recipiente contendo aproximadamente 1.000 ml de 2xSSC, colocar dentro desse recipiente aproximadamente 5 centímetros de Gel Blot Paper (mata-borrão), sobre este, colocar papel filtro o qual o gel foi colocado de modo que a face que contém as fendas de aplicação fiquem voltadas para baixo, colocar a membrana de nylon sobre o gel. Cuidadosamente alinhar a borda superior da membrana com a linha de poços do gel. Com o dedo enluvado retire qualquer bolha de ar que por acaso tenha ficado presa entre a membrana e o gel. Colocar e centralizar outro papel filtro sobre a membrana de nylon, centralizar uma pilha de aproximadamente 5 centímetros de Gel Blot Paper (mata-borrão) sobre o papel filtro. Colocar cuidadosamente um béquer com 400 ml de água (ou outro volume com peso equivalente) sobre o mata-borrão. A transferência deve ocorrer por pelo menos 12 horas.

Lavagem e incubação da membrana: Remover a pilha de papel toalha (que estará saturada de tampão), os papéis de filtro e com a membrana de nylon ainda em contato usar uma tesoura para cortar o canto inferior direito do sanduíche gel/membrana. Usar uma pinça para retirar a membrana da superfície do gel. Transferir a membrana para um recipiente plástico contendo 100 ml de 2xSSC por 1 minuto. Colocar a membrana entre dois pedaços de papel de filtro (12x14 cm), fechar as quatro laterais com fita adesiva e levar à estufa a 70°C por 30 minutos. Após a incubação da membrana ela pode ser armazenada indefinidamente à temperatura ambiente.

### 3.3.5 Hibridação de DNA imobilizado em membrana

Hibridação em membrana: A membrana foi inicialmente umedecida com a solução de 3xSSC e depois incubada a 42°C por 1 hora em 10 ml de solução de pré-hibridação com 120µl de SpermDNA. Em seguida, a solução de pré-hibridação foi retirada e substituída por 4 ml de solução de hibridação junto com a sonda marcada e desnaturada. Para a marcação da sonda, adiciona-se 2µl de cada solução de dATP, dGTP, dTTP; 15 µl de *Random Primers Buffer Mixture*; 1 µl de fragmento Klenow e 3,2 µl de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP, logo em seguida, incubar a mistura por 1 hora a 25 °C, adicionar 5 µl do Stop Mix e 2 µl do DNA controle marcado com radioativo. A mistura é fervida por 5 minutos e adiciona-se 5 ml de solução de hibridização. Descartar a solução de pré-hibridização da membrana

e colocar a solução de hibridização com a sonda marcada, deixando na estufa a 42 °C *overnight*.

Lavagem da membrana e exposição: No dia seguinte, passar a membrana para um recipiente contendo 250 ml de solução de lavagem (2xSSC; 0,1xSDS), deixar por aproximadamente 10 minutos no banho à 65 °C, em seguida, descartar a solução e repetir mais uma lavagem. Colocar a membrana em um casséte junto com o *storage phosphor screen* (GE Healthcare) por aproximadamente 3 a 24 horas. O *screen* foi então escaneado no Storm 860 e o gel foi analisado utilizando o software ImageQuant TL (GE Healthcare).

Remoção de sondas para a reutilização de membranas: Para poder utilizar a mesma membrana com diferentes sondas (re-hibridação), lavar em solução de 0,1xSSC/0,1% SDS a 100 °C sob agitação durante 15 minutos.

### 3.3.6 Reação de Sequenciamento

Sequenciamento: aliquotar 1µl de H<sub>2</sub>O para cada amostra (futuro pré-mix) e manter no gelo, colocar H<sub>2</sub>O nos tubos de sequenciamento. Adicionar 2,9µl para as reações em 1,4µl de DNA (quando a banda do PCR curto estiver bem forte) ou 1,5µl para as reações em 2,8µl de DNA (quando a banda do PCR curto estiver fraca), colocar 0,7µl de primer para cada reação, aliquotar 0,7µl de DyeSeq para cada reação. Misturar o volume total com o volume total de água (pré-mix), aplicar 1,7µl para cada reação, executar o seguinte programa de PCR de sequenciamento:

1- 96°C – 2 min

30 ciclos  $\left\{ \begin{array}{l} 2- 96^\circ\text{C} - 30 \text{ seg} \\ 3- 50^\circ\text{C} - 15 \text{ seg} \\ 4- 60^\circ\text{C} - 4 \text{ min} \end{array} \right.$

5- 12°C - ∞



### 3.3.7 Limpeza da reação de Sequenciamento

Para a limpeza: Adicionar 0,7µl de EDTA (125mM), adicionar 0,7µ de acetato de sódio (3M), homogeneizar e passar no spin brevemente, adicionar 17,5µl Etanol 100% gelado, homogeneizar e passar no spin brevemente, incubar no escuro por 15 minutos em temperatura ambiente, centrifugar por 15 minutos a 13000 rpm em temperatura ambiente, descartar o sobrenadante em papel toalha e batê-lo levemente algumas vezes, adicionar 24,5µl de Etanol 70% gelado, centrifugar por 10 minutos a 13000 rpm em temperatura ambiente, descartar o sobrenadante em papel toalha e batê-lo levemente algumas vezes, repetir os passos h a j (lavagem com etanol 70%), secar em termociclador por 2 minutos a 96°C, tubos e termo aberto, guardar em geladeira coberto por papel alumínio, pode guardar até um mês coberto por papel alumínio em freezer -20°C.

### 3.3.8 Sequenciamento

A sequência nucleotídica dos clones recombinantes foi determinada através do sistema de sequenciador ABI3130 Capilares 80 cm, seguindo as especificações do fabricante. As sequências obtidas foram alinhadas utilizando-se o programa *ClustalW* (Thompson *et al.*, 1994) através da website: ([HTTP://www2.ebi.ac.uk/clustalw](http://www2.ebi.ac.uk/clustalw)) e submetidas ao GenBank através do National Center for Biotechnology Information (NCBI) website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Com a utilização do sistema de pesquisa Blastn do NCBI (Altschul *et al.*, 1990), foi realizada uma busca de similaridade entre as sequências já depositadas no *GenBank Data Base* (GB) e também uma busca no *RepeatMasker*. O programa computacional *GeneRunner* Version 3.05 também é utilizado em diversas análises.

### 3.3.9 Tríplex Coloração CMA<sub>3</sub>/DA/DAPI

A metodologia empregada de CMA<sub>3</sub>/DA/DAPI em cromossomos metafásicos, baseada em procedimentos adotados por Schweizer (1980), encontra-se descrita abaixo:

Coloração CMA<sub>3</sub>/DA/DAPI: primeiramente desidratar as lâminas em série alcoólica (70%, 85% e 100%), por dois minutos cada série, a temperatura ambiente. Colocar cerca

de 30µl de solução de Cromomicina A<sub>3</sub> sobre cada lâmina, cobrir com uma lamínula e incubar em câmara escura por 1 hora a temperatura ambiente. Escorrer a lamínula e lavar a lâmina em tampão McIlvaine, lavar com água, secar levemente. Colocar cerca de 30µl de solução de Distamicina 0,1mg/ml sobre cada lâmina, cobrir com uma lamínula e incubar em câmara escura por 15 minutos a temperatura ambiente. Escorrer a lamínula e lavar a lâmina em tampão McIlvaine, lavar com água, secar levemente. Colocar cerca de 30µl de solução DAPI 0,2µg/ml sobre cada lâmina, cobrir com uma lamínula e incubar em câmara escura de 20-30 minutos a temperatura ambiente. Lavar a lâmina em tampão McIlvaine, secar ao ar e cobrir com lamínula em meio de montagem glicerol/McIlvaine. Esperar 3 dias para analisar. Opcionalmente a lâmina pode ser montada com DAPI/Antifading, quando no passo 3 devemos usar 30µl de solução DAPI/Antifading, retirar o excesso de papel filtro podendo ser analisada após 15 minutos.

#### *3.4 Obtenção de sonda cromossômica por microdissecção*

A microdissecção dos cromossomos B foi realizada em micromanipulador Eppendorf acoplado a um microscópio Zeiss AXIOvert 100. O procedimento de microdissecção utilizado foi baseado em Houben *et al.*, (2001), com modificações no protocolo inicial para sua adaptação ao organismo de interesse desse projeto (Figura 1).

Preparação das agulhas: Foram utilizados capilares de borosilicato com aproximadamente 1 milímetro de diâmetro. Os capilares foram colocados em “pulley” (Narishige PC-10) e aquecidos, formando a ponta da agulha a ser utilizada. Após a preparação, as agulhas foram colocadas em um local protegido para evitar contaminação.

Preparação do material: (Mühlmann *et al*, 1995). As preparações cromossômicas devem ser de boa qualidade, com pouco contato com ácido acético, sendo preferencialmente mantidas em metanol a -80°C. A suspensão celular deve ser pingada em uma lamínula bem limpa e as metáfases devem ficar bem espalhadas para evitar a microdissecção de fragmentos de outros cromossomos diferentes daquele desejado.

Microdissecção cromossômica: Diluir uma alíquota da suspensão celular final em metanol:ácido acético na proporção 3:1, respectivamente. Pingar a suspensão em

lamínulas. Secar o material ao ar e corá-lo com solução Giemsa diluída a 5% em tampão fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,06M e  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,449M, pH 6.8) durante 8-10 minutos. Lavar as lamínulas com água destilada e deixá-las secar ao ar. Colocar a lamínula contendo a preparação celular num microscópio invertido (Axiovert 100 – Zeiss) e proceder a microdissecção dos cromossomos de interesse, com o auxílio de uma agulha de vidro ligada ao micromanipulador mecânico (Eppendorf). Neste caso, o cromossomo utilizado para a microdissecção foi o cromossomo B de *Moenkhausia sanctaefilomenae* provenientes do ribeirão Araquá (região de Botucatu-SP) de fácil identificação, por serem cromossomos menores que os do complemento cariotípico. Após a microdissecção, foram feitas 3 PCRs (Polimerase Chain Reaction).

#### 3.4.1 DOP-PCR (Degenerate Oligonucleotid Primer)

Essa PCR consistiu numa amplificação inespecífica dos cromossomos microdissectados através de DOP-PCR (Degenerate Oligonucleotide Primed-PCR), utilizando-se de um *primer* degenerado (5' CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G 3') proposto por Telenius *et al.*, (1992). A DOP-PCR compreendeu duas etapas de amplificação, uma de baixa estrigência (primeira PCR) e outra de alta estrigência (segunda PCR e PCR de marcação).

#### 3.4.2 Primeira PCR

Na primeira amplificação, condições de baixas temperaturas permitem o anelamento do *primer* degenerado e a extensão de vários sítios no genoma.

Num tubo de 0,5ml, preparar um mix contendo os seguintes reagentes:

Água mili-Q autoclavada	6,75µl
Tampão Termosequenase (10x)	1,0µl
dNTPs (mix) (8mM)	0,25µl
Primer DOP (10µM)	1,0µl

Após a adição dos cromossomos microdissectados ao tubo de 0,5ml, contendo 9,0µl mix de DOP-PCR, estes foram aquecidos a 95°C por 10 min e centrifugados brevemente. Em seguida, acrescentou-se 1,0µl da enzima Termosequenase (Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit, USB). As ampliações foram realizadas num termociclador PTC-200™ Peltier Thermal Cycler (MJResearch, Inc) de acordo com as seguintes condições:

	94°C..... 3 min				
12 ciclos	<table style="border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 0 5px;">94°C..... 1 min e 30 seg</td> </tr> <tr> <td style="padding: 0 5px;">37°C..... 2 min</td> </tr> <tr> <td style="padding: 0 5px;">37°C..... 1 min, subindo 0,2°C/seg até 72°C</td> </tr> <tr> <td style="padding: 0 5px;">72°C..... 2 min</td> </tr> </table>	94°C..... 1 min e 30 seg	37°C..... 2 min	37°C..... 1 min, subindo 0,2°C/seg até 72°C	72°C..... 2 min
94°C..... 1 min e 30 seg					
37°C..... 2 min					
37°C..... 1 min, subindo 0,2°C/seg até 72°C					
72°C..... 2 min					
30 ciclos	<table style="border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 0 5px;">94°C..... 1 min e 30 seg</td> </tr> <tr> <td style="padding: 0 5px;">62°C..... 1 min</td> </tr> <tr> <td style="padding: 0 5px;">72°C..... 2 min</td> </tr> </table>	94°C..... 1 min e 30 seg	62°C..... 1 min	72°C..... 2 min	
94°C..... 1 min e 30 seg					
62°C..... 1 min					
72°C..... 2 min					
	Manutenção a 12°C				

Os produtos da reação de amplificação foram checados em gel de agarose a 1%.

#### 3.4.3 Segunda PCR

A segunda amplificação foi preparada para um volume final de 20µl num tubo de 0,5ml, com os seguintes reagentes:

Água mili-Q autoclavada	13,4µl
Tampão Termosequenase (10x)	2,0µl
MgCl <sub>2</sub> (2mM)	1,6µl
dNTPs (mix) (2mM)	0,4µl
Primer DOP (10µM)	0,4µl
Taq (5U/µl)	0,2µl
DNA- produto da 1ª PCR	2,0µl

Posteriormente, a amplificação foi realizada de acordo com as seguintes condições:

90°C..... 3 min

30 ciclos { 90°C..... 1 min e 30 seg  
56°C..... 1 min e 30 seg  
72°C..... 1 min e 30 seg

Manutenção a 12°C

Os produtos da reação de amplificação foram checados em gel de agarose a 1%.

#### 3.4.4 PCR de marcação

Na PCR de marcação foram utilizados os reagentes descritos abaixo para um volume final de 50µl. As condições de amplificação foram as mesmas descritas para a segunda PCR.

Reagentes /Concentração inicial	Quantidades	Concentração final
H <sub>2</sub> O	30,9 µl	
Buffer (10x)	5,0 µl	1x
MgCL <sub>2</sub> (2mM)	4,0 µl	0,16 mM
dATP (2mM)	1,0 µl	0,04 mM
dCTP (2mM)	1,0 µl	0,04 mM
dGTP (2mM)	1,0 µl	0,04 mM
dTTP (2mM)	1,4 µl	0,056 mM
Digoxigenina 11 dUTP (1mM)	1,2 µl	0,024 mM
Primer-DOP (10µM)	1,0 µl	0,2 µM
Taq polymerase (5U/ µl)	0,5 µl	0,05 U/ µl
DNA	3,0 µl	
Total	50 µl	

Os produtos da reação de amplificação foram checados em gel de agarose a 1%

*Precipitação da sonda*: checar o produto da PCR em gel de agarose a 1%; precipitar o produto da PCR com 1/10 do volume da reação com acetato de sódio - 3M e duas vezes o volume total da reação com de etanol 100%; incubar a  $-20^{\circ}\text{C}$  overnight; centrifugar a 14.000 rpm por 10 min; descartar o sobrenadante e lavar o pellet com 50  $\mu\text{l}$  etanol 70%; centrifugar a 14.000 rpm 5 min; descartar o sobrenadante, secar em estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  e eluir em 25 $\mu\text{l}$  de água (para uso imediato) ou TE (para ser armazenada por um período maior).

#### 3.4.5 Preparação da sonda telomérica

A sonda utilizada para a detecção de sequências teloméricas foi amplificada e marcada por PCR, usando digoxigenina 11- dUTP (Roche Applied Science). Na ausência de DNA molde, foram usados primers (TTAGGG)<sub>5</sub> e (CCCTAA)<sub>5</sub>. A reação de amplificação foi preparada para um volume final de 50 $\mu\text{l}$  num tubo de 0,5ml, com os seguintes reagentes:

Reagentes /Concentração inicial	Quantidades	Concentração final
H <sub>2</sub> O	21,7 $\mu\text{l}$	
Buffer (10x)	5,0 $\mu\text{l}$	1x
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	3,0 $\mu\text{l}$	1,5 mM
Tris-HCl (100mM)	5,0 $\mu\text{l}$	10,mM
dATP (2mM)	1,0 $\mu\text{l}$	0,04 mM
dCTP (2mM)	1,0 $\mu\text{l}$	0,04 mM
dGTP (2mM)	1,0 $\mu\text{l}$	0,04 mM
dTTP (2mM)	0,7 $\mu\text{l}$	0,028 mM
Digoxigenina 11 dUTP (1mM)	0,6 $\mu\text{l}$	0,012 mM
Primer A (10 $\mu\text{m}$ )	5,0 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{M}$
Primer B (10 $\mu\text{m}$ )	5,0 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{M}$
Taq polymerase (5U/ $\mu\text{l}$ )	1,0 $\mu\text{l}$	

A amplificação foi realizada num termociclador PTC-200™ Peltier Thermal Cycler (MJResearch, Inc) de acordo com as seguintes condições:

10 ciclos	{ <ul style="list-style-type: none"> <li>94°C..... 1 min</li> <li>55°C..... 30 seg</li> <li>72°C..... 1 min</li> </ul>
30 ciclos	{ <ul style="list-style-type: none"> <li>94°C..... 1 min</li> <li>60°C..... 30 seg</li> <li>72°C..... 1 min e 30 seg</li> </ul>
	72°C..... 5 min
	Manutenção a 12°C

### 3.4.6 Preparação das sondas de DNAr 18S e 5S

Para o mapeamento dos sítios de DNAr 18S e 5S nos cromossomos metafásicos a sonda de DNAr 18S foi obtida por PCR (Polymerase Chain Reaction) a partir do DNA total de *Moenkhausia sanctaefilomenae*, usando os primers 18S F (5'CCG CTT TGG TGA CTC TTG AT 3') e 18S R (5'CCG AGG ACC TCA CTA AAC CA 3'). Esta sonda foi marcada com Biotina-16-dUTP (Roche Applied Science) e a detecção do sinal de hibridação foi realizada usando Avidina-fluoresceína conjugada (FITC). A sonda de DNAr 5S foi obtida por PCR (Polymerase Chain Reaction) a partir do DNA total de *Moenkhausia sanctaefilomenae*, usando os primers 5S F (5'TAC GCC CGA TCT CGT CCG ATC 3') e 5S R (5'CAG GCT GGT ATG GCC GTA ACG 3'). Esta sonda foi marcada com Digoxigenina-11-dUTP (Roche Applied Science) e a detecção do sinal de hibridação foi realizada usando anti-digoxigenina-rodamina (Roche Applied Science). As reações de amplificação foram preparadas para um volume final de 50µl num tubo de 0,5ml, com os seguintes reagentes:

#### Reagentes para a amplificação da sonda de DNAr 18S

Reagentes /Concentração inicial	Quantidades	Concentração final
H <sub>2</sub> O	28,9 µl	
Buffer (10x)	5,0 µl	1x
MgCL <sub>2</sub> (2mM)	4,0 µl	0,16 mM
dATP (2mM)	1,25 µl	0,05 mM
dCTP (2mM)	1,25 µl	0,05 mM
dGTP (2mM)	1,25 µl	0,05 mM
dTTP (2mM)	0,625 µl	0,025 mM
Biotina 16 dUTP (1mM)	1,25 µl	0,025 mM
Primer A (10µm)	1,0 µl	0,2 µM
Primer B (10µm)	1,0 µl	0,2 µM
Taq polymerase (5U/µl)	0,5 µl	0,05U/µl
DNA	4,0 µl	

A amplificação foi realizada num termociclador PTC-200™ Peltier Thermal Cycler (MJResearch, Inc) de acordo com as seguintes condições:

31 ciclos { 94°C..... 1 min e 30 seg  
 94°C..... 1 min e 30 seg  
 56°C..... 1 min e 30 seg  
 72°C..... 1 min e 30 seg

72°C..... 10 min

Manutenção a 12°C

#### Reagentes para a amplificação da sonda de DNAr 5S

Reagentes /Concentração inicial	Quantidades	Concentração final
H <sub>2</sub> O	38,5 µl	
Buffer (10x)	5,0 µl	1x
dATP (2mM)	0,5 µl	0,02 mM
dCTP (2mM)	0,5 µl	0,02 mM
dGTP (2mM)	0,5 µl	0,02 mM
dTTP (2mM)	0,35µl	0,014 mM
Digoxigenina 11 dUTP (1mM)	0,15µl	0,006 mM
Primer A (10µM)	1,0 µl	0,2 µM
Primer B (10µM)	1,0 µl	0,2 µM
Taq polymerase (5U/µl)	0,5 µl	0,05U/µl
DNA	2,0 µl	

A amplificação foi realizada num termociclador PTC-200™ Peltier Thermal Cycler (MJResearch, Inc) de acordo com as seguintes condições:

31 ciclos { 94°C..... 1 min  
 94°C..... 30 seg  
 56°C..... 45 seg  
 72°C..... 1 min e 30 seg

72°C..... 10 min

Manutenção a 12°C



### 3.4.7 Híbridação *in situ* fluorescente

A metodologia empregada de híbridaç o *in situ* fluorescente (FISH) em cromossomos metafásicos, baseada em procedimentos adotados por Pinkel *et al.* (1986) e em modificações apresentadas por Martins & Galetti (1999) e Wasko & Galetti (2000). Esta técnica foi utilizada para a híbridaç o *in situ* fluorescente dos genes ribossomais DNAr 18S e 5S, e na híbridaç o de sondas provenientes do cromossomo B, que encontra-se descrita a seguir.

Híbridação *in situ* fluorescente: Lavar as lâminas em tampão PBS 1x durante 5 min. em temperatura ambiente (shaker); Desidratar as lâminas em série alcoólica 70, 85 e 100%, 5 min cada (secar); Incubar as lâminas em 100 µl de RNase (0,4% RNase/2xSSC) a 37  C por 1h em câmara úmida com água milli-Q; Em seguida, lavar 3X por 5 min em 2xSSC; Lavar durante 5 min em PBS 1X. Incubar as lâminas por 10 min em solução de pepsina 0,005% (em 10mM HCl) a 37  C; Lavar em PBS 1x durante 5 min (agitando)   temperatura ambiente; Fixar em formalde deo 1% em PBS 1X/50mM MgCl<sub>2</sub> durante 10 min a temperatura ambiente; Lavar em PBS 1x por 5 min. (agitando); Desidratar as lâminas em série alcoólicas (70, 85, 100 %) por 5 min cada; simultaneamente   desidratação em série alcoólica desnaturar a solução de híbridaç o a 100 C por um período de 10 min e pass -la imediatamente ao gelo; desnaturar o DNA cromossômico com formamida 70% em 2xSSC a 70 C por 5 min; desidratar o material em série alcoólica 70, 85 e 100% durante 5 min cada (Obs. A série alcoólica deverá estar a -20 C); Preparar uma câmara úmida a 37 C (IMPORTANTE); Montar cada lâmina com 50 µl de solução de híbridaç o, cobrir com lamínula, colocar na câmara úmida e deixar overnight numa estufa a 37 C ; No dia seguinte, lavar 2 vezes em formamida 15%/0,2xSSC pH 7.0 a 42  C durante 10min cada (agitando); Lavar as lâminas 3 vezes em 0,1xSSC a 60 C, por 5 min cada (agitando); Lavar durante 5 min em solução de Tween 0,5%/4xSSC, ambiente (Shaker); Incubar as lâminas em tampão 5% NFDm/4xSSC por 15 minutos; Lavar 2X 5 min com Tween 0,5%/4xSSC, ambiente (Shaker); Incubar as lâminas com 100 µl de anti digoxigenina rodamina conjugada (5 µl Anti digoxi rodamina/995 µl NFDm) durante 1 h em câmara úmida e escura, a temperatura ambiente; Lavar 3 x 5min com Tween 0,5%/4xSSC, ambiente (Shaker); Desidratar em álcool 70, 85 e 100%, 5 min. cada

(secar); em seguida, montar as lâminas com solução de DAPI + Antifading (Vectashield Mounting Medium with DAPI, 1,5µg/ml), colocar 30 µl da mistura e cobrir com lamínula. Guardar no escuro. OBS: Essas lâminas foram lavadas novamente duas vezes em 2xSSC por 10 minutos e 3x em Tween 0,5%/4xSSC, ambiente (Shaker), para retirar o excesso de precipitado das lâminas, e estas foram coradas novamente e as mesmas metáfases fotografadas.

#### *3.4.8 Análises Cariotípicas*

As preparações cromossômicas convencionais, com fluorocromos e com hibridação in situ fluorescente foram analisadas em fotomicroscópio óptico (Olympus BX61), estabelecendo-se o número diplóide modal (contagem mínima de 30 metáfases cromossômicas por indivíduo) presente em cada população/espécie amostrada no presente trabalho e as melhores metáfases foram capturadas com software Image Pro Plus, 6.0 (MediaCybernetics). Os fluorocromos foram capturados separadamente (utilizando filtros UV específicos) coloridos e sobrepostos no mesmo software Image Pro Plus, 6.0 (MediaCybernetics).

Os cromossomos foram recortados usando software Adobe Photoshop versão 11.0-Adobe System e organizados em pares de homólogos para a montagem dos cariótipos, sendo classificados em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a), com base no trabalho de Levan *et al.*, (1964) e organizados em classes e ordem decrescente de tamanho.

#### **4. Resultados e Discussão**

As informações obtidas dos estudos citogenéticos e moleculares efetuados em espécies e populações de *Moenkhausia* resultaram em artigos científicos que são apresentados a seguir, na forma de capítulos.

## Capítulo 1

Estrutura cromossômica e mapeamento físico dos genes ribossomais 18S e 5S em *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Teleostei, Characiformes, Characidae).

## Resumo

Análises citogenéticas foram realizadas em *Moenkhausia sanctaefilomenae* população do ribeirão Araquá, região de Botucatu-SP, pertencente à bacia do rio Tietê, evidenciando um cariótipo composto por  $2n=50$  cromossomos dos tipos metacêntricos e submetacêntricos e  $NF=100$ , além da presença de cromossomos B, variando inter ou intraindividualmente. Foram utilizadas nos exemplares, técnicas citogenéticas básicas (coloração com Giemsa, localização das RONS pela marcação com nitrato de Prata e bandamento C) e moleculares (marcação por fluorocromos base-específicos, hibridação *in situ* fluorescente com sondas de DNAr 18S e 5S), com o intuito de verificar as particularidades pertinentes a distribuição da heterocromatina e também aos cromossomos B. Os resultados identificados pela Prata, pela  $CMA_3$  e pela sonda de DNAr 18S evidenciaram marcações correspondentes as RONS, além de outras marcações nos cromossomos do complemento A e também nos cromossomos B que não foram marcados com a Prata, podendo indicar a existência de rearranjos ocorridos em relação ao genes ribossomais. O DNAr 5S foi localizado em dois pares cromossômicos na região centromérica e a análise da heterocromatina constitutiva, através do bandamento C, revelou marcações pericentroméricas na maioria dos cromossomos, outras marcações na região centromérica e telomérica dos cromossomos do complemento A, além da presença de cromossomos B eucromáticos e heterocromáticos. As características citogenéticas observadas no genoma desta espécie tornam-se um modelo interessante para estudos moleculares posteriores.

## Introdução

Os peixes da ordem Characiformes constituem o grupo mais representativo em número de espécies conhecidas na região Neotropical (Artoni *et al.*, 2000), apresentando-se ecológica e morfológicamente diversificado, com um padrão evolutivo e biogeográfico complexo (Orti & Meyer, 1997). Foi proposto recentemente que a subfamília Tetragonopterinae seja representada apenas pelo gênero *Tetragonopterus* (Reis, 2003), sendo os demais gêneros listados como “Incertae Sedis” em Characidae (Lima *et al.*, 2003), incluindo o gênero *Moenkhausia*.

A taxonomia da família Characidae tem se apresentado controversa devido à dificuldade de se estabelecer grupos que realmente tenham uma origem monofilética, diferentemente do que ocorre com outros Characiformes como os Anostomidae, Curimatidae, Prochilodontidae e Chilodontidae (Vari, 1983). Apesar dos dados citogenéticos serem escassos para esta subfamília, uma característica que se destaca nas espécies do gênero *Moenkhausia* é a variação do número diplóide entre  $2n=48$  e  $2n=50$ , além de variações interespecíficas quanto à presença de cromossomos B (Foresti *et al.*, 1989). Informações sobre as características cromossômicas deste gênero revelam um cariótipo numericamente pouco diferenciado como em *M. pittieri* (Post, 1965; Scheel, 1973); *M. sanctaefilomenae* (Foresti *et al.*, 1989, Portela-Castro, 1999); *M. intermedia* (Portela-Castro, 1999); *M. costae* (Portela *et al.*, 1988; Pfister, 1997; Portela-Castro, 1999); *M. dichoura* (Miyazawa, 1997) e *M. gracilima* (Santos, 1999).

Entre os representantes do gênero *Moenkhausia* o número diplóide mais frequente é  $2n=50$  cromossomos, com o número de braços cromossômicos (número fundamental - NF) variando de 88 a 100. Embora diversas espécies possuam cariótipos bastante simétricos, algumas divergências são apresentadas em citótipos com  $2n=49$  cromossomos em *Moenkhausia pittieri* e  $2n=48$  cromossomos em *Moenkhausia gracilima* (Portela-Castro & Júlio-Jr, 2002). De acordo com Arefjev (1990), os dados obtidos em *M. pittieri* mostraram a heterogeneidade presente no gênero, evidência em contraposição à idéia da ocorrência de um conservadorismo cariotípico restrito sugerido para o gênero *Moenkhausia*. Dados citogenéticos no gênero *Moenkhausia* indicam ainda diferentes tendências na diversificação cariotípica durante o seu processo de evolução.

Entre os representantes do gênero *Moenkhausia* a presença de cromossomos B se destaca como uma característica determinante de variação interespecífica (Foresti *et al.*, 1989). Embora estes elementos genômicos sejam caracterizados por apresentarem

menor tamanho em relação ao dos cromossomos do complemento normal e sejam geralmente de natureza heterocromática na maioria das espécies (Pauls & Bertollo, 1990; Salvador & Moreira-Filho, 1992; Vênere, Miyazawa & Galetti Jr, 1999), descrições de cromossomos supranumerários eucromáticos também foram relatadas (Oliveira & Foresti, 1993; Vênere, Miyazawa & Galetti Jr, 1999; Vissoto, Foresti e Oliveira, 1999), ou parcialmente heterocromáticos (Hochberg & Erdtmann, 1988; Fenocchio & Bertollo, 1990). Apesar da falta de conhecimento sobre os mecanismos moleculares que norteiam a evolução deste tipo de cromossomos nas espécies, a aplicação de diferentes técnicas de identificação cromossômica tem auxiliado na caracterização dos cromossomos B em diferentes organismos e no entendimento dos processos relacionados à sua função e origem (Maistro, Oliveira & Foresti, 2000).

O presente trabalho teve como objetivo o estudo citogenético de uma população de *Moenkhausia sanctaefilomenae*, proveniente do ribeirão Araquá, Bacia do Rio Tietê, município de Botucatu-SP, Brasil, com enfoque principal nas particularidades relacionadas aos cromossomos supranumerários. As informações obtidas poderão contribuir para o melhor entendimento da estrutura genômica dos peixes e dos cromossomos supranumerários, assim como dos mecanismos envolvidos no processo de diferenciação cromossômica em *Moenkhausia sanctaefilomenae*.

## **Materiais e Métodos**

Foram analisados 30 exemplares de peixes (15 machos e 15 fêmeas) da espécie *Moenkhausia sanctaefilomenae*, coletados no ribeirão Araquá na região de Botucatu-SP, componente da bacia hidrográfica do Rio Tietê. Todos os exemplares coletados foram fixados em formol 10% e posteriormente conservados em álcool 70%, identificados e mantidos na coleção de peixes do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes da UNESP de Botucatu-SP, Brasil.

As preparações de cromossomos mitóticos foram obtidas de tecido renal utilizando-se a técnica referida em Foresti *et al.*, (1981). A marcação das Regiões Organizadoras de Nucléolos (RONs) pelo nitrato de Prata foi realizada de acordo com a técnica proposta por Howel e Black (1980) e o bandamento C foi realizado seguindo o protocolo estabelecido por Sumner (1972).

Na análise citogenética molecular foram utilizados os métodos de identificação de regiões cromossômicas ricas em GC com o uso do fluorocromo Cromomicina A<sub>3</sub> (Schweizer, 1976). O mapeamento dos sítios de DNAr 18S e 5S nos cromossomos metafásicos foi realizado por hibridação *in situ* fluorescente (FISH), de acordo com o procedimento estabelecido por Pinkel *et al.*, (1986), com algumas adaptações.

A sonda de DNAr 18S foi obtida por PCR (Polymerase Chain Reaction) a partir do DNA total de *Moenkhausia sanctaefilomenae*, usando os primers 18S F (5'CCG CTT TGG TGA CTC TTG AT 3') e 18S R (5'CCG AGG ACC TCA CTA AAC CA 3'). Esta sonda foi marcada com Biotina-16-dUTP (Roche Applied Science) e a detecção do sinal de hibridação foi realizada usando Avidina-fluoresceína conjugada (FITC).

A sonda de DNAr 5S foi obtida por PCR (Polymerase Chain Reaction) a partir do DNA total de *Moenkhausia sanctaefilomenae*, usando os primers 5S F (5'TAC GCC CGA TCT CGT CCG ATC 3') e 5S R (5'CAG GCT GGT ATG GCC GTA ACG 3'). Esta sonda foi marcada com Digoxigenina-11-dUTP (Roche Applied Science) e a detecção do sinal de hibridação foi realizada usando anti-digoxigenina-rodamina (Roche Applied Science).

Os cromossomos metafásicos foram contracolorados com DAPI e analisados em fotomicroscópio Olympus BX61. As imagens foram capturadas usando o programa Image Pro Plus 6.0 softwares (Media Cybernetics). A morfologia cromossômica foi determinada de acordo com a relação de braços estabelecida por Levan *et al.*, (1964), sendo os cromossomos classificados como metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelo-cêntricos (st) e acrocêntricos (a) e arranjados no cariótipo em ordem decrescente de tamanho.

## **Resultados e Discussão**

As análises citogenéticas em *Moenkhausia sanctaefilomenae* revelaram número diplóide de  $2n=50$  cromossomos e número fundamental  $NF=100$  em todos os exemplares analisados, confirmando dados obtidos anteriormente por Foresti *et al.*(1989), Alberdi & Fenocchio (1997) e Portela-Castro (2001). Não foram evidenciadas diferenças cariotípicas entre machos e fêmeas, sendo o cariótipo composto por 3 pares de cromossomos metacêntricos e 22 pares de cromossomos



submetacêntricos (Figura 1). Em alguns exemplares, foi constatada a presença de até seis microcromossomos B.

A ocorrência de variação inter e intraindividual destes elementos genômicos é coincidente com resultado similar obtido por Foresti *et al.* (1989), que verificaram a presença de até 8 microcromossomos B em exemplares de *M. sanctaefilomenae* provenientes do ribeirão Capivara, Botucatu-SP, outro componente da bacia hidrográfica do Rio Tietê. Esta variação foi identificada em diferentes populações desta espécie, sendo que em indivíduos da população do Rio Paraná estudado por Portela-Castro (2001) foram encontrados apenas dois microcromossomos B.

Cromossomos supranumerários ou B podem ser encontrados entre as espécies de diferentes famílias de Characiformes, como em Prochilodontidae (Pauls e Bertollo, 1983; Maistro *et al.*, 2000; Oliveira *et al.*, 2003), Parodontidae (Falcão *et al.*, 1984), Curimatidae (Vênere e Galetti Jr., 1985, De Rosa *et al.*, 2008) e principalmente entre os Characidae (Foresti *et al.*, 1989, Salvador & Moreira-Filho, 1992, Neo *et al.*, 2000, Ferro *et al.*, 2003, Dantas *et al.*, 2007, Sobrinho-Scudeler *et al.*, in prep), bem como entre os Siluriformes, nas famílias Loricariidae (Scavone e Ferreira Julio Jr. 1993) e Pimelodidae (Dias e Foresti, 1993, Carvalho e Dias, 2005).

A presença de 2 e 3 microcromossomos B foi caracterizada como número modal nas células de *M. sanctaefilomenae* está representado na (Tabela 1), embora a amplitude da variação encontrada para estes elementos supranumerários tenha sido de até 8 cromossomos B (Foresti *et al.*, 1989). Nos indivíduos analisados no presente estudo a variação encontrada foi de 0 a 6 microcromossomos supranumerários, com a maior parte dos indivíduos apresentando 2 ou 3 cromossomos B. Esta tendência poderia estar representando um efeito adaptativo e controlador de um número ideal de cromossomos B nas células desta espécie. Resultado semelhante foi obtido por Oliveira *et al.*, (1997), que observaram uma estabilidade modal entre 2 e 3 elementos extras nas análises da frequência de cromossomos B nas células de *Prochilodus lineatus*. A alta frequência de indivíduos portadores de cromossomos B verificada em *M. sanctaefilomenae* parece estar relacionada à história evolutiva deste grupo, segundo Portela-Castro (2001). Variações no número de cromossomos B entre diferentes células de um mesmo indivíduo poderiam ser atribuídas à ação de mecanismos de não-disjunção mitótica de cromossomos autossomos ou sexuais, seguidas de processo de inativação genética (Volubujev, 1981).

A impregnação das regiões organizadoras nucleolares com nitrato de Prata revelou a ocorrência de de RONS múltiplas nos indivíduos analisados nesta espécie, corroborando dados obtidos por Foresti *et al.*, (1989). Os cístrons foram localizados de modo constante em dois pares de cromossomos, sendo identificados na região terminal do braço curto dos cromossomos do par 15 e também na região terminal do braço curto dos cromossomos do par 13, sendo esta marcação frequentemente observada em apenas um dos homólogos (Figura 2). Neste par cromossômico, algumas células apresentaram a marca na região terminal do braço longo de cromossomo do tipo submetacêntrico (Figuras 2 e 3). Tais resultados diferem da descrição feita por Portela-Castro (2002), que caracterizou um sistema de RONS simples em exemplares desta espécie capturados no Rio Paraná. Esta característica já havia sido observada por Portela *et al.*, (1988) e Pfister, (1997) em outras espécies deste gênero, *Moenkhausia intermedia* e *M. costae*. A aplicação desta técnica não revelou a presença de RONS ativas nos microcromossomos B nos indivíduos analisados (Figura 4), reforçando os resultados obtidos por Foresti *et al.*, (1989) e Portela-Castro (2001).

A identidade específica das regiões nucleolares em peixes tem auxiliado na caracterização cariotípica de diversas espécies. Em alguns grupos é marcante a ocorrência de RONS simples, como entre os representantes das famílias Curimatidae, Anostomidae, Paradontidae e Prochilodontidae, enquanto que em outros prevalece a ocorrência de RONS múltiplas, caracterizadas em representantes das famílias Calichthyidae, Characidae e Erythrinidae.

A marcação cromossômica por fluorocromos GC-específicos tem sido comumente associada à identificação das RONS. Embora a coloração por Prata detecte somente RONS transcricionalmente ativas na interfase precedente (Hsu *et al.*, 1975), fluorocromos GC-específicos como a CMA<sub>3</sub> revelam regiões da cromatina ricas em bases GC (Schmid & Guttenbach 1988), geralmente presentes nas RONS em peixes e anfíbios (Mayr *et al.*, 1986; Schmid & Guttenbach 1988; Phillips & Hartley 1988; Galetti & Rasch 1993; Mestriner *et al.*, 1995). O tratamento com fluorocromo CMA<sub>3</sub> evidenciou sinais característicos relacionados aos segmentos correspondentes às RONS de modo constante na região terminal do braço curto nos cromossomos do par 15 submetacêntrico e na região terminal do braço longo de cromossomos do par 7 submetacêntrico (Figura 5), também evidenciados pela impregnação com nitrato de Prata (Ag-NO<sub>3</sub>). Também foi possível observar sinais fluorescentes com baixa

intensidade na região telomérica e pericentromérica de outros cromossomos do conjunto genômico. Esta verificação de que as bandas constantes e mais conspícuas obtidas com esse corante correspondiam às RONS marcadas pelo nitrato de Prata também já haviam sido relatadas em estudos realizados por Amemiya e Gold (1986), Wasko (1996), Portela-Castro (1999), Paintner-Marques (2002) e Ferro (2003). Contudo, marcação positiva foi identificada em um dos microcromossomos B (Figura 6), diferindo dos dados obtidos por Portela-Castro (2001) que não verificou diferenciação nos cromossomos B presentes nas metáfases analisadas desta espécie, sugerindo ausência de sequências ricas em GC nestes cromossomos. Em *Prochilodus lineatus* também não foram observados sinais positivos nos cromossomos B existentes nas células analisadas (Maistro, Oliveira e Foresti, 2000).

A coincidência de localização entre as marcações obtidas pela aplicação de fluorocromos GC-específicos e as resultantes da impregnação por nitrato de Prata, seria possível, segundo Pendás *et al.* (1993), devido à provável ocorrência de alto conteúdo de bases GC nas regiões espaçadoras dos genes ribossomais ou entre sequências de DNA repetitivo adjacentes a estas regiões cromossômicas. A aplicação desta técnica, de certo modo, permitiria a identificação das RONS independentemente de sua atividade durante o ciclo celular precedente. Contudo, a verificação do fato de que as RONS podem não se mostrar positivamente coradas por CMA<sub>3</sub>, conforme descrito por (Morelli, 1998; Fontana *et al.*, 1998), entre outros, descarta a interpretação definitiva de composição específica rica em GC para estes segmentos cromossômicos. Além disso, regiões livres de DNAr também podem ser evidenciadas pelo nitrato de Prata provavelmente em decorrência da presença de proteínas ricas em resíduos acídicos (Sumner, 1990; Dobigny *et al.*, 2002).

A aplicação da técnica de hibridação *in situ* fluorescente, utilizando sondas de DNAr 18S e 28S, tem permitido confirmar com precisão a localização das regiões organizadoras de nucléolos em cromossomos fixados de vários vertebrados, incluindo anfíbios, mamíferos (Long e David, 1980) e peixes (Pendás *et al.*, 1993 a, b; Viñas *et al.*, 1996; Abuín *et al.*, 1996; Martínez *et al.*, 1996; Gornung *et al.*, 1997; Martins & Galetti, 1998; Mantovani *et al.*, 2005; Gromicho *et al.*, 2005; Gromicho *et al.*, 2006), entre outros. Deste modo, a expressão e organização de genes para RNA ribossômicos codificantes (RNAr) têm sido extensivamente estudadas. Esses genes ocorrem em muitos organismos na forma de sequências repetitivas organizadas em *tandem*, na qual

cada segmento é composto de uma região codificante do gene, mais um espaçador que separa o primeiro gene do próximo. Em eucariotos superiores, tais genes encontram-se organizados em duas famílias multigênicas distintas e definidas como DNAr 45S e DNAr 5S (Long e David, 1980).

O DNA ribossômico maior 45S compreende os genes que codificam os RNAs 18S, 5,8S e 28S, os quais se encontram separados por espaçadores internos transcritos (ITS1 e ITS2) e flanqueados pelos espaçadores externos (ETS1 e ETS2) e não transcritos (NTS) (Long e David, 1980). Tais genes são organizados como cópias múltiplas em áreas cromossômicas específicas denominadas regiões organizadoras de nucléolos (RONs). O menor, por sua vez, é representado por uma família gênica que codifica o RNA ribossômico 5S. Ao contrário dos outros DNAs ribossomais, este não está envolvido com a formação dos nucléolos, sendo a hibridação *in situ* o único procedimento disponível para localizar cromossomicamente estes segmentos genômicos (Pendás *et al.*, 1994).

A crescente utilização dos marcadores de DNA ribossômico em estudos com peixes visando o mapeamento e localização cromossômica dos genes para RNA ribossômico maiores (45S), teve início principalmente com espécies de Salmoniformes (Pendás *et al.*, 1993 a, b; Almeida-Toledo *et al.*, 2002; Morán *et al.*, 1996; Abuín *et al.*, 1996; Fujiwara *et al.*, 1998; Sadjak *et al.*, 1998), sendo atualmente aplicada também às espécies Neotropicais (Jesus e Moreira-Filho, 2003, Vicari *et al.*, 2003 e 2006, Hatanaka e Galetti Jr., 2004, Mantovani *et al.*, 2005, Peres *et al.*, 2008, Diniz *et al.*, 2009). A caracterização da sequência nucleotídica do DNAr 5S também restringe-se ainda a poucas espécies (Pendás *et al.*, 1995; Sadjak *et al.*, 1998; Martins *et al.*, 2000; Almeida-Toledo *et al.*, 2002). Assim, a ampliação de estudos envolvendo estes marcadores mostra-se de grande interesse, tanto para ampliar conhecimentos sobre estes segmentos repetitivos de DNA, quanto pela sua utilização como elementos reveladores das alterações estruturais nos cromossomos e seu papel no processo de diversificação das espécies.

A exata localização, classificação e quantificação de cístrons ribossomais em *M. sanctaefilomenae* foi possível com a utilização de sonda de DNAr 18S. A aplicação da técnica de hibridação *in situ* confirmou a descrição feita através da impregnação pelo nitrato de Prata, de marcação de modo constante na região terminal do braço curto nos cromossomos do par 15, além de outra marcação bem evidente na região terminal do

braço longo do par 4 do tipo submetacêntrico, além da presença de cístrons ribossômicos nos cromossomos B nas metáfases analisadas (Figura 7), confirmando dados obtidos por Dantas *et al.*, (2007) que também verificaram a presença de marcações nos cromossomos B de *M. sanctaefilomenae*. A ocorrência de cístrons múltiplos pode indicar a ação de possíveis rearranjos cromossômicos agindo no sentido de transpor e dispersar sítios de DNAr no genoma dessa espécie.

O mapeamento cromossômico de sequências ribossomais de DNAr 5S tem se mostrado uma ferramenta interessante em estudos de evolução cariotípica em peixes (Martins, 2006). Esta técnica também foi empregada para a localização de cístrons de DNAr 5S nos cromossomos de *M. sanctaefilomenae*, sendo utilizada como sonda um dos produtos de PCR obtidos pela amplificação do DNAr 5S que identificou marcações fluorescentes localizadas na região pericentromérica de dois pares de cromossomos (pares 1 e 7) (Figura 7). Não foram verificadas marcações com esta sonda nos cromossomos B desta espécie.

Os genes RNAr 5S encontram-se geralmente localizados em vários cromossomos, sendo este padrão disperso o mais comumente observado em espécies de peixes (Martins e Wasko, 2004) e resultados que comprovam este comportamento também foram obtidos em diferentes espécies de peixes Characiformes. Em *Leporinus* os genes ribossomais 5S estão localizados em um pequeno par de cromossomos metacêntricos e num par cromossômico de tamanho médio (Martins e Galetti, 1999), do mesmo modo que em diferentes espécies de *Astyanax* (Almeida-Toledo *et al.*, 2002). Considera-se, pois, que o estudo do DNA ribossômico representa uma importante fonte de informações para a compreensão da dinâmica dos genes repetitivos nos peixes, particularmente para a ictiofauna sul-americana (Martins, 2000).

O estudo da heterocromatina constitutiva permitiu a caracterização de blocos bem definidos nas regiões centroméricas e pericentroméricas de diversos cromossomos do complemento cariotípico, corroborando trabalhos de Foresti *et al.*, (1989) e Portela-Castro (2001), além de blocos na região telomérica em alguns cromossomos (Figura 8). Os microcromossomos B mostraram-se tanto eucromáticos quanto heterocromáticos (Figura 9). Estudos realizados por Portela-Castro (2001) revelaram microcromossomos B de *M. sanctaefilomenae* de indivíduos provenientes do rio Paraná fracamente marcados pelo bandamento C. Este resultado coincide em parte com os dados obtidos por Foresti *et al.*, (1989), demonstrando que os cromossomos B de *M. sanctaefilomenae*

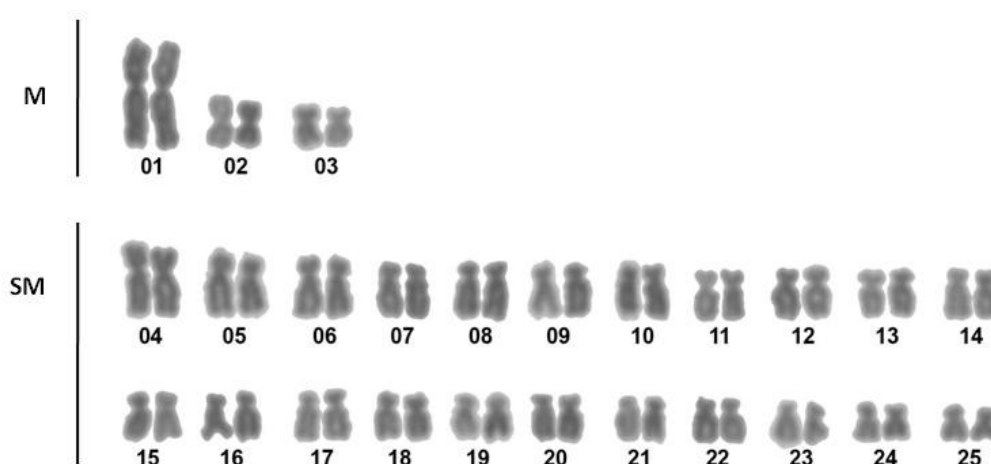
do ribeirão Capivara, Botucatu-SP não eram todos banda-C positivos; alguns se apresentaram heterocromáticos e outros eucromáticos. A característica heterocromática frequentemente encontrada para os cromossomos supranumerários tem sido reforçada em diferentes espécies. Em *Alburnus alburn* a heterocromatina constitutiva pôde ser visualizada pelo bandamento C ao longo de todo o cromossomo B (Schmid *et al.*, 2006), do mesmo modo que o macrocromossomo B identificado em *Astyanax scabripinnis* (Maistro *et al.*, 2001), que também mostrou-se totalmente heterocromático.

O papel da heterocromatina na diversificação cromossômica pode estar relacionado diferentes eventos estruturais, determinando polimorfismos cromossômicos, como observado em *Diplodus bellotti* (Amores *et al.*, 1993) e *Astyanax scabripinnis* (Mantovani *et al.*, 2000); à diferentes composições moleculares desta porção do genoma, como identificado em *Astyanax scabripinnis* (Souza *et al.*, 1996) e *Leporinus desmotes* (Margarido & Galetti 2000); à diferenciação e formação de cromossomos sexuais, como observado em diversas espécies do gênero *Leporinus* (Galetti & Foresti, 1987), *Pseudotocinclus tietensis* (Andreatta *et al.* 1992), espécies do gênero *Characidium* (Maistro *et al.*, 1998; Centofante *et al.*, 2001; Pansonato Alves *et al.*, 2010) e *Triportheus* (Artoni *et al.*, 2001; Diniz *et al.*, 2008) sendo relacionado também à ocorrência de cromossomos supranumerários, como observado em *M. sanctaefilomenae* (Foresti *et al.*, 1989), *Microlepidogaster leucofrenatus* (Andreatta *et al.*, 1993), *Prochilodus lineatus* (Oliveira *et al.*, 1997; Jesus *et al.*, 2003, Artoni *et al.*, 2006), *A. scabripinnis* (Neo *et al.*, 2000; Mestriner *et al.*, 2000) e espécies de *Characidium* (Pansonato Alves *et al.*, 2010).

Portanto, o trabalho foi desenvolvido com o objetivo de verificar particularidades associadas aos cromossomos B, podendo resultar em informações de grande importância para melhor compreensão da origem e dinâmica desse tipo de cromossomo no genoma das espécies do gênero *Moenkhausia*.

## **Referências Bibliográficas**

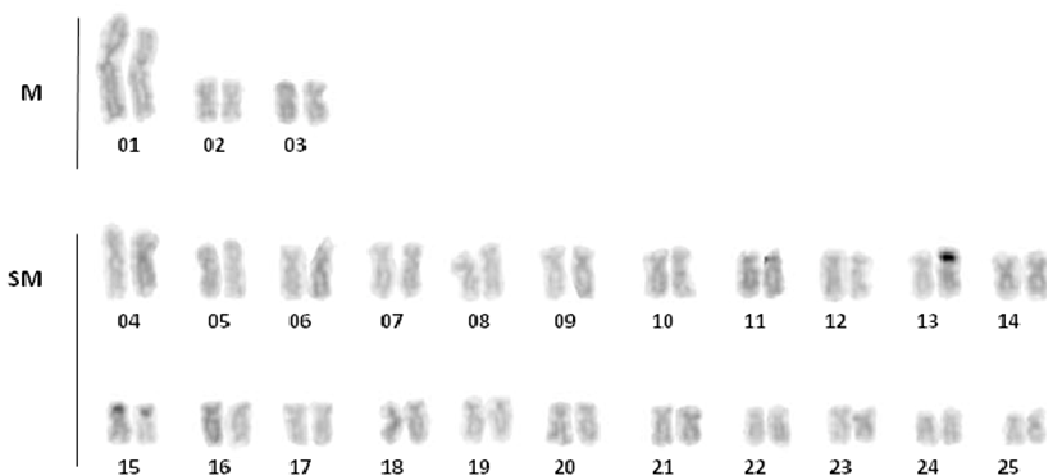
As referências correspondentes a este capítulo encontram-se no final desta tese.



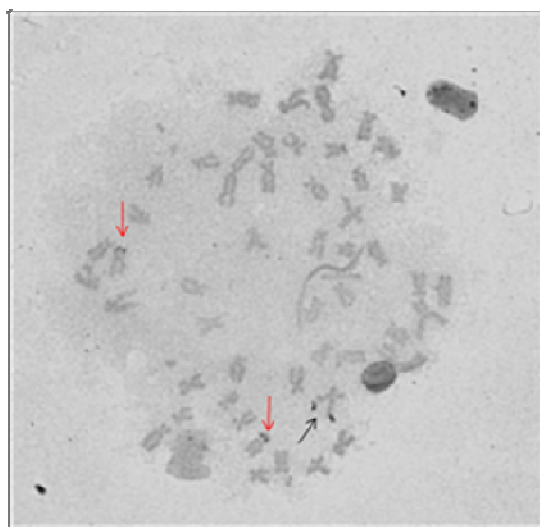
**Figura 1:** Cariótipo de um exemplar de *Moenkhausia sanctaefilomenae*, submetido à coloração convencional por Giemsa ( $2n=50$ ).

Número total de indivíduos analisados	Número diplóide e ocorrência de cromossomos B							Total de células analisadas
	$2n=50+0B$	$2n=50+1B$	$2n=50+2B$	$2n=50+3B$	$2n=50+4B$	$2n=50+5B$	$2n=50+6B$	
30	40	191	254	228	133	38	16	900
%	4,44%	21,22%	28,23%	25,33%	14,77%	4,23%	1,78%	100%

**Tabela 1:** Número de cromossomos B encontrado em células metafásicas de 30 exemplares de *Moenkhausia sanctaefilomenae* provenientes do ribeirão Araquá, região de Botucatu-SP.

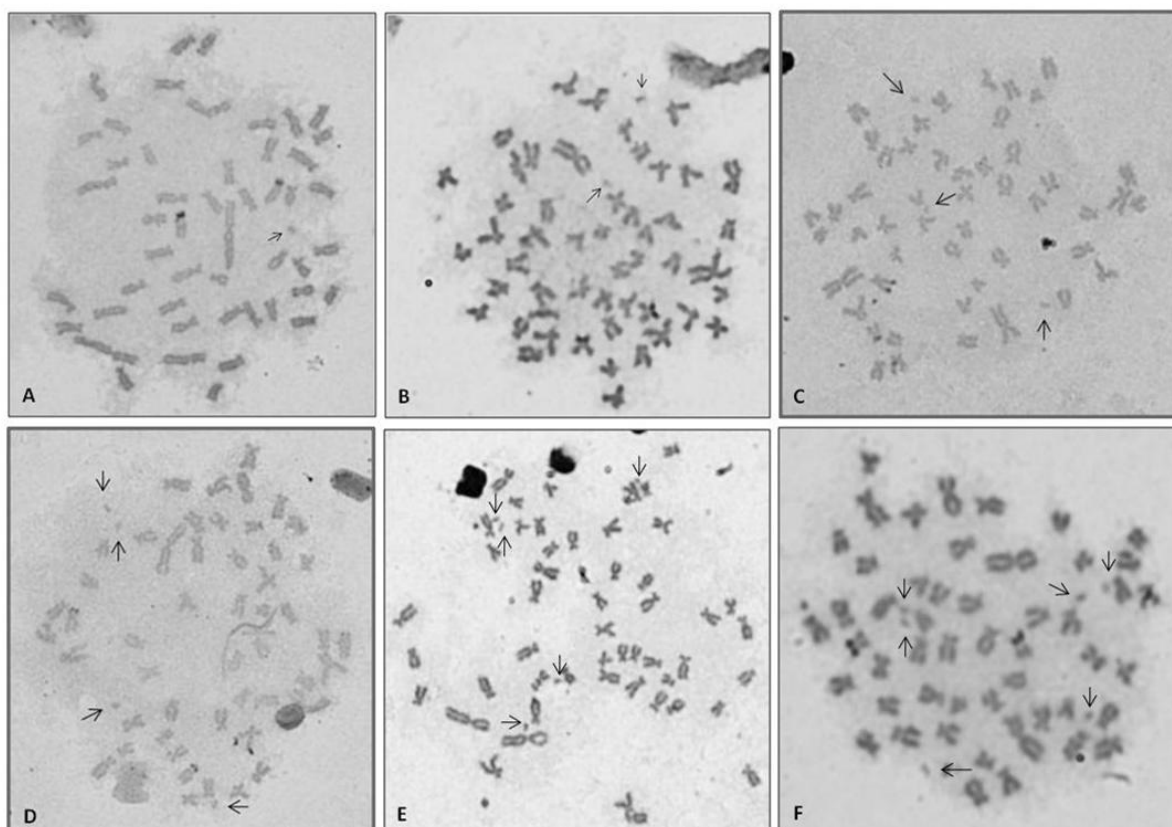


**Figura 2:** Cariótipo de exemplar de *Moenkhausia sanctaefilomenae* submetido à coloração por nitrato de Prata. Podem ser observadas marcações nos cromossomos dos pares 13 e 15 cromossomos.

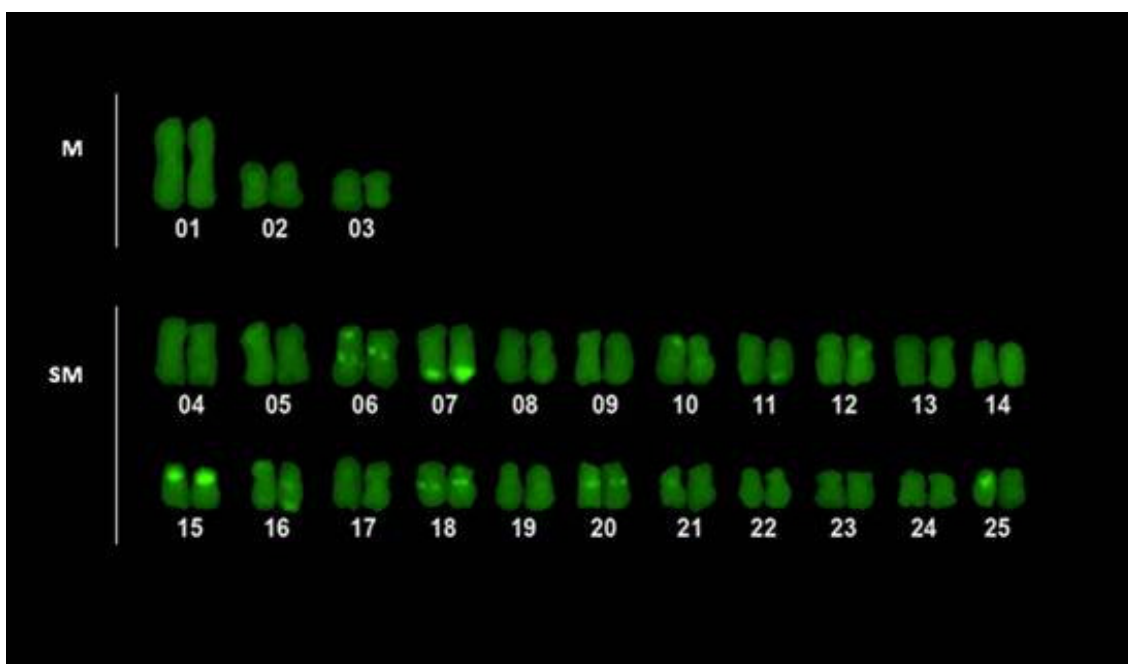


**Figura 3:** Metáfase de exemplar de *Moenkhausia sanctaefilomenae* submetido à coloração por nitrato de Prata ( $\text{Ag-NO}_3$ ). Setas em vermelho indicam cromossomos portadores da NOR de modo constante na região terminal do braço curto e a seta em preto indica apenas um dos homólogos com marcação na região terminal do braço longo.

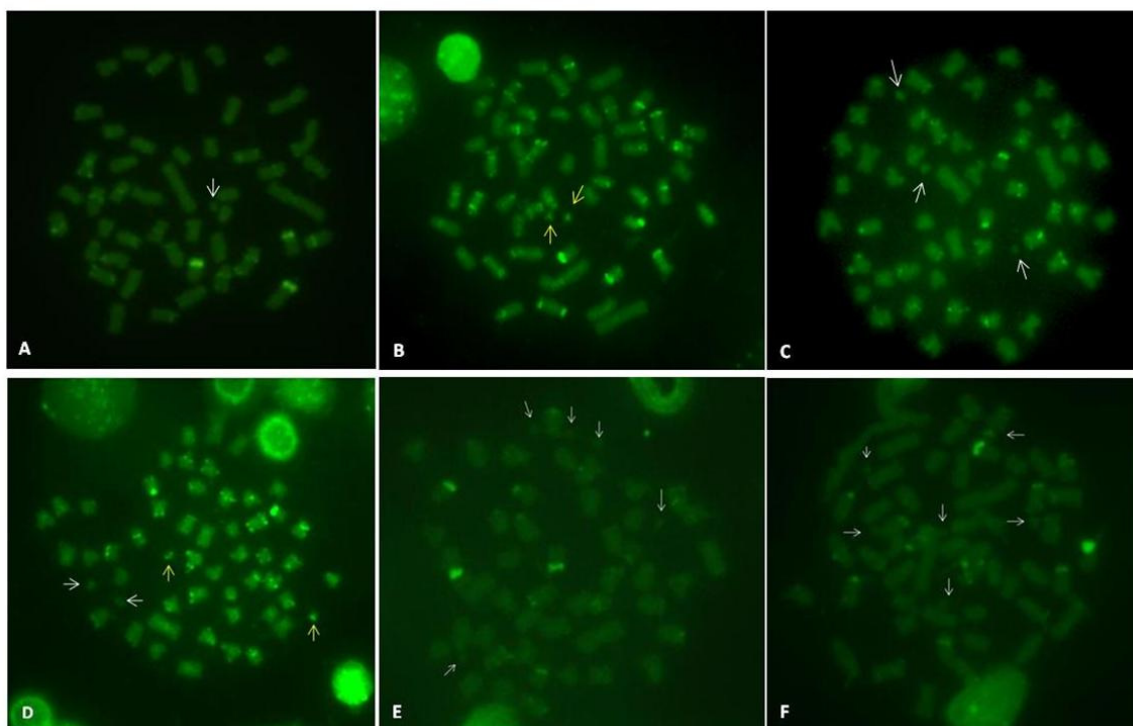




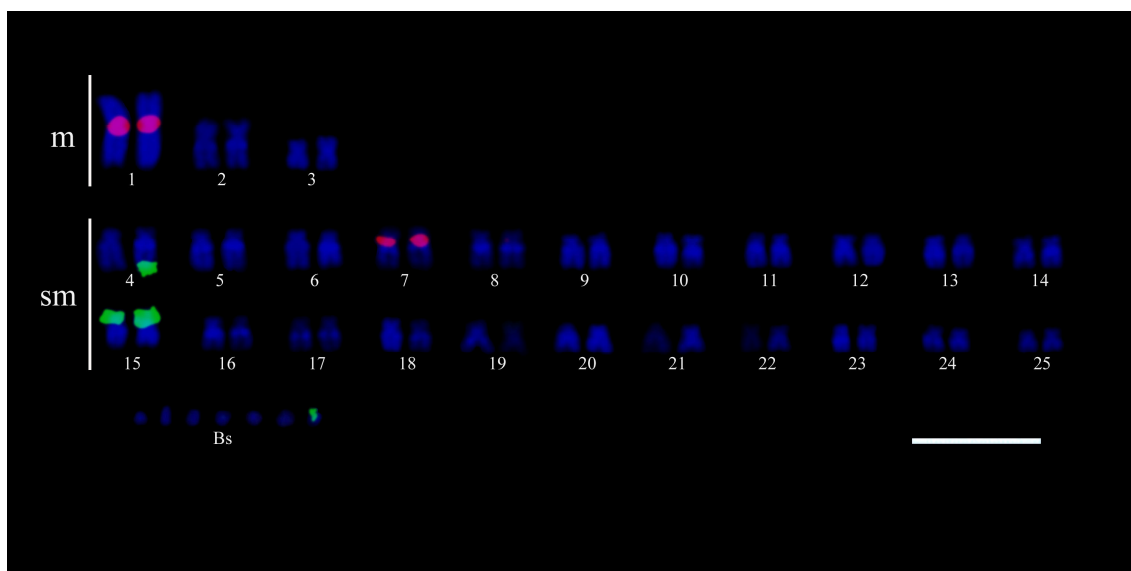
**Figura 4:** Metáfases de exemplares de *Moenkhausia sanctaefilomenae* (A, B, C, D, E e F) submetidos à coloração por nitrato de Prata. Setas indicam a presença de microcromossomos B, sem marcação.



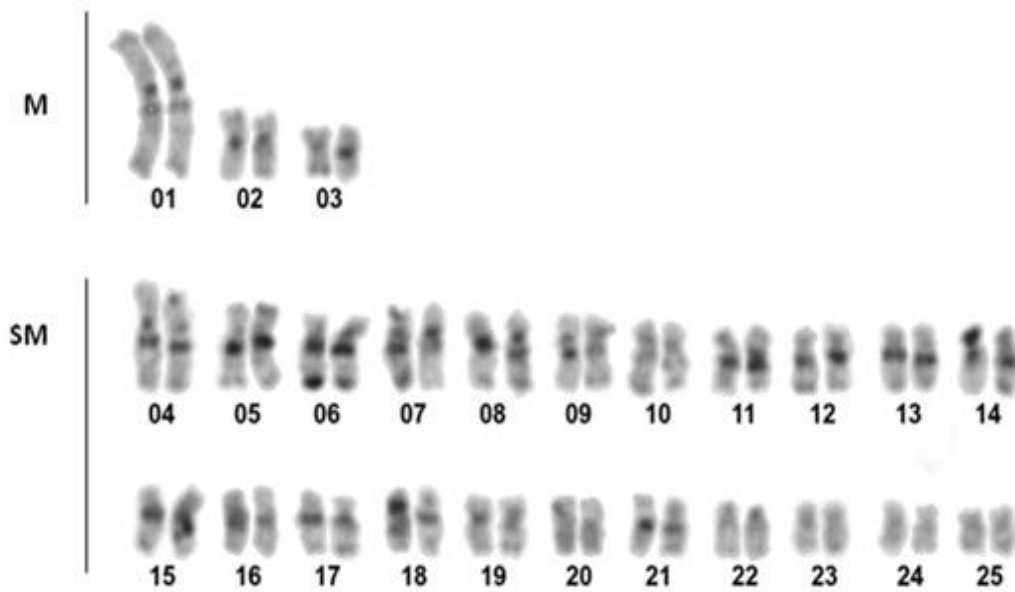
**Figura 5:** Cariótipo de um exemplar de *Moenkhausia sanctaefilomenae*, evidenciando regiões ricas em GC.



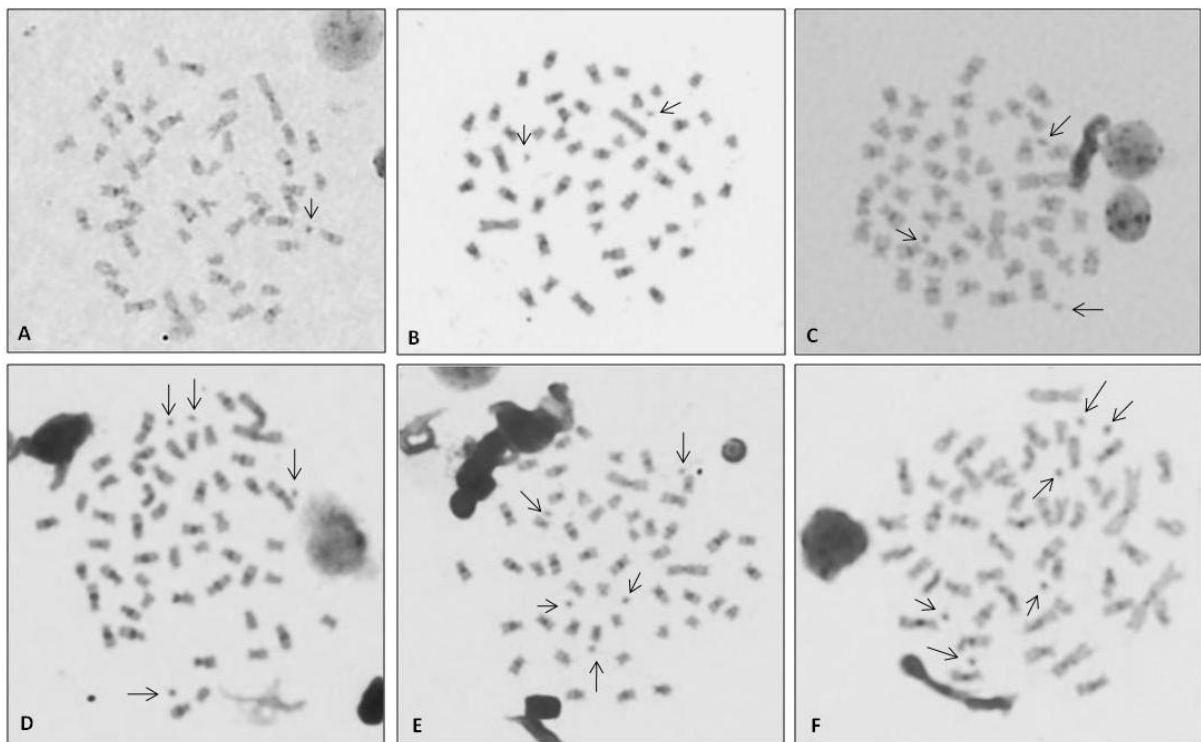
**Figura 6:** Metáfases de exemplares de *Moenkhausia sanctaefilomenae* (A, B, C, D, E e F), evidenciando regiões ricas em GC nos cromossomos do complemento padrão. Setas cheias indicam possíveis sinais nos microcromossomos B e setas normais indicam cromossomos B sem regiões reativas ao fluorocromo CMA<sub>3</sub>.



**Figura 7:** Cariótipo de um exemplar de *Moenkhausia sanctaefilomenae*, com a aplicação da técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) evidenciando em vermelho cístrons ribossomais de DNAr 5S e em verde de DNAr 18S. Notar marcação com a sonda 18S em um dos cromossomos B e heterogeneidade de marcação no quarto par cromossômico.



**Figura 8:** Cariótipo de um exemplar de *Moenkhausia sanctaefilomenae* evidenciando o padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva.



**Figura 9:** Metáfases de exemplares de *Moenkhausia sanctaefilomenae* (A, B, C, D, E e F) evidenciando diferentes padrões de heterocromatina constitutiva, com a presença de microcromossomos B heterocromáticos e eucromáticos.

## Capítulo 2

Distribuição das sequências teloméricas (TTAGGG)<sub>n</sub> em três espécies do gênero *Moenkhausia* (Teleostei, Characiformes, Characidae).

## Resumo

Os estudos de sequências teloméricas têm fornecido novas evidências para a evolução cromossômica, uma vez que os telômeros são regiões de extrema importância para a manutenção da estabilidade e integridade cromossômica. Nesse sentido, estudos citogenéticos envolvendo a distribuição cromossômica das conservadas sequências teloméricas (TTAGGG)<sub>n</sub> em vertebrados foram realizados com a aplicação da técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) em três espécies do gênero *Moenkhausia*, *M. sanctaefilomenae*, *M. cosmops* e *M. oligolepis*. Estas espécies apresentam número diplóide de 2n=50 cromossomos dos tipos metacêntricos e submetacêntricos, juntamente com a ocorrência de pequenos cromossomos supranumerários que apresentam variação intra e interespecífica para os exemplares das populações de *M. sanctaefilomenae*. No presente trabalho, a análise e identificação da distribuição dessas sequências teloméricas poderiam fornecer informações sobre o processo de diversificação cromossômica e evolução cariotípica destas espécies. Sinais evidentes de hibridação foram observados na porção terminal de todos os cromossomos do complemento A nas três espécies, inclusive nos cromossomos B das populações de *M. sanctaefilomenae*. Os dados obtidos permitiram a compreensão de uma parte da evolução cariotípica deste grupo de peixes, fornecendo subsídios para a hipótese de que outros eventos de rearranjos cromossômicos podem estar envolvidos no processo de diversificação cromossômica das espécies devido à grande quantidade de heterocromatina encontrada no genoma das espécies deste gênero.

## Introdução

As porções terminais dos cromossomos dos organismos eucariotos e da molécula de DNA de alguns procariotos são conhecidas como telômeros (Sumner, 2003). As sequências (TTAGGG)<sub>n</sub> do DNA telomérico formam, em associação com proteínas específicas, estruturas altamente especializadas nas extremidades dos cromossomos, que desempenham funções diversas tais como conferir estabilidade e proteger os cromossomos de degradação e recombinação, além de possibilitar a replicação completa das extremidades cromossômicas (Yonenaga-Yassuda, 2004). Portanto, do ponto de vista evolutivo, as sequências teloméricas se tornaram estruturas ideais para estudos relacionados à evolução cromossômica, com envolvimento nas mudanças numéricas e estruturais dos cariótipos de várias espécies de vertebrados (Yonenaga-Yassuda, 2004).

Em estudos realizados por Moyziz *et al* (1988), sequências repetitivas foram inicialmente identificadas em posição terminal dos cromossomos e posteriormente reconhecidas como autênticas sequências teloméricas devido à sua distribuição e localização conservada em todos os vertebrados analisados (Meyne *et al.*, 1990).

Apesar do aspecto conservado dessas sequências, a citogenética tem utilizado as sondas teloméricas (TTAGGG)<sub>n</sub> como importante ferramenta para evidenciar rearranjos cromossômicos. Neste sentido, diversos estudos têm sido realizados em diferentes espécies de vertebrados e têm mostrado que estas sequências ocorrem em posição terminal nos cromossomos, em diferentes sítios intersticiais e também em posição pericentromérica (Meyne, *et al.*, 1990; Garagna *et al.*, 1997; Pagnozzi *et al.*, 2002; Nanda *et al.*, 2002 e 2008). No entanto, sequências teloméricas encontradas em regiões pericentroméricas podem indicar a ocorrência de eventos de fusão cromossômica durante o processo de evolução cariotípica das espécies, podendo estas mesmas sequências, existir como um componente do DNA satélite que geralmente é encontrado nos centrômeros (Nanda *et al.*, 2008).

A maioria dos estudos realizados concentra-se em resultados de hibridações teloméricas aplicadas aos cromossomos do complemento regular, como no caso das espécies de peixe *Gymnotus*, onde a presença de sinais teloméricos intersticiais evidenciou a possível ocorrência de rearranjos cromossômicos, dando indicativos de um processo de fusão recente (Claro, 2008). Marcações teloméricas com a sonda

(TTAGGG) $n$  já foram descritas em cromossomos supranumerários (Peppers *et al.*, 1997; Pansonato-Alves in prep).

Os estudos cromossômicos em *Moenkhausia sanctaefilomenae* têm evidenciado características particulares, apesar dos dados citogenéticos disponíveis indicarem a manutenção no número diplóide de  $2n=50$  cromossomos e número fundamental  $NF=100$  nas populações estudadas. Variações cariotípicas têm sido observadas, quer seja no posicionamento das RONS e na distribuição da heterocromatina constitutiva, como na presença de cromossomos B, com diversificação de número e forma variáveis inter e intraindividualmente (Foresti *et al.*, 1989; Portela-Castro, *et al.*, 2001; Dantas *et al.*, 2007; Sobrinho-Scudeler *et al.*, in prep.).

A partir das peculiaridades acima descritas, o presente estudo tem por objetivo analisar, com uso da hibridação *in situ* fluorescente (FISH), a distribuição de sequências teloméricas nos cromossomos do complemento A e nos cromossomos B das espécies *Moenkhausia sanctaefilomenae*, *M. cosmops* e *M. oligolepis*. Esses dados poderão contribuir para a identificação de possíveis rearranjos cromossômicos ocorridos durante a estruturação cariotípica das espécies, possibilitando uma melhor compreensão do processo de diversificação cromossômica e de evolução cariotípica neste grupo de peixes.

## **Materiais e Métodos**

Neste estudo foram realizados estudos cromossômicos em exemplares de três espécies de peixes do gênero *Moenkhausia*, *Moenkhausia sanctaefilomenae*, *M. cosmops* e *M. oligolepis*. Os indivíduos de *M. sanctaefilomenae* foram coletados no ribeirão Araquá, ribeirão Alambari, ribeirão Capivara, na região de Botucatu-SP; córrego Olaria, região de Penápolis-SP, ribeirão Cubatão, região de Marapoama-SP, todos pertencentes a bacia hidrográfica do Rio Tietê; os exemplares de *Moenkhausia cosmops* foram coletados no Rio Verde e os exemplares de *Moenkhausia oligolepis* foram coletados no rio do Sangue, pertencentes à bacia Amazônica, município de Campo Novo dos Parecis-MT. Os exemplares analisados foram conservados em álcool 95% e após identificação, foram depositados no Museu do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes da UNESP de Botucatu, São Paulo, Brasil.

Nas preparações para obtenção de cromossomos mitóticos foram utilizados fragmentos de tecido renal e brânquias, seguindo-se a técnica descrita por Foresti *et al.*,

(1981). A sonda utilizada para detecção das sequências teloméricas foi amplificada por PCR (Polymerase Chain Reaction) usando primers (TTAGGG)<sub>5</sub> e (CCCTAA)<sub>5</sub>. Esta sonda foi marcada com Digoxigenina-11-dUTP (Roche Applied Science) e os sinais de hibridação foram detectados usando anti-Digoxigenina-Rodamina (Roche Applied Science).

A hibridação *in situ* fluorescente (FISH) em cromossomos metafásicos com sondas produzidas a partir de sequências teloméricas foi realizada com base em procedimentos adotados por Pinkel *et al.* (1986), com pequenas adaptações. Os cromossomos foram contracorados com DAPI e analisados em fotomicroscópio óptico (Olympus BX61). As imagens foram capturadas usando-se o programa Image Pro Plus, 6.0 software (Media Cybernetics).

A morfologia cromossômica foi determinada de acordo com a relação de braços estabelecida por Levan *et al.*, (1964), na qual os cromossomos são classificados como metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a) e arranjados no cariótipo em ordem decrescente de tamanho.

## Resultados

As três espécies de *Moenkhausia* analisadas no presente estudo, *Moenkhausia sanctaefilomenae*, *Moenkhausia cosmops* e *Moenkhausia oligolepis* apresentaram cariótipo com de 2n=50 cromossomos dos tipos metacêntricos e submetacêntricos em seus complementos A, além da presença de cromossomos B em *Moenkhausia sanctaefilomenae*. As espécies *M. cosmops* e *M. oligolepis* não apresentaram cromossomos B em seus cariótipos.

A aplicação da técnica de FISH com sonda telomérica (TTAGGG)<sub>n</sub> evidenciou sinais de hibridação apenas em posição terminal de todos os cromossomos nas três espécies analisadas, inclusive nos cromossomos B de *M. sanctaefilomenae* (Figuras 1 e 2 A-G). Durante a aplicação desta técnica foi utilizada uma solução de hibridação com estrigência de 50%, menor do que a usual (77%); mesmo assim, não houve detecção da presença de sítios intersticiais.

## Discussão

Estudos citogenéticos em algumas espécies de peixes do gênero *Moenkhausia* têm demonstrado que sua composição cariotípica se apresenta conservada, caracterizada



pelo número diplóide de  $2n=50$  cromossomos dos tipos metacêntrico e submetacêntricos, com número fundamental  $NF=100$ . Tal situação poderia ser indicativa da ocorrência de poucos eventos ligados a rearranjos cromossômicos como fissões ou fusões cêntricas, determinantes de alterações cromossômicas em grande escala durante o processo de evolução cariotípica das espécies.

A aplicação da técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com sonda para a sequência telomérica  $(TTAGGG)_n$  revelou sinais de hibridação na posição terminal de todos os cromossomos do complemento A em todas as espécies analisadas, além de marcar esta região nos cromossomos B de *Moenkhausia sanctaefilomenae*. Não foram identificadas marcações intersticiais nos cromossomos das espécies analisadas.

O uso de sondas teloméricas em peixes tem mostrado que as sequências  $(TTAGGG)_n$  estão primeiramente localizadas na região telomérica dos cromossomos (Meyne *et al.*, 1989; Phillips e Reed, 1996; Molina e Galetti, 2002, Silva *et al.*, 2009). Contudo, espécies com sequências de DNA telomérico em posição intersticial nos cromossomos já foram descritas (Phillips e Reed, 1996). Essas sequências, caracterizadas como blocos de DNA telomérico, estão localizadas principalmente nas regiões centroméricas e pericentroméricas dos cromossomos. Desde as primeiras análises citogenéticas realizadas por Meyne *et al.*, (1990) em cerca de 100 espécies de vertebrados, ITS (intersticial telomeric sites) foram localizados e descritos em vários mamíferos, como em primatas do gênero *Eulemur* (Garagna *et al.*, 1997; Go *et al.*, 2000), roedores (Bertoni *et al.*, 1996; Fagundes e Yonenaga-Yassuda, 1998; Castiglia *et al.*, 2006, Ventura *et al.*, 2006), marsupiais (Pagnozzi *et al.*, 2000; Metcalfe *et al.*, 2007), carnívoros (Wurster-Hill *et al.*, 1989), cetartiodactyla (Scherthan, 1990; Lee *et al.*, 1993; Vermeesch *et al.*, 1996), perissodactyla (Santani *et al.*, 2002), quirópteros (Finato *et al.*, 2000) bem como em anfíbios (Wiley *et al.*, 1992; Nanda *et al.*, 2008), répteis (Schmid *et al.*, 1994; Pellegrino *et al.*, 1999), peixes (Abuín *et al.*, 1996; Pansonato Alves *et al.*, in prep.) e aves (Nanda *et al.*, 2002).

Os sítios não-teloméricos da sequência  $(TTAGGG)_n$  detectados em muitas espécies de vertebrados ocorrem mais comumente na região pericentromérica. Isso se deve pelo fato destas sequências serem um componente do DNA satélite em algumas espécies de mamíferos; em outros casos, são fortes evidências de rearranjos cromossômicos. Esses sítios teloméricos intersticiais já foram considerados restos ancestrais de rearranjos cromossômicos produzidos durante a evolução do cariótipo em

diferentes taxa (Lee *et al.*, 1993; Thomsen *et al.*, 1996; Vermeesch *et al.*, 1996; Fagundes e Yonenaga-Yassuda, 1998; Pellegrino *et al.*, 1999; Finato *et al.*, 2000; Go *et al.*, 2000; Yonenaga-Yassuda, 2004; Metcalfe *et al.*, 2007). Por outro lado, considera-se que tais sítios intersticiais poderiam ser também interpretados como reservas de telômeros, com papel de importância no aumento da flexibilidade dos cariótipos (Meyne *et al.*, 1990).

Algumas hipóteses consideram as ITS como regiões de pontos quentes para rearranjos cromossômicos, importantes nos processos de evolução cariotípica. As sequências em sítios não teloméricos poderiam ser geradas por mecanismos como mutação, permuta desigual, transposição ou amplificação de sequências endógenas  $(TTAGGG)_n$  (Yonenaga-Yassuda, 2004). No entanto, rearranjos cromossômicos como inversões, translocações, fusões e fissões podem contribuir para a reorganização da arquitetura do genoma, oferecendo novas formas cromossômicas na qual a seleção natural pode atuar. Este é o quadro evolutivo no qual sequências teloméricas localizadas intersticialmente nos cromossomos podem desempenhar um papel importante, identificando a ocorrência de processos de modificação da morfologia cromossômica (Pansonato-Alves *et al.*, in prep).

Considerando que os telômeros estão relacionados à manutenção da estrutura cromossômica, com a função de proteger e “selar” as extremidades dos cromossomos, fusões Robertsonianas exigiriam a eliminação ou inativação dos telômeros antes da ocorrência do rearranjo. Quando os telômeros são eliminados por quebras cromossômicas, as sequências teloméricas intersticiais estariam ausentes no local de fusão. Tal situação foi demonstrada em camundongos selvagens após fusões cromossômicas Robertsonianas (Garagna *et al.*, 2001). Já nos casos em que sequências teloméricas não são perdidas, os cromossomos resultantes a partir da fusão apresentariam ITS em regiões pericentroméricas. Um grande conjunto de evidências sugere que estes ITS são regiões instáveis onde fissões e inversões podem ocorrer durante a evolução cariotípica. Neste contexto, ITS representariam pontos possíveis de cisão em que novos telômeros poderiam surgir, sendo semeados pelas repetições teloméricas pré-existentes, estabilizando o cromossomo rearranjado durante a evolução (Ruiz-Herrera *et al.*, 2008).

Apesar de não serem detectados sítios teloméricos intersticiais nos cromossomos B de *M. sanctaefilomenae*, estudos realizados por Silva e Yonenaga-Yassuda, (1998b)

em espécies do gênero *Nectomys*, verificaram sinais intersticiais teloméricos no braço curto do cromossomo B submetacêntrico em indivíduos de *Nectomys squamipes* com número diplóide de 57 cromossomos. No entanto, esses sinais não estavam presentes no B acrocêntrico de outro exemplar também com 57 cromossomos. Em *N. rattus* com 53 cromossomos e um cromossomo B submetacêntrico grande também não apresentou ITS. Isso demonstra que os cromossomos B, além de sua variação quanto à forma, tamanho e padrão de heterocromatina constitutiva mostram também heterogeneidade em sua constituição. Em alguns casos os cromossomos B podem ser portadores de genes funcionais, como os ribossômicos e sequências teloméricas, o que dificultaria a comprovação da afirmação de que as ITS sempre representariam remanescentes de rearranjos cromossômicos ou se estes cromossomos estariam associados à heterocromatina constitutiva (Yonenaga-Yassuda, 2004).

Um detalhe a ser observado quando se tratam de sequências teloméricas e hibridação *in situ* fluorescente é que os resultados obtidos com a utilização dessas sequências têm uma relação muito próxima com a estringência da sonda e a quantidade de cópias em um cluster. Assim, as hibridações com sondas teloméricas mostram variação no sinal, podendo apresentar cromossomos sem marcação visível nos telômeros e, deste modo, afetando a visualização de sinais não teloméricos (Rocco *et al.*, 2001; Chew *et al.*, 2002; Molina e Galetti, 2002; Silva *et al.*, 2009).

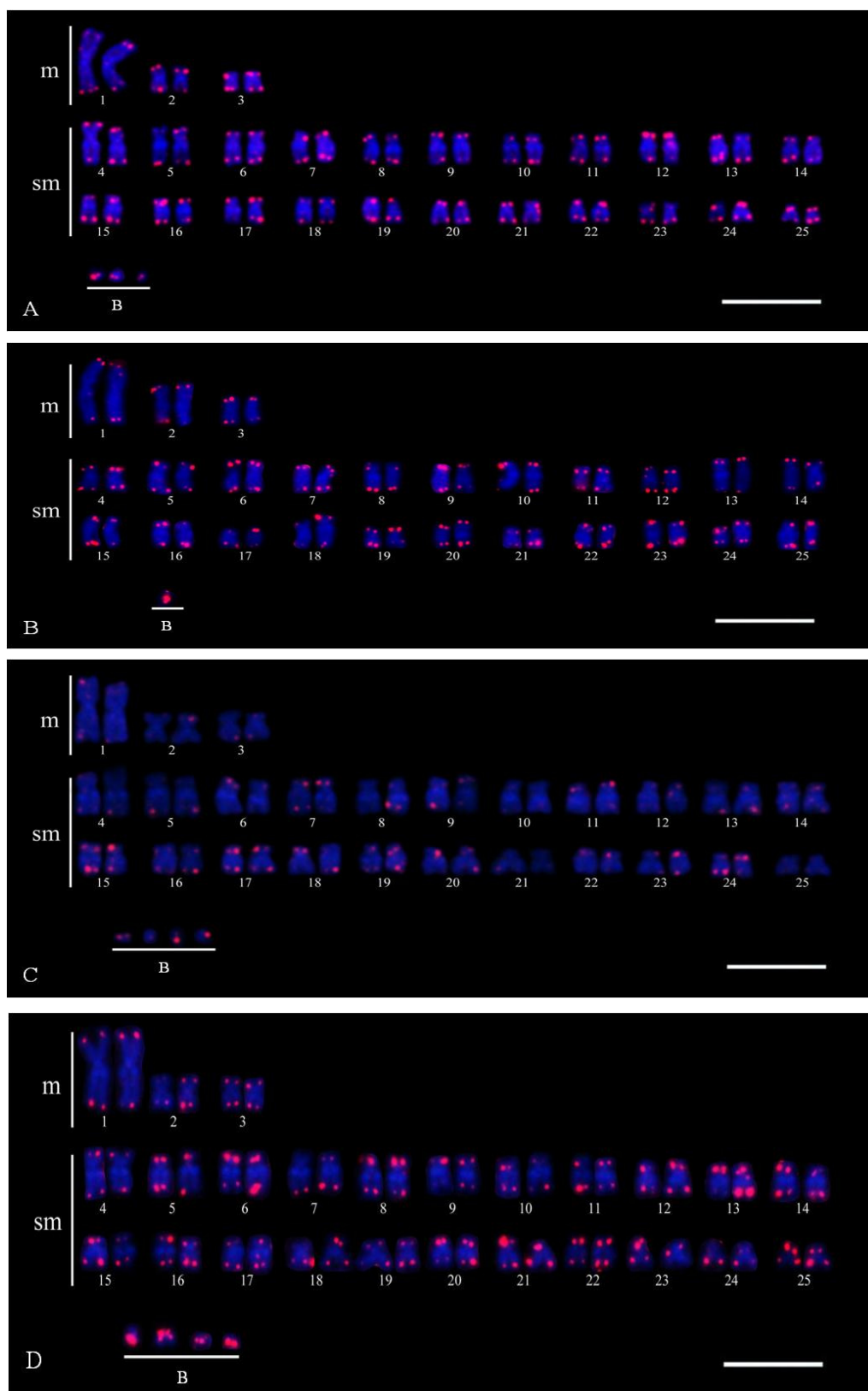
Em estudos realizados por Chew *et al.*, (2002) em *Oreochromis niloticus* foi possível verificar que sondas teloméricas com 150pb mostravam sinais terminais em todos os cromossomos; em contrapartida, sondas com 400 pb reconheciam apenas a região intersticial do par 1. A combinação de fragmentos dos dois tamanhos produziu sinais terminais e intersticiais. A ausência de sinais não teloméricos em *Eigenmannia virescens* poderia ser consequência de modificação ou perda dessas sequências após eventos de fusão cromossômica; ou ainda, ser resultado de rearranjos que não incluam regiões teloméricas (Silva *et al.*, 2009; presente trabalho).

Apesar da constatação de que a distribuição das sequências teloméricas em peixes se encontram geralmente restritas às regiões terminais dos cromossomos (Pansonato Alves *et al.*, in prep.), sendo que apenas em alguns casos foram identificados sítios teloméricos intersticiais (Abuín *et al.*, 1996), estes segmentos podem ser reconhecidos como ferramentas importantes para a identificação da evidências da ocorrência de rearranjos cromossômicos. A falta de comprovação visual de marcas

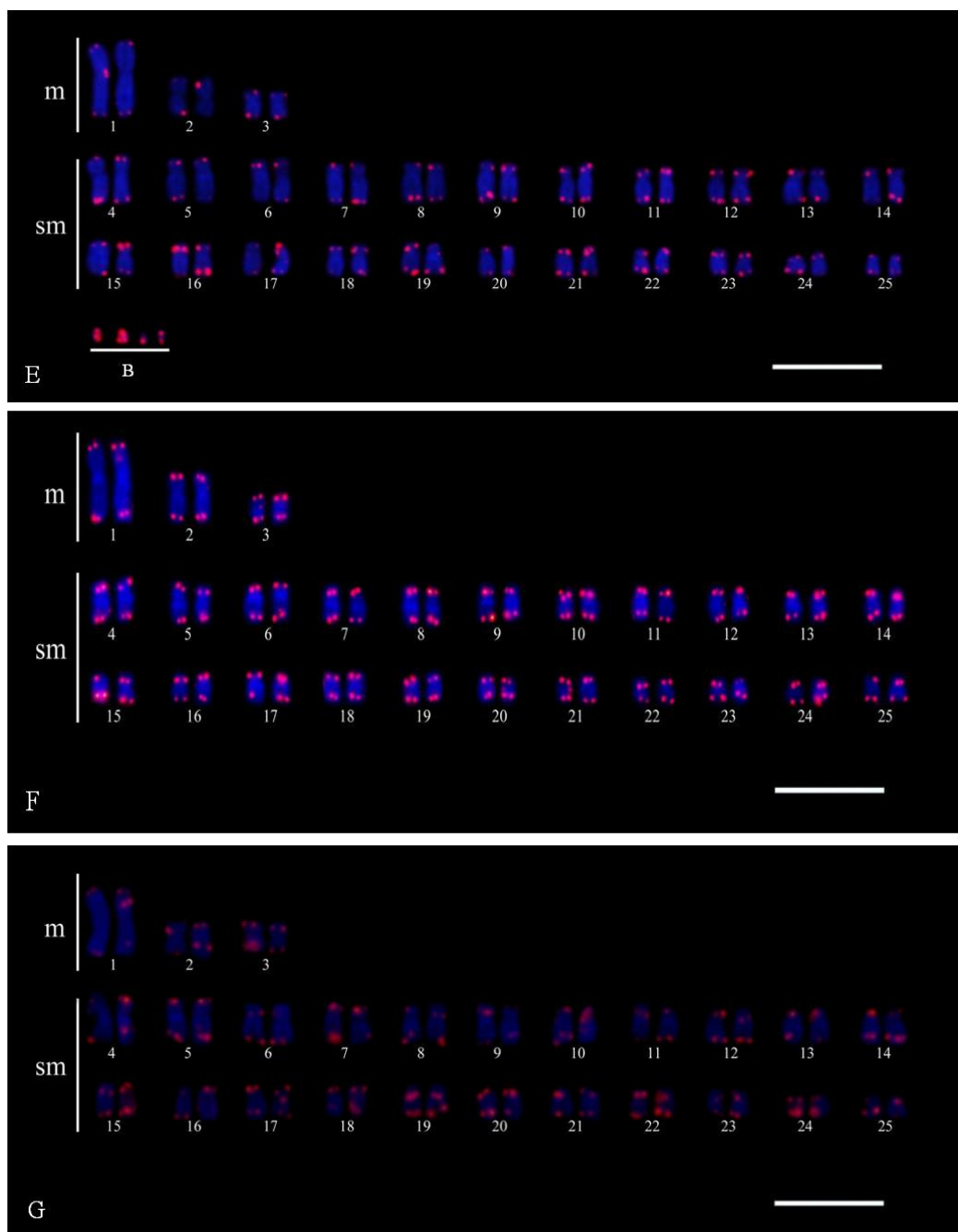
intersticiais conspícuas nos cromossomos das espécies estudadas, com exceção de pequeno sinal fluorescente positivo localizado em posição intersticial no braço curto do primeiro par de cromossomos das três espécies (Figs. 1B e 2F,G), não elimina a possibilidade da presença de segmentos intersticiais de pequena extensão, ou de segmentos modificados por mutação das sequências teloméricas originais, que pudessem torná-los ocultos à ação da técnica de hibridação *in situ* com as sondas (TTAGGG)<sub>n</sub>. Portanto, faz-se necessário ainda uma complementação desses estudos utilizando outras ferramentas de bandamento cromossômico, hibridações dessas sequências em outras espécies do gênero, assim como estudos no DNA satélite das espécies. Considera-se que estes estudos poderiam complementar o conhecimento sobre a estrutura dos cromossomos e da cromatina destas espécies e, assim, fornecer bases para a compreensão do processo de estruturação cariotípica neste grupo de organismos.

### **Referências Bibliográficas**

As referências correspondentes a este capítulo encontram-se no final desta tese.



**Figura 1:** Localização de sítios teloméricos após hibridação *in situ* fluorescente com a sonda telomérica (TTAGGG) $_n$  em exemplares de *Moenkhausia sanctaefilomenae*. A) ribeirão Araquá; B) ribeirão Alambari; C) ribeirão Capivara e D) córrego Olaria. Os cromossomos B estão apresentados em baixo, do lado esquerdo e a barra à direita representa 10  $\mu$ m.



**Figura 2:** Localização de sítios teloméricos após hibridação *in situ* fluorescente com a sonda telomérica (TTAGGG)<sub>n</sub>. E) *Moenkhausia sanctaefilomenae*, população do ribeirão Cubatão; F) *Moenkhausia cosmops* e G) *Moenkhausia oligolepis*. Os cromossomos B estão apresentados em baixo, do lado esquerdo e a barra à direita representa 10 µm.

## Capítulo 3

Isolamento e Caracterização de Sequências Satélites em  
*Moenkhausia sanctaefilomenae* (Teleostei, Characiformes,  
Characidae).

## Resumo

O genoma dos organismos eucariotos apresenta-se organizada em sequências simples e repetidas. As sequências repetidas de DNA estão presentes na forma de centenas a milhares de cópias dispersas ou agrupadas no genoma e localizam-se preferencialmente em regiões heterocromáticas, desempenhando papel relevante na organização do genoma de diversos organismos. A realização de estudos genéticos básicos sobre a organização destas sequências é fundamental para uma melhor compreensão do seu papel biológico e para o entendimento de sua dinâmica evolutiva nos diversos grupos de vertebrados. Análises cariotípicas em *Moenkhausia sanctaefilomenae* com o uso de técnicas citogenéticas têm evidenciado a existência de um cariótipo com 50 cromossomos dos tipos metacêntricos e submetacêntricos, com grandes blocos de heterocromatina constitutiva distribuídos nos cromossomos do lote diplóide, juntamente com a ocorrência de pequenos cromossomos supranumerários que apresentam variação intra e interespecífica nesta espécie. No presente trabalho, análises moleculares foram realizadas em *M. sanctaefilomenae* com o objetivo de isolar e caracterizar famílias de DNA satélite presentes no genoma desta espécie. Os exemplares foram coletados nos ribeirões Araquá, Alambari e Capivara - região de Botucatu-SP; no córrego Olaria - região de Penápolis-SP; no ribeirão Cubatão, região de Marapoama-SP, pertencentes à bacia do Rio Tietê; exemplares da espécie *M. cosmops* foram coletados no rio Verde e os exemplares de *M. oligolepis* no rio do Sangue, município de Campo Novo dos Parecis-MT, pertencentes à bacia Amazônica. Para isolar sequências satélites, amostras de DNA dos exemplares foram extraídas, purificadas e tratadas com 24 enzimas de restrição, sendo que com a enzima *Hinf*I foi possível caracterizar a presença de uma banda diferencial de aproximadamente 200pb. Essa banda foi purificada, inserida em plasmídeo e clonada em bactérias, sendo isolados dez clones que foram utilizados como sondas em experimentos de hibridação em membrana, sequenciamento e hibridação *in situ* fluorescente. Os dados de hibridação em membrana com digestão parcial do DNA genômico de *M. sanctaefilomenae* mostraram que o fragmento isolado representa uma sequência de DNA repetitivo do tipo satélite. Os resultados de hibridação *in situ* demonstraram que esta família de DNA satélite está presente na região pericentromérica de cromossomos do complemento A de todas as espécies, mas ausente nos cromossomos B nas populações de *M. sanctaefilomenae*. A hipótese de que outras classes de DNA repetitivo podem estar presentes no genoma das espécies deste grupo é reforçada pela grande quantidade de heterocromatina encontrada nos cromossomos desta espécie.



## Introdução

O DNA dos organismos eucarióticos apresenta-se organizadas em sequências simples ou repetidas. Segmentos de DNA do tipo cópia única ou com poucas cópias encontram-se dispersos pelos cromossomos e constituem a maioria dos genes funcionais de um organismo, embora algumas sequências moderadamente repetidas também contenham tais genes (Long e David, 1980). No entanto segmentos repetidos de DNA, por sua vez, representam grandes frações do DNA total dos eucariotos e estas sequências chegam a representar cerca de 95% do genoma de cebolas (Flavell *et al.*, 1974) e cerca de 50% ou mais do genoma humano (*The genome international sequencing consortium*, 2001).

As sequências satélites destacam-se entre os elementos repetidos encontrados no DNA total dos organismos, sendo frequentemente organizadas em *tandem* e constituindo partes não codificadoras de DNA (Plohl *et al.*, 2008). Durante muito tempo as sequências repetidas de DNA foram consideradas DNA “lixo” (Doolittle e Sapienza, 1980) ou DNA “egoísta” (Nowak, 1994). Entretanto, estudos recentes têm demonstrado o equívoco desse conceito, já que várias funções têm sido atribuídas a essa classe de sequências genômicas. Geralmente encontram-se localizadas em regiões pobres em genes, como regiões inter-gênicas ou heterocromáticas e, em alguns casos, incluindo elementos transponíveis (Charlesworth *et al.*, 1994; Kidwell, 2002; Fisher *et al.*, 2004). No entanto, diversos estudos têm demonstrado que as sequências repetidas podem exercer um papel importante na organização estrutural e na variação do tamanho dos genomas (Schueler *et al.*, 2001), envolvendo-se em rearranjos cromossômicos, responsáveis por grande parte da variação cariotípica de muitos grupos de organismos (Kidwell, 2002). Assim, a importância dessas sequências relaciona-se também com a estrutura e manutenção dos cromossomos, já que são encontradas principalmente nas regiões dos centrômeros e telômeros nos cromossomos dos eucariotos (Charlesworth *et al.*, 1994).

A análise de sequências altamente repetitivas de DNA também tem se mostrado uma importante ferramenta de estudo, tanto para o conhecimento da estrutura e funcionamento do material genético, quanto também para o estabelecimento de relações filogenéticas em peixes (Garrido-Ramos *et al.*, 1995, 1999; Capana *et al.*, 2002). A detecção de marcadores cromossômicos em espécies crípticas e evolutivamente próximas possibilita o estabelecimento destas relações, uma vez que o DNA satélite

apresenta como característica uma taxa rápida de evolução (Singer, 1982; Charlesworth *et al.*, 1994; Pimpinelli *et al.*, 1995). Além disso, vários estudos têm sugerido o envolvimento de sequências repetidas nos processos de replicação do DNA (Li *et al.*, 2002), recombinação (Biet *et al.*, 1999), expressão gênica (Liu *et al.*, 2001), no processo de diferenciação de cromossomos sexual (Galetti Jr. e Foresti, 1986; Parise-Maltempì *et al.*, 2007) e também para elucidar a provável origem dos cromossomos B (Mestriner *et al.*, 2000; Jesus *et al.*, 2003).

A espécie *Moenkhausia sanctaefilomenae* estudada neste trabalho apresenta um número diplóide frequente de  $2n=50$  cromossomos dos tipos metacêntricos e submetacêntricos, destacando-se também por apresentar variações numéricas interespecíficas relacionadas à presença de cromossomos B (Foresti *et al.*, 1989). A análise dos padrões de heterocromatina constitutiva nesta espécie revela grande diversidade e especificidade na sua distribuição. Apresenta-se frequentemente localizada nas regiões centroméricas e pericentroméricas em diversos cromossomos do complemento cariotípico (Foresti *et al.*, 1989; Portela-Castro, 2001), além da existência de blocos intersticiais e teloméricos em alguns cromossomos. Além disso, nas células dos indivíduos desta espécie são identificados cromossomos supranumerários eucromáticos e heterocromáticos, o que os torna interessantes para o estudo de DNA satélites, uma vez que a heterocromatina constitutiva geralmente está estruturada com base em sequências repetidas (Martins, 2007).

O objetivo do presente trabalho foi o isolamento e a caracterização de sequências satélites no genoma da espécie *Moenkhausia sanctaefilomenae*, a fim de se conhecer a composição da heterocromatina e sua localização no genoma desta espécie de peixes.

## **Materiais e métodos**

As preparações de cromossomos mitóticos foram obtidas a partir de tecido renal e brânquias utilizando-se a técnica referida em Foresti *et al.*, (1981). Foram utilizados indivíduos das espécies *M. sanctaefilomenae*, coletados no ribeirão Araquá, ribeirão Alambari, ribeirão Capivara, da região de Botucatu-SP; córrego Olaria, região de Penápolis-SP; ribeirão Cubatão, região de Marapoama-SP, todos componentes da bacia hidrográfica do rio Tietê. Exemplares de *M. cosmops* foram coletados no rio Verde e os

exemplares de *M. oligolepis* foram coletados no rio do Sangue, pertencentes à bacia Amazônica, município de Campo Novo dos Parecis-MT.

Amostras de DNA total foram extraídas de exemplares da espécie *M. sanctaefilomenae* provenientes do ribeirão Araquá, região de Botucatu-SP, bacia do rio Tietê. O DNA total foi extraído a partir de fragmentos de tecidos do fígado, brânquias e músculos fixados em álcool absoluto, segundo protocolo proposto por Sambrook *et al.*, (2001). Após a purificação, a qualidade e quantidade do DNA obtido foram analisadas em gel de agarose e por espectrofotometria e processadas para a verificação da sua composição e estrutura.

Amostras de DNA de *M. sanctaefilomenae* foram digeridas com 24 enzimas de restrição, sendo elas *MspI*, *ApaI*, *HinfI*, *HindIII*, *KpnI*, *PstI*, *SacI*, *BamHI*, *XbaI*, *EcoRI*, *Acc65I*, *BclI*, *AvaI*, *Bsp119I*, *AluI*, *Bsh1236*, *Csp6I*, *HhaI*, *RsaI*, *HaeIII*, *PvuII*, *NruI*, *XmnI*, *EcoRV*. Uma banda diferencial de tamanho estimado em 200pb foi identificada e separada, a partir da digestão com a enzima *HinfI*. Os fragmentos de DNA desta banda foram extraídos do gel de agarose 1%, ligados ao plasmídio com a utilização do kit Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit with One Shot® TOP10 Electrocomp™ *E. coli* (Life Technologies - Invitrogen) e a construção recombinante resultante foi utilizada para transformar bactérias *Escherichia coli*. Dez clones positivos foram identificados, caracterizados, sequenciados e estocados em freezer a -70°C. Destes, um clone foi selecionado para a realização de hibridação em membrana. O método de *Direct colony PCR screening* utilizado foi realizado com a raspagem e transferência de uma colônia branca da placa de Petri de aproximadamente 1 mm de diâmetro para um Eppendorf de 1,5ml contendo 50µl de H<sub>2</sub>O milli-Q, colocando, em seguida a 94°C por 5 minutos e armazenando a 4°C.

Plasmídios recombinantes foram purificados a partir das bactérias e utilizados em reações de sequenciamento. As reações de sequenciamento foram feitas usando BigDye e o sequenciamento das amostras foi realizado em um sequenciador ABI3130 Capilares 80 cm, seguindo as especificações do fabricante. As sequências foram processadas e submetidas à pesquisa em banco de sequências (*GenBank*), utilizando-se o programa BLAST/N (Altschul *et al.*, 1990) do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) - website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Após a análise, as sequências foram alinhadas usando-se os programas *ClustalW* (Thompson *et al.*, 1994) e *GeneRunner* Version 3.05.

Para as análises de *Southern blotting* foram realizadas inicialmente digestões parciais das amostras de DNA de *M. sanctaefilomenae* utilizando a enzima *HinfI*, que foram separadas em gel de agarose 1% e transferidas para a membrana de nylon. A marcação da sonda, hibridação e detecção foram realizadas usando-se um marcador radioativo [ $\alpha$ - $^{32}$ P]. Para se determinar o grau de conservação deste fragmento, foram realizadas hibridações *in situ* fluorescentes (FISH) em preparações cromossômicas de exemplares de cinco populações de *M. sanctaefilomenae* e das espécies *M. cosmops* e *M. oligolepis*. A aplicação da técnica de FISH em cromossomos metafásicos foi realizada com sondas produzidas a partir dos clones e foi baseada em procedimentos adotados por Pinkel *et al.* (1986), com pequenas adaptações. Os cromossomos foram contracolorados com DAPI e analisados em fotomicroscópio óptico (Olympus BX61), sendo as imagens capturadas utilizando-se o programa Image Pro Plus, 6.0 software (Media Cybernetics).

## Resultados

Amostras de DNA genômico de *Moenkhausia sanctaefilomenae* foram submetidas ao processo de digestão enzimática com 24 enzimas de restrição (*MspI*, *ApaI*, *HinfI*, *HindIII*, *KpnI*, *PstI*, *SacI*, *BamHI*, *XbaI*, *EcoRI*, *Acc65I*, *BclI*, *AvaI*, *Bsp119I*, *AluI*, *Bsh1236*, *Csp6I*, *HhaI*, *RsaI*, *HaeIII*, *PvuII*, *NruI*, *XmnI*, *EcoRV*), tendo sido identificada uma banda diferencial com tamanho aproximado de 200pb, referente à amostra digerida pela enzima *HinfI* (Figura 1). Todas as bandas foram purificadas e clonadas em plasmídio. A confirmação da presença de inserto nos plasmídios recombinantes foi realizada através do método de PCR utilizando o primer M13, sendo obtidos dez clones positivos (Figura 2). Posteriormente, foram estocados em glicerol 25% e mantidos em freezer -70°C. O fragmento isolado foi denominado Ms-*Hinf*.

A composição nucleotídica dos clones (Ms-*HinfI*02, Ms-*HinfI*03, Ms-*HinfI*04, Ms-*Hinf*05, Ms-*Hinf*14, Ms-*Hinf*15, Ms-*Hinf*20, Ms-*Hinf*25, Ms-*Hinf*28 e Ms-*Hinf*31) de *M. sanctaefilomenae* foi determinada por sequenciamento (Figura 3). Os monômeros clonados revelam-se constituídos por 50,2% de bases G+C. A análise da composição dos clones revelou que Ms-*Hinf*02 é composto por 234pb; Ms-*Hinf*03 por 231pb; Ms-*Hinf*04 por 215pb; Ms-*Hinf*05 por 245pb; Ms-*Hinf*14 por 232pb; Ms-*Hinf*15 por 215pb; Ms-*Hinf*20 por 203pb; Ms-*Hinf*25 por 227pb; Ms-*Hinf*28 por 217pb e Ms-*Hinf*31 por 261pb. Todos os clones foram submetidos a análises comparativas com sequências do

*GenBank*; não sendo, entretanto, encontrada qualquer similaridade com outras sequências previamente publicadas.

A organização genômica da família repetitiva *Ms-HinfI* de *M. sanctaefilomenae* foi analisada pela hibridação em membrana. A sonda *Ms-HinfI02* foi marcada e hibridada sobre o DNA total da espécie previamente clivado com a enzima *HinfI* em diferentes tempos de digestão. O resultado evidenciado (Figura 4) confirma a presença de bandas formadas por unidades monoméricas de 200pb, originando um padrão em escadas típico de um DNA repetitivo organizado em *tandem*.

As espécies *Moenkhausia sanctaefilomenae*, *M. cosmops* e *M. oligolepis*, apresentam cariótipos constituído por 50 cromossomos, sendo 3 pares do tipo metacêntrico e 27 pares do tipo submetacêntrico, com número fundamental (NF) igual a 100. No complemento cariotípico de *M. sanctaefilomenae* também foram encontrados cromossomos B que apresenta variação inter e intraindividual. Para identificar a localização cromossômica da família de DNA satélite, o clone *Ms-HinfI02* foi marcado com Digoxigenina-11-dUTP e utilizado como sonda em hibridação *in situ* fluorescente. Os resultados evidenciaram marcações características e bem evidentes, além de outras pequenas marcações nas regiões pericentroméricas dos cromossomos no complemento cariotípico de exemplares de *Moenkhausia*. Nos exemplares de *M. sanctaefilomenae* da população do ribeirão Araquá foram evidenciadas marcações em 34 cromossomos; nos do ribeirão Alambari em 32 cromossomos, nos do ribeirão Capivara em 22 cromossomos. Nos cromossomos dos exemplares da população do córrego Olaria foram identificadas marcações em 25 cromossomos e nos da população do ribeirão Cubatão em apenas 10 cromossomos. Nos exemplares da espécie *M. cosmops* foram observadas marcações em 12 cromossomos e de *M. oligolepis* em apenas 6 cromossomos. Não foram observadas marcações nos cromossomos B nas populações de *M. sanctaefilomenae* (Figuras 5 e 6 A-G).

## **Discussão**

DNAs satélites têm sido amplamente estudados em mamíferos e outros vertebrados. Ao contrário, para o grupo de peixes, o número de sequências descritas, bem como as informações sobre a organização molecular desta classe de DNA são bastante restritas, quando comparadas ao grande número de espécies caracterizadas citogeneticamente neste grupo de organismos (Haaf *et al.*, 1993). É conhecido um

grande número de espécies que apresentam em seus cariótipos grande quantidade e padrões diferenciados de heterocromatina constitutiva, composta na maioria das vezes por DNA satélite, indicando a presença de uma classe de DNA repetitivo não codificador organizado em “tandem” (Sumner, 1990). No presente trabalho, a localização de uma família de DNA repetitivo em *M. sanctaefilomenae* é coincidente com a disposição da heterocromatina constitutiva pericentromérica encontrada em alguns cromossomos do complemento cariotípico desta espécie (Foresti *et al.*, 1989).

As análises da hibridação em membrana com digestão parcial do DNA genômico de *M. sanctaefilomenae* mostraram que o fragmento isolado representa uma sequência de DNA satélite formada por unidades monoméricas de 200pb organizadas em “tandem”. Esta característica já foi observada em várias sequências de DNA repetitivo identificado em peixes, tanto de água doce quanto marinhos (Ekker *et al.*, 1992; Garrido-Ramos *et al.*, 1994; Koehler *et al.*, 1997; Reed *et al.*, 1997; Fischer *et al.*, 2000; Capana *et al.*, 2002; Azevedo *et al.*, 2005).

Experimentos de hibridação *in situ* fluorescente realizados com o intuito de se estabelecer o grau de conservação do DNA satélite encontrado no genoma de indivíduos das populações de *M. sanctaefilomenae* e nas espécies *M. cosmops* e *M. oligolepis*. A localização cromossômica desta sequência de DNA satélite mostrou distribuição efetiva na região pericentromérica da maior parte dos cromossomos do complemento A nas populações de *M. sanctaefilomenae*, sendo que nenhum sinal de hibridação foi identificado nos cromossomos B desta espécie. Nas espécies *M. cosmops* e *M. oligolepis* estas sequências apresentaram-se menos dispersas no genoma. Este resultado mostrou que as sequências de DNA satélite de *M. sanctaefilomenae* são compartilhadas também pelo genoma das demais espécies, indicando que seu caráter conservativo em diferentes espécies do gênero poderia refletir, além de uma identidade de origem, também alguma provável importância adaptativa relacionada à sua manutenção no genoma destas espécies de peixes.

Alguns tipos de DNA satélite têm se apresentado como componentes da estrutura dos cromossomos supranumerários, enquanto outros fazem parte apenas dos cromossomos do complemento A (Beukeboom, 1994). Em alguns casos, a identificação de segmentos característicos de DNA satélite nos cromossomos B tem se apresentado como uma ferramenta útil para determinar a origem intraespecífica (López-León *et al.*,

1994) ou interespecífica (McAllister & Werren, 1997) destes elementos genômicos (Camacho *et al.*, 2000).

Estudos realizados por Mestriner *et al.* (2000) utilizando a sonda As51 de *Astyanax scabripinnis*, obtida com a utilização da enzima de restrição *KpnI*, foi identificada a presença de uma sequência repetitiva simétrica em ambos os braços de um macrocromossomo B. As análises do complexo sinaptonêmico mostraram que os braços cromossômicos apresentavam homologia estrutural e funcional, indicando sua estrutura originada a partir de um evento formador de um isocromossomo nesta espécie. Em outro estudo, Maistro *et al.* (2000) usando a enzima de restrição *BamHI*, observaram a existência de diferentes classes de DNA altamente repetitivo no genoma de *P. lineatus* e mostraram, com base nestas análises, uma composição diferente dos cromossomos B em relação àquela dos cromossomos do complemento cariotípico normal da espécie. Considerando-se que os cromossomos B provavelmente surgiram dos cromossomos A (Green, 1990; Beukeboom, 1994; Camacho *et al.*, 2000), a existência de diferenças na composição da cromatina entre eles poderia indicar que a origem dos cromossomos B em *Prochilodus lineatus* não seria um evento recente, apresentando um tempo suficiente para a acumulação de modificações na sua estrutura durante o processo evolutivo (Maistro *et al.*, 2000).

Jesus *et al.* (2003) localizaram duas famílias de DNA repetitivo (SATH1 e SATH2) em *Prochilodus lineatus* provenientes do rio Mogi-Guaçu, Pirassununga-SP utilizando a enzima de restrição *HindIII*, demonstrando que as sequências SATH1 são compartilhadas entre os cromossomos A e B, enquanto as sequências SATH2 se mostraram exclusivas dos cromossomos do complemento cariotípico A. Ao utilizarem as sequências SATH1 em exemplares de *P. lineatus* da lagoa Dourada, bacia do rio Tibagi, PR, Artoni *et al.* (2006), observaram algumas diferenças em relação aos exemplares provenientes do rio Mogi-Guaçu, SP (Jesus *et al.* 2003). Diante das diferenças observadas entre as duas populações, fica evidente que os cromossomos B desta espécie possivelmente seguiram caminhos evolutivos independentes no processo de diversificação.

Estudos envolvendo a identificação de sequências repetitivas, principalmente sequências satélites, também tem sido realizados para caracterizar sequências sexo-específicas, como apresentado em estudos realizados por Nakayama *et al.* (1994). Estes autores isolaram fragmentos de DNA satélite da espécie *Leporinus elongatus* e

verificaram em experimentos de hibridação que a sonda utilizada marcou especificamente o cromossomo W presente nas células de fêmeas dessa espécie. No entanto, em três indivíduos ZW não foi verificada nenhuma marcação em seus cromossomos W, sugerindo que esses cromossomos sexuais atípicos teriam perdido essas regiões satélites em decorrência de eventos de recombinação ocorridos entre os cromossomos Z e W.

Em outro estudo, Parise-Maltempi *et al.* (2007) isolaram um elemento repetitivo associado aos cromossomos sexuais de *Leporinus elongatus* com o uso de digestão enzimática. A utilização da técnica de hibridação *in situ* permitiu a proposição da existência de um sistema de cromossomos sexuais múltiplos para esta espécie, já que o elemento repetitivo isolado hibridou não somente nos pares sexuais já conhecidos ZZ/ZW, como também em um par de cromossomos do complemento cariotípico normal.

Análises de DNA satélite têm sido aplicadas também no mapeamento físico dos cromossomos, como em estudos realizados por Ferreira e Martins (2008) que caracterizaram sequências de DNA repetitivo no genoma de *Oreochromis niloticus* utilizando bibliotecas de plamídeos enriquecidas com sequências repetitivas e Cot-1 DNA. Com a utilização da técnica de hibridação *in situ*, foi possível caracterizar uma distribuição predominante de elementos repetitivos nas regiões centroméricas e teloméricas dos cromossomos desta espécie. Contudo, a distribuição destas sequências repetitivas nos cromossomos X e Y mostrou-se diferente, sugerindo um papel relevante para o DNA repetitivo no processo de diferenciação dos cromossomos sexuais.

Com o objetivo de entender a função das sequências repetidas no genoma dos peixes, Mazzuchelli e Martins (2009) identificaram e caracterizaram três classes de DNAs repetitivos no genoma da espécie *Astronotus ocellatus* através de sequenciamento e mapeamento físico dos cromossomos desta espécie. A primeira classe mostrou correspondência com uma família de DNA satélite (AoSat) que compartilha similaridade com um DNA satélite centromérico da espécie *Tetraodon nigroviridis*. A segunda classe (AoRex3) foi relacionada com o retrotransposon Rex 3 que é amplamente distribuído entre os peixes teleósteos e a terceira classe, o elemento repetitivo (AoLine), mostrou uma alta similaridade com a CR1-LINE, elemento repetitivo encontrado em outros teleósteos. No entanto, as três classes de elementos repetitivos apresentaram-se agrupadas na heterocromatina centromérica de todos os

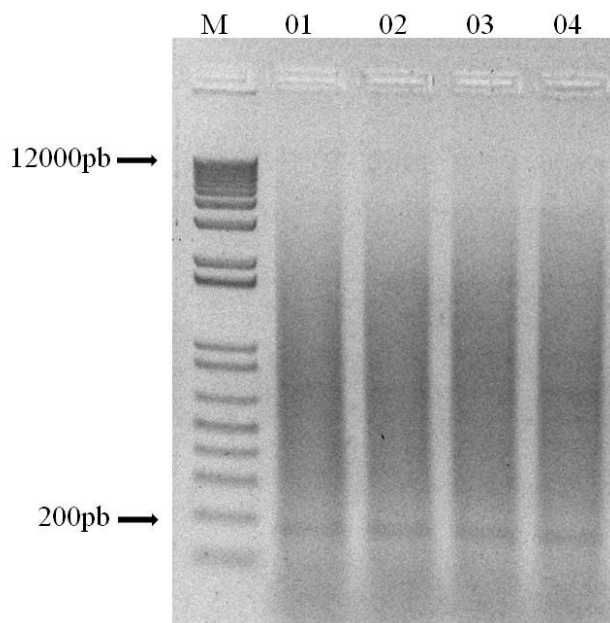


cromossomos do complemento, dando indicações de que estas sequências não são distribuídas aleatoriamente no genoma e sugerindo um modelo de compartimentalização nos cromossomos.

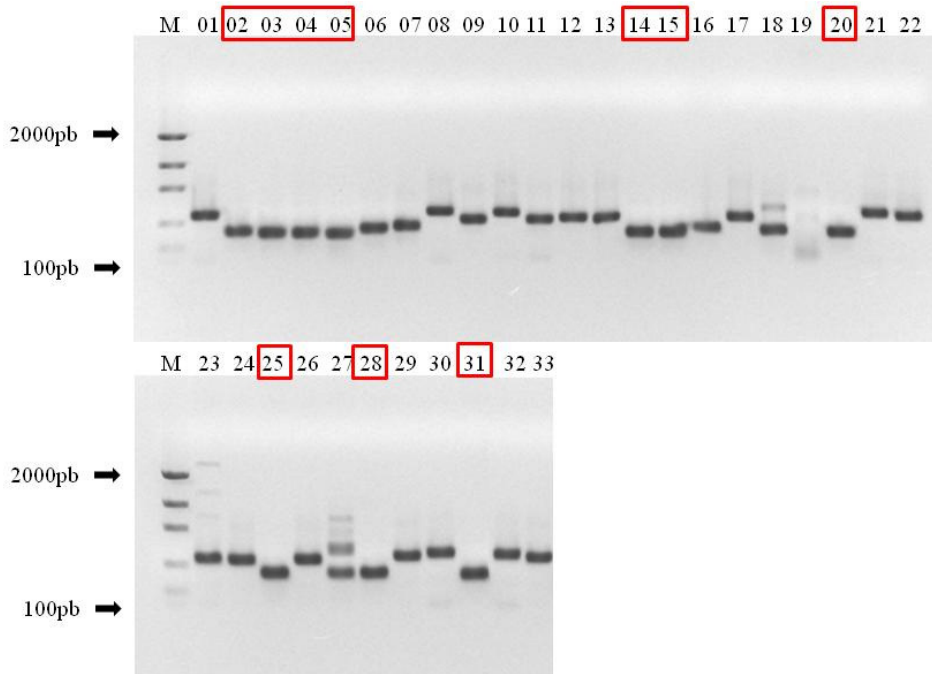
Os padrões de heterocromatina constitutiva descritos para *M. sanctaefilomenae* e os dados obtidos no presente trabalho permitem sugerir uma composição heterogênea com relação aos elementos que compõem estes segmentos genômicos nesta espécie. Pode-se supor, assim, a existência de outras classes de heterocromatina e a existência de diferentes famílias de DNA satélite no genoma das espécies do gênero *Moenkhausia*. Os dados disponíveis na literatura indicam que as sequências satélites estariam associadas às regiões heterocromáticas, sugerindo, com base em Martins (2007) que estas sequências poderiam desempenhar uma função importante também na manutenção da estrutura cromossômica.

### **Referências Bibliográficas**

As referências correspondentes a este capítulo encontram-se no final desta tese.



**Figura 1:** Gel de agarose mostrando o produto da digestão do DNA de *Moenkhausia sanctaefilomenae* com a enzima *Hin*I. M - Marcador Ladder 1Kb plus; 1 a 4 - Bandas identificadas e tamanho dos fragmentos da digestão do DNA.



**Figura 2:** Gel do produto de PCR dos clones identificados com a enzima de restrição *Hin*I, obtidos para a espécie *M. sanctaefilomenae* a partir de fragmento de 200pb. M - Marcador Ladder 1Kb plus; 1 a 33 - Clones amplificados com o primer M13.

>MsHinf-02

TTGTAAAACGACGGGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCCTCTAGATGCATG  
CTCGAGCGGCCGCCAGTGTGATGGATATCTGCAGAATTCGCCCTAAGGGCGAATTCAGCACACTGGCGG  
CCGTTACTAGTGGATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTACCTAA  
ATAGCTTGGCGTAATCATGGTCTA

>MsHinf-03

CAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCCTCTAGATGCATGCTCGAGCGGCCGCCAG  
TGTGATGGATATCTGCAGAATTCGCCCTAAGGGCGAATTCAGCACACTGGCGGCCGTTACTAGTGGATC  
CGAGCTCGGTACCAAGCTTGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTACCTAAATAGCTTGGCGTAATC  
ATGGTCTGGCCTGTTTCTGA

>MsHinf-04

CAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCCTCTAGATGCATGCTCGAGCGGCCGCCAG  
TGTGATGGATATCTGCAGAATTCGCCCTAAGGGCGAATTCAGCACACTGGCGGCCGTTACTAGTGGATC  
CGAGCTCGGTACCAAGCTTGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTACCTAAATAGCTTGGCGTAATC  
ATGGT

>MsHinf-05

TTGTAAAACGACCGGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCCTCTAGATGCATG  
CTCGAGCGGCCGCCAGTGTGATGGATATCTGCAGAATTCGCCCTTATTCCGATAGTGTAAAGGGCGAATTC  
CAGCACACTGGCGGCCGTTACTAGTGGATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTGATGCATAGCTTGAGTATTCT  
ATAGTGTACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGT

>MsHinf-14

TTGTAAAACGACGGGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCCTCTAGATGCATG  
CTCGAGCGGCCGCCAGTGTGATGGATATCTGCAGAATTCGCCCTTAGGGCGAATTCAGCACACTGGCGG  
CCGTTACTAGTGGATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTACCTAA  
ATAGCTTGGCGTAATCATGGTCT

>MsHinf-15

CAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCCTCTAGATGCATGCTCGAGCGGCCGCCAG  
TGTGATGGATATCTGCAGAATTCGCCCTTAGGGCGAATTCAGCACACTGGCGGCCGTTACTAGTGGATC  
CGAGCTCGGTACCAAGCTTGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTACCTAAATAGCTTGGCGTAATC  
ATGGT

>MsHinf-20

ATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCCTCTAGATGCATGCTCGAGCGGCCGCCAGTGTGATGGATAT  
CTGCAGAATTCGCCCTAAGGGCGAATTCAGCACACTGGCGGCCGTTACTAGTGGATCCGAGCTCGGTAC  
CAAGCTTGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGT

>MsHinf-25

GTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCCTCTAGATGCATGCTCGAGCGGCCGCCAGTG  
TGATGGATATCTGCAGAATTCGCCCTTATTCCGATAGTGTAAAGGGCGAATTCAGCACACTGGCGGCCG  
TACTAGTGGATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTACCTAAATAG  
CTTGGCGTAATCATGGT

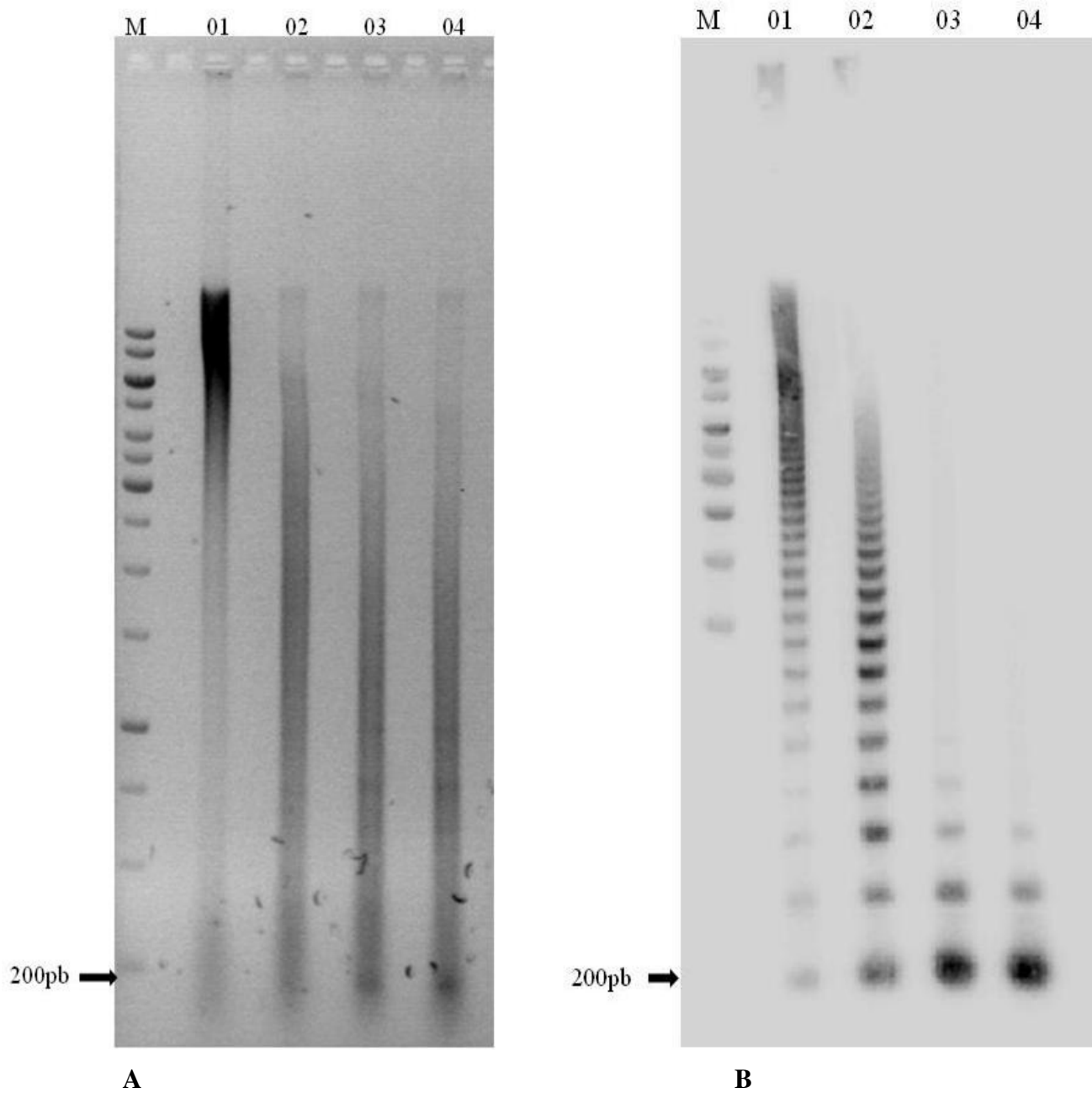
>MsHinf-28

CAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCCTCTAGATGCATGCTCGAGCGGCCGCCAG  
TGTGATGGATATCTGCAGAATTCGCCCTAAGGGCGAATTCAGCACACTGGCGGCCGTTACTAGTGGATC  
CGAGCTCGGTACCAAGCTTGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTACCTAAATAGCTTGGCGTAATC  
ATGGTCT

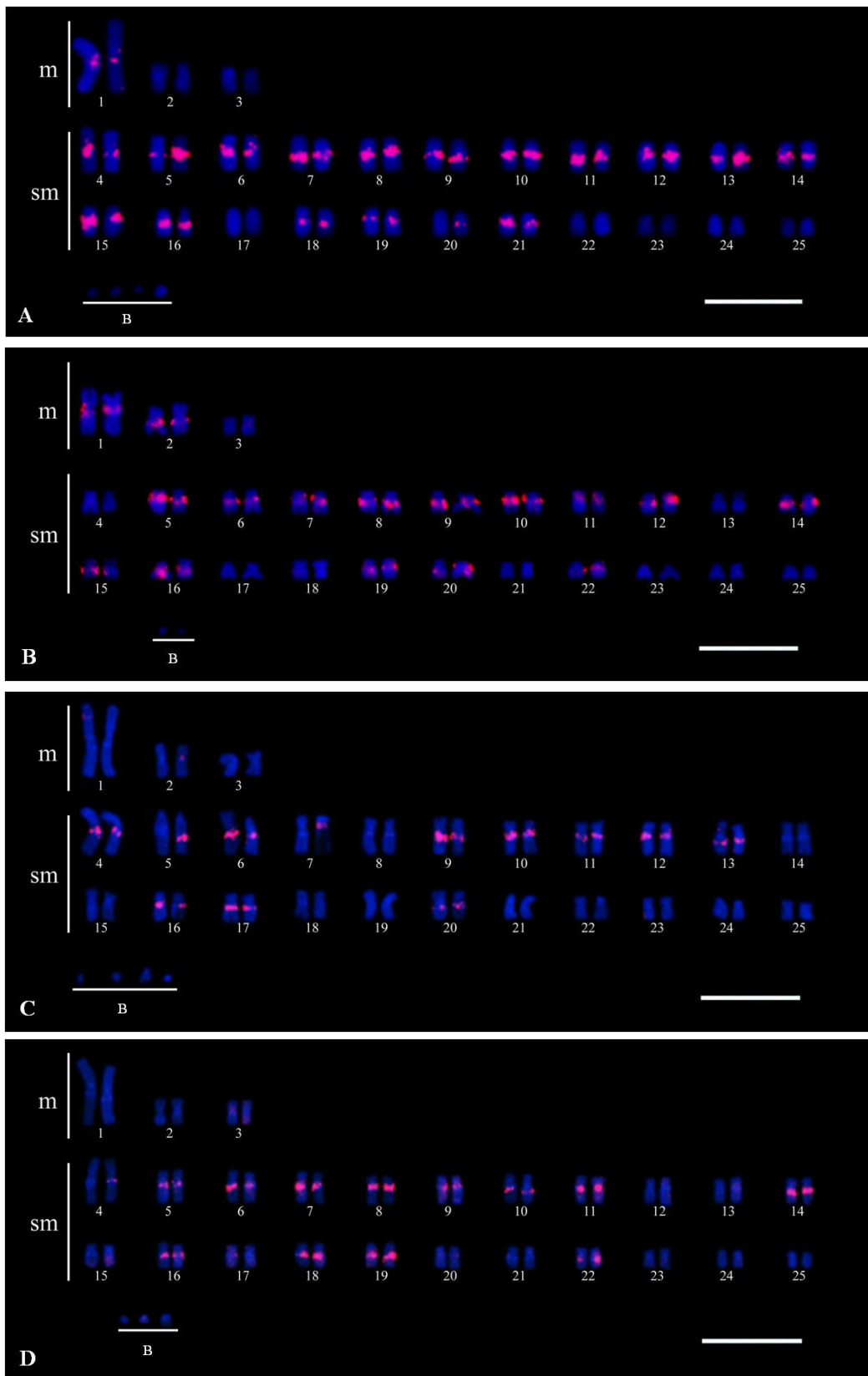
>MsHinf-31

TTGTAAAACGACCGGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCCTCTAGATGCATG  
CTCGAGCGGCCGCCAGTGTGATGGATATCTGCAGAATTCGCCCTTAGGGCGAATTCAGCACACTGGCGG  
CCGTTACTAGTGGATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTACCTAA  
ATAGCTTGGCGTAATCATGGT

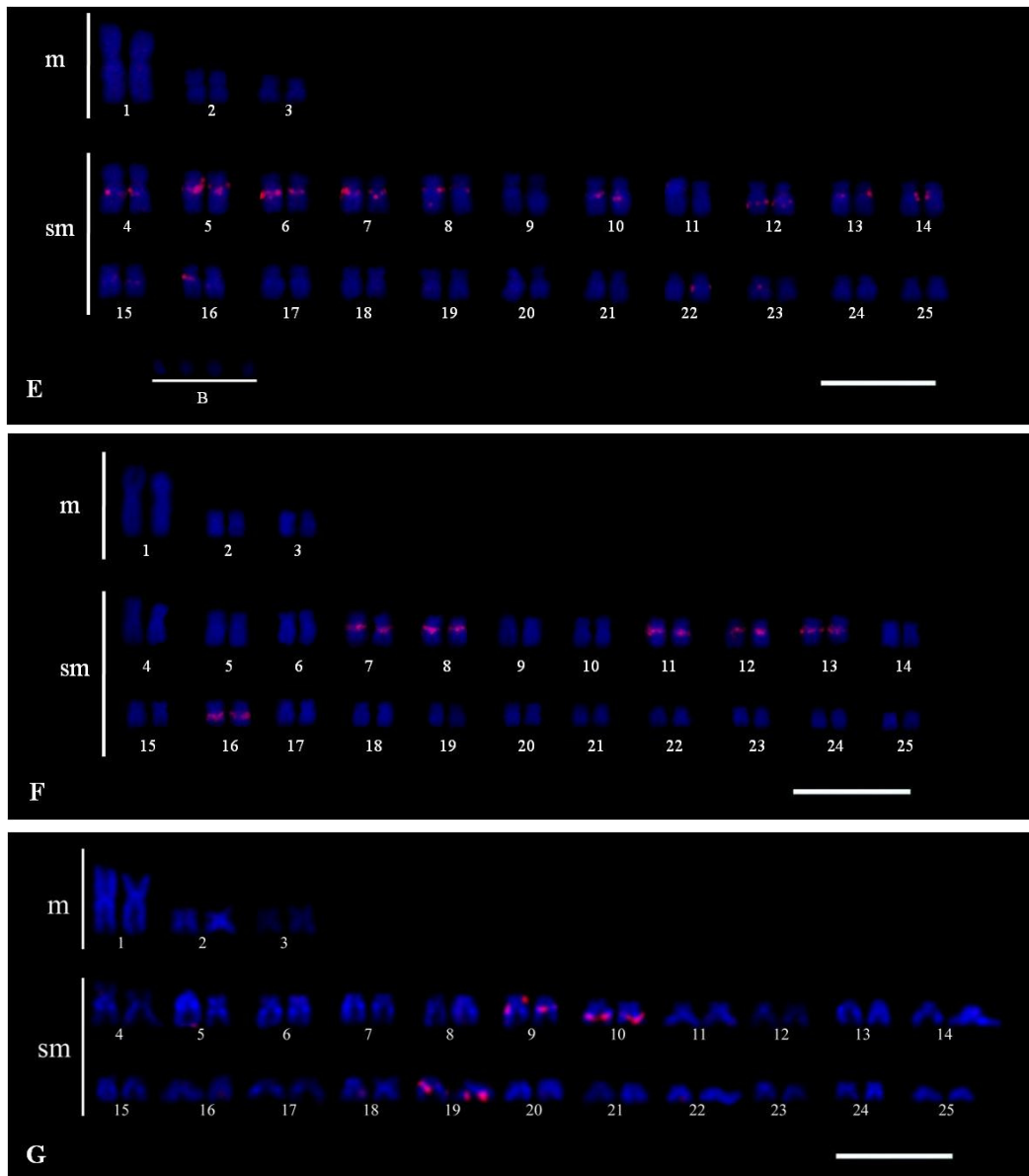
**Figura 3:** Sequências de nucleotídeos dos clones isolados a partir de DNA da espécie *Moenkhausia sanctaefilomenae*.



**Figura 4:** A) Gel de agarose mostrando o produto da digestão do DNA da espécie *Moenkhausia sanctaefilomenae*, com a enzima de restrição *Hinf*I em diferentes intervalos de tempo. M-Marcador; 1 - 10 min; 2 - 30 min; 3 - 60 min e 4 - overnight. B) O mesmo DNA da figura (A) hibridado com uma sonda Ms-*Hinf*02 isolada da espécie *M. sanctaefilomenae*.



**Figura 5:** Hibridação *in situ* com sonda proveniente do clone Ms-Hinf02. A-D) Cromossomos de exemplares de *Moenkhausia sanctaefilomenae* do ribeirão Araquá (A); ribeirão Alambari (B); ribeirão Capivara (C) e córrego Olaria (D). A barra à esquerda indica os cromossomos B e a barra à direita representa 10µm.



**Figura 6:** Hibridação *in situ* com sonda proveniente do clone Ms-Hinf02 em diferentes espécies de *Moenkhausia*. E) *M. sanctaefilomenae* do ribeirão Cubatão; F) *M. cosmops* e G) *M. oligolepis*. A barra à esquerda indica os cromossomos B e a barra à direita representa 10 $\mu$ m.

## Capítulo 4

Microdissecção cromossômica e pintura total (WCP) em cromossomos B de *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Teleostei, Characiformes, Characidae).

## Resumo

Cromossomos supranumerários ou B são elementos genômicos acessórios e dispensáveis, não são homólogos e não se pareiam com os elementos do complemento padrão, ocorrendo em diferentes grupos de animais e plantas. Esses cromossomos podem ter origens distintas, incluindo derivação de cromossomos autossomos, cromossomos sexuais e por cruzamentos entre espécies. Os mecanismos moleculares que conduzem a evolução desses elementos genômicos podem envolver silenciamento gênico, processos de heterocromatinização, acúmulo de DNA repetitivo e transposons. No presente trabalho, uma sonda específica a partir de um cromossomo B de *Moenkhausia sanctaefilomenae* foi obtida por microdissecção, seguida de amplificação inespecífica por DOP-PCR. Essa sonda foi utilizada para pintura cromossômica total (WCP-Whole Chromosome Painting) por hibridação *in situ* fluorescente de cromossomos metafásicos em indivíduos de cinco populações de *M. sanctaefilomenae* e das espécies *M. cosmops* e *M. oligolepis*. Os resultados obtidos mostraram que apenas um dos cromossomos B de uma população de *M. sanctaefilomenae* compartilha sequências de DNA com cromossomos do complemento A desta espécie, sugerindo uma possível origem intra-específica para este cromossomo B nesta população. Por outro lado, experimentos de hibridação *in situ* em preparações cromossômicas de indivíduos de outras populações de *M. sanctaefilomenae* revelaram que os elementos cromossômicos extras desta espécie não compartilham sequências com os cromossomos do complemento A, apontando para existência de uma origem independente para estes elementos genômicos. Nas populações de *M. sanctaefilomenae* do ribeirão Araquá e do córrego Olaria, o uso da sonda de DNAr 18S revelou a presença de genes ribossômicos não ativos nos cromossomos B e em alguns cromossomos do complemento A, sugerindo que rearranjos ocorridos envolvendo os genes ribossomais alocados em alguns cromossomos do complemento A teriam determinado sua transposição para outros cromossomos. Estudos desta natureza, além de trazerem valiosas informações sobre a constituição e distribuição de genes e segmentos específicos nos cromossomos, podem fornecer subsídios para o entendimento do processo de diferenciação cromossômica no genoma destas espécies.



## Introdução

Os cromossomos supranumerários ou B são definidos como cromossomos adicionais, que não apresentam homologia e não se pareiam com os cromossomos do complemento A, caracterizando-se por empreender seu próprio caminho evolutivo no genoma das espécies portadoras (Jones e Rees, 1982; Beukeboom, 1994). Estudos recentes têm colocado em foco os cromossomos B, incluindo análises de sua distribuição entre as espécies, estrutura e origem, herança e modo de transmissão, dinâmica populacional e evolução, bem como a integração dos cromossomos B com os do complemento A (Camacho *et al.*, 2000; Bugrov *et al.*, 2007). Em particular, os cromossomos B têm incentivado um crescente interesse na comunidade científica pelo fato de representarem, aparentemente, material genético dispensável, persistindo nas populações naturais sem serem eliminados pela seleção natural (Carvalho *et al.*, 2008).

Nas últimas décadas o desenvolvimento metodológico da Biologia Molecular possibilitou a amplificação de qualquer segmento de DNA através de técnicas como DOP-PCR (*Degenerate Oligonucleotide-Primed PCR*), trazendo grandes avanços na aplicação da citogenética molecular em muitos campos até então pouco explorados. A construção de sondas a partir de microdissecção para pintura cromossômica total (WCP - Whole Chromosome Painting), desenvolvida a partir da década de 90 (Kao, 1990; Meltzer *et al.*, 1992), tem sido amplamente utilizada na citogenética humana e estendida para representantes de vários grupos animais e plantas (Diniz *et al.*, 2008). Entretanto, essa metodologia só recentemente começou a ser direcionada para estudos cromossômicos em peixes, abordando principalmente aspectos relacionados à composição molecular dos cromossomos B em plantas e animais como *Petauroides volans* (McQuade *et al.*, 1994), *Crepis capillaris* (Jamilena *et al.*, 1995), *Leiopelma hochstetteri* (Sharbel *et al.*, 1998), *Dicamptodon tenebrosus* (Brinkman *et al.*, 2000), *Nyctereutes procyonoides* (Trifonov *et al.*, 2002), *Zea mays* (Cheng e Lin, 2003), *Podisma sapporensis* (Bugrov *et al.*, 2003), *Apodemus peninsulae* (Trifonov *et al.*, 2002; Rubtsov *et al.*, 2004), *Podisma kanoi* (Bugrov *et al.*, 2007), *Secale cereale* (Long *et al.*, 2008) e *Lacusta migratória* (Teruel *et al.*, 2009).

A extração de sequências repetitivas do genoma para a construção de sondas abriu a possibilidade de se pesquisar, com a aplicação da técnica de FISH, a estrutura molecular dos cromossomos B, principalmente com a finalidade de se obter subsídios

para o esclarecimento sobre sua origem e evolução. Além disso, estudos têm demonstrado que esses elementos genômicos podem compartilhar sequências repetitivas com os cromossomos do complemento A, apresentando em alguns casos, sequências específicas de DNA satélite (Kassahara, 2009).

A ocorrência de cromossomos B em peixes evidencia a importância dos estudos que envolvem esses elementos, com o objetivo de melhor compreender sua estrutura e origem, os processos envolvidos em sua fixação nas diferentes populações, assim como o seu papel dentro do genoma desses vertebrados. As respostas para o entendimento da origem desses cromossomos em peixes têm sido buscadas a partir de cromossomos do complemento A ou de eventos citológicos determinantes para a formação destes elementos genômicos. A espécie *Moenkhausia sanctaefilomenae* apresenta-se como um modelo interessante para o estudo destas estruturas genômicas em peixes, por apresentar peculiaridades associadas às características biológicas da própria espécie e particularidades dos microcromossomos B nela encontrados, uma vez que estes podem se apresentar tanto heterocromáticos, como na maioria das espécies portadoras, quanto eucromáticos, ocorrendo num mesmo indivíduo. O objetivo do presente trabalho foi, portanto, a partir da aplicação de técnicas de citogenética molecular mais resolutivas como a microdissecção e a pintura dos cromossomos, possibilitar a obtenção de informações para o melhor entendimento do processo de origem e da dinâmica desses elementos genômicos.

## **Materiais e Métodos**

As preparações de cromossomos mitóticos foram obtidas a partir de fragmentos de tecido renal e brânquias utilizando-se a técnica referida em Foresti *et al.*, (1981). Foram utilizados indivíduos da espécie *Moenkhausia sanctaefilomenae* coletados no ribeirão Araquá, ribeirão Alambari, da região de Botucatu-SP; córrego Olaria, região de Penápolis-SP; ribeirão Cubatão, região de Marapoama-SP, todos pertencentes a bacia hidrográfica do Rio Tietê; de *Moenkhausia cosmops*, coletados no rio Verde, e de *Moenkhausia oligolepis*, coletados no rio do Sangue, município de Campo Novo dos Parecis- MT, pertencentes à bacia Amazônica.

Para realização da tríplice coloração com CMA<sub>3</sub>/DA/DAPI, suspensões celulares de *M. sanctaefilomenae* proveniente do ribeirão Araquá, região de Botucatu-SP, contendo boa quantidade de metáfases foram gotejadas em lamínulas, para posterior

microdissecção dos cromossomos, seguindo os procedimentos adotados por Schweizer (1980) com pequenas adaptações. Os cromossomos foram contracorados com DAPI e analisados em fotomicroscópio óptico (Olympus BX61). As imagens foram capturadas usando-se o programa Image Pro Plus 6.0 software (Media Cybernetics).

Para a microdissecção dos cromossomos B heterocromáticos, foram utilizadas as lamínulas submetidas à tripla coloração e assim, identificados os cromossomos B de interesse, que posteriormente foram corados com Giemsa 5% por 5 minutos. A microdissecção dos cromossomos B foi realizada em micromanipulador Eppendorf acoplado a um microscópio Zeiss AXIOvert 100. O procedimento de microdissecção utilizado foi realizado com base no protocolo apresentado em Houben *et al.*, (2001), com adaptações ao organismo de interesse desse estudo.

A amplificação do material microdissectado foi realizada segundo o protocolo descrito por Mühlmann-Diaz *et al.* (2001), com algumas adaptações específicas para o material em estudo. Para a primeira PCR, foi feita uma amplificação inespecífica do material genético, onde seis cromossomos B da espécie acima citada foram microdissectados e transferidos para tubos de microcentrífuga contendo o mix de DOP-PCR utilizando-se o primer DOP (5' CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G 3'), segundo Telenius *et al.* (1992). Em seguida, uma segunda PCR foi realizada para obtenção de um estoque da primeira e assim obteve-se a PCR marcada dos produtos obtidos por microdissecção com dUTP-11-digoxigenina. As reações de PCR foram realizadas usando um termociclador PTC-200TM Peltier Cyler (MJResearch, Inc.).

A hibridação *in situ* fluorescente (FISH) em cromossomos metafásicos com sondas produzidas a partir dos clones foi realizada com base em procedimentos adotados por Pinkel *et al.* (1986), com pequenas adaptações. Os cromossomos foram contracorados com DAPI e analisados em fotomicroscópio óptico (Olympus BX61) e as imagens foram capturadas usando-se o programa Image Pro Plus, 6.0 software (MediaCybernetics).

Os fragmentos de DNA foram extraídos do gel de agarose 1% e ligados ao plasmídeo e a construção recombinante resultante foi utilizada para transformar bactérias *Escherichia coli*. Nove clones positivos foram identificados, caracterizados, sequenciados e estocados em freezer a -70°C. Destes, um clone foi selecionado para a realização de hibridação em membrana. O método de *Direct colony PCR screening* utilizado foi realizado com a raspagem e transferência de uma colônia branca da placa

de Petri de aproximadamente 1 mm de diâmetro para um Eppendorf de 1,5ml contendo 50µl de H<sub>2</sub>O milli-Q, colocando, em seguida a 94°C por 5 minutos e armazenando a 4°C.

Plasmídios recombinantes foram purificados a partir das bactérias e utilizados em reações de sequenciamento. As reações de sequenciamento foram feitas usando BigDye e o sequenciamento das amostras foi realizado em um sequenciador ABI3130 Capilares 80 cm, seguindo as especificações do fabricante. As sequências foram processadas e submetidas à pesquisa em banco de sequências (GenBank), utilizando-se o programa BLAST/N (Altschul *et al.*, 1990) do National Center for Biotechnology Information (NCBI) - website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Após a análise, as sequências foram alinhadas usando-se os programas ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) e GeneRunner Version 3.05.

## Resultados

A análise citogenética em indivíduos amostrados nas quatro populações de *Moenkhausia sanctaefilomenae* e nas espécies *M. cosmops* e *M. oligolepis* evidenciou um número diplóide constante 50 cromossomos, sendo os cariótipos constituídos por 3 pares de cromossomos metacêntricos e 22 pares submetacêntricos, além da ocorrência de cromossomos B variando que apresentaram variação inter e intraindividual nas populações de *M. sanctaefilomenae*.

A tríplice coloração CMA<sub>3</sub>/DA/DAPI aplicada aos cromossomos metafásicos de *M. sanctaefilomenae*, população do Ribeirão Araquá, evidenciou marcações constantes no par correspondente as RONS e também a presença de outras marcações nos cromossomos do complemento A, além de marcações presentes nos cromossomos B, facilitando assim sua identificação. Esta estratégia foi eficiente na escolha do cromossomo a ser microdissectado, uma vez que este cromossomo B apresenta frações de DNA ricas em pares GC (Figura 1).

A amplificação de um dos cromossomos B proveniente de indivíduo da população do ribeirão Araquá por DOP-PCR resultou em fragmentos de DNA com tamanhos que variaram de 300 e 900 pb denominado MsB (Figura 2). A hibridação da sonda MsB em preparações de cromossomos metafásicos de indivíduos da população do Araquá resultou em completa marcação de um único cromossomo B e sinais de hibridação em posição pericentromérica de 30 cromossomos do complemento A, nos

pares 02, 04, 05, 06, 08, 09, 13, 14 e 16; foram ainda identificados outros sinais de hibridação em apenas um dos homólogos nos pares 01, 10 e 20 e a utilização simultânea em experimentos de double-FISH com a sonda DNAr 18S evidenciou marcações em sintenia nos pares 07, 12, 15 e 17 (Figura 3-A).

Nos indivíduos analisados da população do ribeirão Alambari sinais de hibridação foram observados em posição pericentromérica em 22 cromossomos do complemento A, nos pares 04, 06, 07, 08, 11, 12, 18 e 21; outros sinais de hibridação em apenas um dos homólogos foram identificados nos pares 15 e 22. Marcações em sintenia com a sonda DNAr 18S foram identificadas nos pares 05, 14 e, no par cromossômico de número 15 apenas um dos homólogos mostrou sinais de hibridação. Nenhum sinal de hibridação foi verificado nos cromossomos B desta população (Figura 3-B).

Indivíduos da população do Córrego Olaria mostraram sinais de hibridação em posição pericentromérica em 28 cromossomos, sendo detectados nos pares cromossômicos 01, 06, 08, 09, 10, 11, 12, 13, 16, 19 e 22. Sinais de hibridação em apenas um dos homólogos foram observados nos cromossomos dos pares 02 e 05, estando em sintenia com a sonda de DNAr 18S nos pares 04 e 07. Nenhum sinal de hibridação foi verificado nos cromossomos B desta população (Figura 3-C).

Nos indivíduos da população do ribeirão Cubatão foram evidenciados sinais de hibridação em posição pericentromérica em 31 cromossomos do complemento A, localizados nos pares 01, 04, 06, 07, 08, 10, 11, 13, 14, 16, 17, 19 e 20, estando presente em apenas um dos homólogos no par 02. Sinais de hibridação foram observadas em sintenia com a sonda de DNAr 18S nos cromossomos do par número 05, sendo que nos pares 12 e 15 as marcas foram visualizadas em apenas um dos homólogos. Nenhum sinal de hibridação foi verificado nos cromossomos B nesta população (Figura 4-D).

Nos exemplares da espécie *M. cosmops*, sinais de hibridação foram verificados em posição pericentromérica em apenas 11 cromossomos do complemento A, estando presente nos pares 07, 08, 09, 11, 17 e em apenas um dos homólogos no par 16 (Figura 4-E). Na espécie *M. oligolepis*, foram observados sinais de hibridação em posição pericentromérica em 09 cromossomos do complemento A, sendo visualizadas nos pares 09, 10, 11 e 12 e em apenas um dos homólogos no par 13 (Figura 4-F). As preparações cromossômicas dos exemplares de *M. cosmops* e *M. oligolepis* analisados não revelaram

sinais de hibridação em sintonia com a sonda de DNAr 18S em experimentos de double-FISH.

A aplicação da técnica de FISH com a sonda de DNAr 18S revelou marcação constante nos cromossomos do par número 15 nos indivíduos das populações de *M. sanctaefilomenae*, que se mostraram correspondentes às RONS. Contudo, outras marcações menos persistentes puderam ser evidenciadas nas preparações dos exemplares analisados. Nos indivíduos da população do ribeirão Araquá foram observadas marcações na região terminal do braço longo dos pares 07, 12 e 17, além de marcações na região terminal do braço longo de apenas um dos homólogos do par 21 e no braço curto de apenas um dos homólogos do par 24. Cístrons ribossomais foram observados em somente um dos cromossomos B em 100% das células analisadas (Figura 3-A).

Nos indivíduos da população do ribeirão Alambari também foram observadas marcações na posição terminal do braço longo do par cromossômico 05, sendo que outras marcações também foram verificadas, localizadas em posição terminal do braço curto em apenas um dos homólogos desse mesmo par; em posição terminal no braço longo do par cromossômico 10; em posição terminal do braço curto dos cromossomos do par 14. No par 17 foram observadas marcações na posição terminal do braço longo em um dos homólogos e no braço curto no outro homólogo. Nenhum cístron ribossomal foi verificado nos cromossomos B desta população (Figura 3-B).

Cístrons ribossomais também foram encontrados nas preparações de indivíduos da população do ribeirão Olaria, onde foram observadas marcações na posição terminal do braço longo do par cromossômico 04, em posição terminal no braço curto do par 07 e no braço longo de apenas um dos homólogos do par cromossômico 14. Um dos cromossomos B dos exemplares desta população apresentou cístrons ribossomais em 100% das células analisadas (Figura 3-C).

Nos exemplares da população do ribeirão Cubatão foram observados marcações em posição terminal no braço longo dos cromossomos do par 05 e no braço curto do par 12, sendo que nenhuma marcação foi observada nos cromossomos B nos indivíduos analisados (Figura 4-D).

Nas espécies *M. cosmops* e *M. oligolepis*, cístrons ribossomais foram observados de modo constante nos cromossomos do par número 15 (Figuras 4-E e F).

Os fragmentos de DNA obtidos pela amplificação do cromossomo B por DOP-PCR foram purificados (Figura 5). A confirmação da presença de inserto nos plasmídios recombinantes foi realizada pela aplicação do método de PCR utilizando o primer M13, sendo obtidos nove clones positivos (Figura 6). Posteriormente, estes foram estocados em glicerol 25% e mantidos em freezer -70°C. O fragmento isolado foi denominado MsB.

A composição nucleotídica dos clones (MsB-01, MsB-02, MsB-05, MsB-06, MsB-07, MsB-08, MsB-10, MsB-11 e MsB-12) de *Moenkhausia sanctaefilomenae* foi determinada por sequenciamento (Figura 7). O clone MsB-01 é composto por 709pb e constituído por 43,16% de bases GC e 56,84% de bases AT; o MsB-02 por 215pb e 50,23% de bases GC e 49,77% de bases AT; o MsB-05 por 488pb e 61,07% de bases GC e 38,93% de bases AT; o MsB-06 por 227pb e constituído por 49,34% de bases GC e 50,66% de bases AT; o MsB-07 por 404pb e 57,43% de bases GC e 42,57% de bases AT; o MsB-08 por 213pb e 50,23% de bases GC e 49,77% de bases AT; o MsB-10 por 59,52% de bases GC e 40,48% de bases AT; o MsB-11 por 616pb e 62,01% de bases GC e 37,99% de bases AT e o MsB-12 é composto por 455pb e constituído por 55,60% de bases GC e 44,40% de bases AT. Todos os clones foram submetidos a análises comparativas com sequências do *GenBank*; entretanto, nenhuma similaridade foi encontrada com outras sequências conhecidas previamente publicadas.

## Discussão

Embora estudos cromossômicos já tenham sido realizados em várias espécies do gênero *Moenkhausia*, esta foi à primeira tentativa de microdissecção cromossômica e obtenção de sonda de cromossomo B heterocromático para utilização em experimentos de pintura cromossômica total (WCP) na espécie *Moenkhausia sanctaefilomenae*. Nesta espécie, os cromossomos B são facilmente identificados pelo seu tamanho reduzido e extremamente menor em relação aos cromossomos do complemento A.

Uma característica que se destaca nas espécies do gênero *Moenkhausia* é a ocorrência de variações interespecíficas quanto à presença de cromossomos B (Foresti *et al.*, 1989) ou ainda através do bandamento C, nos quais os cromossomos B se apresentam tanto eucromáticos como heterocromáticos. Para permitir a correta identificação para a microdissecção de microcromossomos B heterocromáticos, foi realizada a aplicação prévia da técnica de tríplex coloração (CMA<sub>3</sub>/DA/DAPI), como

descrita por Schweizer (1980). Esta metodologia mostrou-se bastante útil, uma vez que essas substâncias se ligam preferencialmente às sequências de bases AT (DAPI) ou GC (Cromomicina A<sub>3</sub>), revelando características composicionais dos blocos heterocromáticos (Rocchi, 1992). A aplicação desta técnica revelou marcações fluorescentes conspícuas correspondentes às RONS em um par de cromossomos submetacêntrico, além de sinais presentes nos cromossomos B, permitindo, assim, sua perfeita identificação, visto que este cromossomo apresenta sequências ricas em pares GC. Estas características foram seguramente importantes para o sucesso dos estudos realizados, visto que em muitas espécies de peixes a identificação de um dado cromossomo alvo é dificultada pela similaridade entre os cromossomos do cariótipo.

Em todas as populações de *M. sanctaefilomenae* e nas duas espécies *M. cosmops* e *M. oligolepis* analisadas neste estudo foram observados fortes sinais de hibridação com a sonda específica do cromossomo B também nos cromossomos do complemento normal, indicando a presença de sequências repetidas de DNA identificadas com as dos cromossomos B e que estes cromossomos teriam correspondência estrutural. O método de amplificação utilizado por DOP-PCR resultou na formação de sondas de DNA possivelmente enriquecidas com sequências repetitivas, tendo em vista que estas sondas foram produzidas e hibridadas a partir de regiões heterocromáticas. No entanto, fica evidente que o DNA repetitivo evidenciado pela sonda está presente em regiões específicas, apontando para a existência de uma possível estruturação organizada deste tipo de DNA repetitivo no genoma das espécies de *Moenkhausia*.

Sinais evidentes foram observados na região pericentromérica dos cromossomos do complemento A e em apenas um dos cromossomos B na população do ribeirão Araquá. A presença de sinais de hibridação em regiões pericentroméricas na maioria ou em parte dos cromossomos autossômicos permitiu concluir que este cromossomo B microdissectado teria sua origem a partir dos cromossomos do complemento A, uma vez que o sinal de hibridação estava presente na região heterocromática deste cromossomo B, determinando uma identificação com o DNA repetitivo presente também nos cromossomos do complemento autossômico, como apresentado também por Teruel *et al.*, (2009).

A presença de marcações evidentes na região pericentromérica dos cromossomos do complemento A demonstram que as espécies *M. sanctaefilomenae*, *M. cosmops* e *M. oligolepis* compartilham sequências repetitivas entre si, indicativo de que



estas espécies estejam diretamente relacionadas, reforçando evidências filogenéticas de que estas mesmas espécies também compartilham características morfológicas (Benine in prep.).

O compartilhamento de sequências de DNA repetitivo entre os cromossomos B e os do complemento A caracteriza-se como uma situação comum em diferentes organismos, como descrito em *Vulpes vulpes* (Yang *et al.*, 1999), *Apodemus peninsulae* (Rubtsov *et al.*, 2004), *Podisma sapporensis* (Bugrov *et al.*, 2004), *P. kanoi* (Bugrov *et al.*, 2007) e *Lacusta migratória* (Teruel *et al.*, 2009). As análises da estrutura molecular dos cromossomos B mostram que eles podem estar sujeitos ao silenciamento gênico, ao acúmulo de DNA repetitivo e a heterocromatinização (Leach, *et al.*, 2004). No entanto, a maior parte dos cromossomos B são heterocromáticos devido à presença de cromatina caracterizada por um alto nível de condensação durante o ciclo celular e essa compactação natural é resultante do alto conteúdo de DNA repetitivo, especialmente DNA satélites e DNA ribossomais (Camacho, 2005).

O DNA repetitivo foi considerado por muito tempo como material genético inerte ou como “lixo” do ponto de vista genômico, pois não apresentava uma função bem definida (Doolittle e Sapienza, 1980). No entanto, o seu acúmulo em áreas específicas dos cromossomos pode tornar tais sítios propícios a rearranjos como quebras, deleções, inversões e ampliações de regiões cromossômicas (Lim e Simmons, 1994; Dimitri *et al.*, 1997). Além de estarem envolvidos em distintos processos de diferenciação cariotípica, estes rearranjos também podem estar diretamente envolvidos com a origem dos cromossomos B. Deste modo, o estudo das famílias de DNA repetitivo que estão presentes no genoma dos representantes do gênero *Moenkhausia* aqui relacionados, poderiam contribuir para a compreensão dos mecanismos evolutivos envolvidos na diversificação cariotípica deste grupo de peixes.

A presença de cromossomos B sem sinais de hibridação com a sonda específica de cromossomo B poderia estar relacionada a eventos envolvidos com a origem destes cromossomos, apontando para uma possível origem independente. Além disso, o fato destes cromossomos apresentarem sequências repetitivas na sua estrutura que não foram detectadas nos demais cromossomos B permite destacar a possibilidade de existirem outras famílias de DNA repetitivo distribuídas no genoma destas espécies, ocorrendo tanto nos cromossomos B como nos do complemento A.

Diversos estudos relatam a presença de cromossomos B nas espécies de peixes da região Neotropical (Oliveira *et al.*, 2007), mas a maioria destes estudos estão relacionados apenas a descrição da ocorrência e da frequência destes elementos genômicos nos indivíduos e nas populações. Trabalhos relacionados à composição dos cromossomos B referem-se geralmente ao estudo da sua origem, como nos estudos realizados em *Astyanax scabripinnis* (Mestriner *et al.*, 2000) e em *Prochilodus lineatus* (Maistro *et al.*, 2000; Jesus *et al.*, 2003; Artoni *et al.*, 2006; Pansonato Alves *et al.*, in prep). Em *P. lineatus*, o uso de enzimas de restrição permitiu evidenciar que os cromossomos B possivelmente possuem uma constituição genômica diferente dos cromossomos do complemento A, em decorrência de alterações determinadas pelo processo de diferenciação destes cromossomos extras, sugerindo uma origem antiga para estes cromossomos (Maistro *et al.*, 2000). Em estudos realizados por Jesus *et al.*, (2003) e Artoni *et al.*, (2006) foi observado que o DNA satélite SATH1 é compartilhado tanto pelos cromossomos do complemento autossômico como pelos cromossomos B em populações de *P. lineatus* do rio Mogi-Guaçu e da Lagoa Dourada, da bacia do Rio Tibagi, sugerindo uma origem intra-específica para os cromossomos B nesta espécie. No entanto, nem todos os segmentos de heterocromatina dos cromossomos B eram compostos por DNA satélite SATH1, indicando que outras famílias de DNA repetitivos poderiam compor a estrutura destes cromossomos.

Evidências estruturais e funcionais do DNA satélite identificado em *A. scabripinnis*, com base na distribuição das sequências no cromossomo B, bem como no comportamento meiótico destes elementos genômicos, caracterizados pela ocorrência de auto-pareamento, determinaram a formulação proposta por Mestriner *et al.*, (2000) de que o cromossomo B metacêntrico corresponderia a um isocromossomo. Já em espécies de peixes do gênero *Characidium* (Pansonato-Alves *et al.*, in prep), a utilização de sondas específicas produzidas a partir dos cromossomos B em *C. cf. gomesi* e *C. pterosticum*, demonstraram que estes elementos genômicos compartilham sequências de DNA com cromossomos do complemento A, sugerindo uma possível origem intra-específica para os cromossomos B nestas espécies. No entanto, diferentemente de *Prochilodus* e *Astyanax*, os cromossomos B destas espécies de *Characidium* compartilham os mesmos segmentos heterocromáticos presentes nos cromossomos sexuais. Por outro lado, experimentos de hibridação *in situ* utilizando sondas produzidas a partir dos cromossomos B de *C. oiticicai* revelaram que os elementos cromossômicos

extras desta espécie aparentemente não compartilham sequências com os cromossomos do complemento A, apontando para a existência de uma origem independente destes elementos genômicos em relação aos cromossomos B de *C. cf. gomesi* e *C. pterostictum*.

De modo similar, os resultados obtidos no estudo dos exemplares da população de *M. sanctaefilomenae* do ribeirão Araquá demonstram que dos cromossomos B existentes nos indivíduos desta população, apenas um destes elementos genômicos compartilha sequências de DNA com os cromossomos do complemento A, sugerindo uma possível origem intra-específica para este cromossomo. Com relação aos demais cromossomos B encontrados nesta população, pode-se supor inicialmente que se trate de elementos diversificados, com origem independente daquele microdissectado, utilizado como sonda. Contudo, a hipótese de que os elementos supranumerários que se apresentam nesta população tenham tido origem comum e tenham se diferenciado durante o processo de diversificação das populações, atingindo características estruturais específicas, não pode ser descartada.

Os resultados obtidos através da aplicação da técnica de double-FISH com a sonda específica do cromossomo B e a sonda de DNAr 18S, evidenciaram a ocorrência de sintenia dessas duas sondas em alguns cromossomos do complemento autossômico nas populações de *M. sanctaefilomenae*. A aplicação da sonda de DNAr 18S revelou também um polimorfismo de sítios desse gene nas populações desta espécie. Alguns sítios deste marcador identificados nos cromossomos do complemento A apresentaram-se inativos nos indivíduos de algumas populações de *M. sanctaefilomenae*, sem apresentar reação positiva para a técnica Ag-NOR. Tais observações coincidem com resultados obtidos com *Triporthus venezuelensis* por Nirchio *et al.*, (2007), em que foi verificada uma grande variação em relação as regiões organizadoras de nucléolo, onde sequências de DNAr 18S foram distribuídas em nove pares de cromossomos, mas o número de cromossomos com RONS foi sempre inferior. Os autores demonstraram que as RONS ativas geralmente correspondem a segmentos com genes de DNAr 18S, porém várias sequências deste gene não foram coradas pela Prata, sugerindo que eles não correspondem as RONS ativas, caracterizando um polimorfismo associado com os cromossomos portadores de RONS na espécie *T. venezuelensis*.

Em espécies do gênero *Symphysodon* as regiões organizadoras de nucléolo demonstraram variação interespecífica e intraespecífica de tamanho e número, quando detectadas pelo nitrato de Prata. Na tentativa de compreender o processo de evolução

desse marcador os autores utilizaram a hibridação da sonda do gene RNAr 18S nos cromossomos mitóticos de *S. aequifasciatus*, *S. discus* e *S. haraldi*, concluído que o polimorfismo observado seria decorrente de duplicações e translocações ocorridas envolvendo estes segmentos, sugerindo a marcante atuação dos rearranjos cromossômicos estruturais na evolução dessas espécies (Gross *et al.*, 2010).

As análises cromossômicas realizadas nos indivíduos das populações de *M. sanctaefilomenae* do ribeirão Araquá e córrego Olaria com a sonda de DNAr 18S, permitiram identificar a presença de sítios ribossômicos em apenas um cromossomo B, que se mostrou presente em 100% das células analisadas. Constatou-se, portanto, que estes cromossomos possuem o segmento correspondente ao gene ribossômico, mas que estes não mostraram atividade quando submetidos à técnica de impregnação por nitrato de Prata, como em estudos descritos por Foresti *et al.*, (1989) e Portela-Castro, (2001). A identificação de sítios positivos à marcação com a sonda ribossomal nos cromossomos B não constituem novidade, uma vez que a presença deste tipo de DNA repetitivo tem sido frequentemente descrita nestes cromossomos (Green, 1990). A sugestão de que as regiões organizadoras de nucléolos são propensas a quebras cromossômicas em vegetais poderia reforçar a hipótese de que estas poderiam se constituir num dos mecanismos através do qual os cromossomos B seriam gerados, como parece ocorrer no híbrido entre *Solanum brevidens* e *Solanum tuberosum* (Mitchell-McGrath e Helgeson, 1998) e em representantes do gênero *Brachycome* (Houben *et al.* 1997).

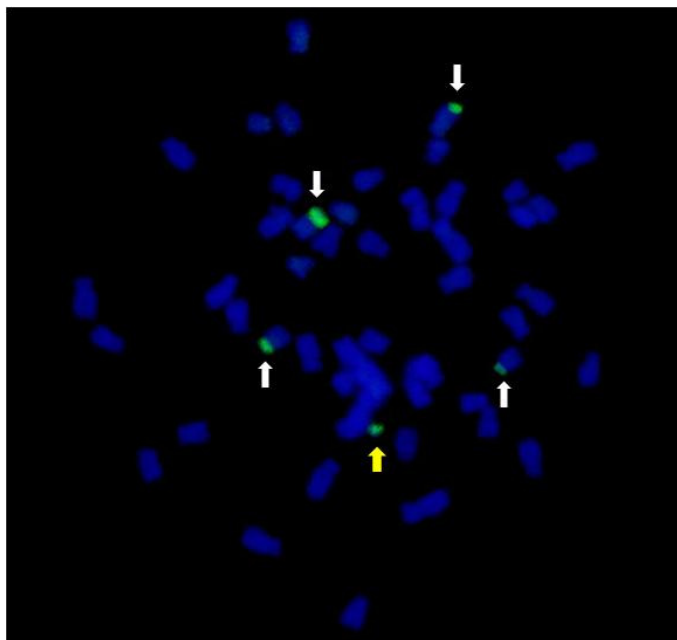
Em hipótese, pode se supor que rearranjos ocorridos envolvendo os segmentos contendo genes ribossomais alocados em alguns cromossomos do complemento autossômico de *M. sanctaefilomenae* teriam determinado sua transposição para outros cromossomos. Nesta reorganização estrutural, o processo de ruptura também pode ter liberado outros elementos genômicos, possibilitando a formação de pequenos fragmentos adicionais que ficaram a deriva junto ao conteúdo nuclear e poderiam ser transpostos para cromossomos diversos, incluindo os cromossomos B (Camacho *et al.*, 2000). É conhecido que os transposons são elementos móveis no genoma e podem ser transpostos através de dois mecanismos de mobilização diferentes. No primeiro, chamado de transposição replicativa, o elemento é copiado como parte de seu movimento, permanecendo uma cópia no sítio original, enquanto a outra é inserida em um novo sítio, contribuindo para um aumento no número de cópias do transposon. O

segundo mecanismo é conhecido como transposição não replicativa, quando o elemento sai do local antigo e se insere em um novo local sem nenhum aumento do número de cópias (Lewin, 2004). Tal fato parece ter ocorrido nos indivíduos das populações do ribeirão Araquá (Fig. 3A) e Córrego Olaria (Fig. 3C), em que a marcação para o gene ribossomal 18S é encontrada em um cromossomo B, ao mesmo tempo em que os pares autossômicos 7 e 4, respectivamente, apresentam apenas um dos homólogos marcados.

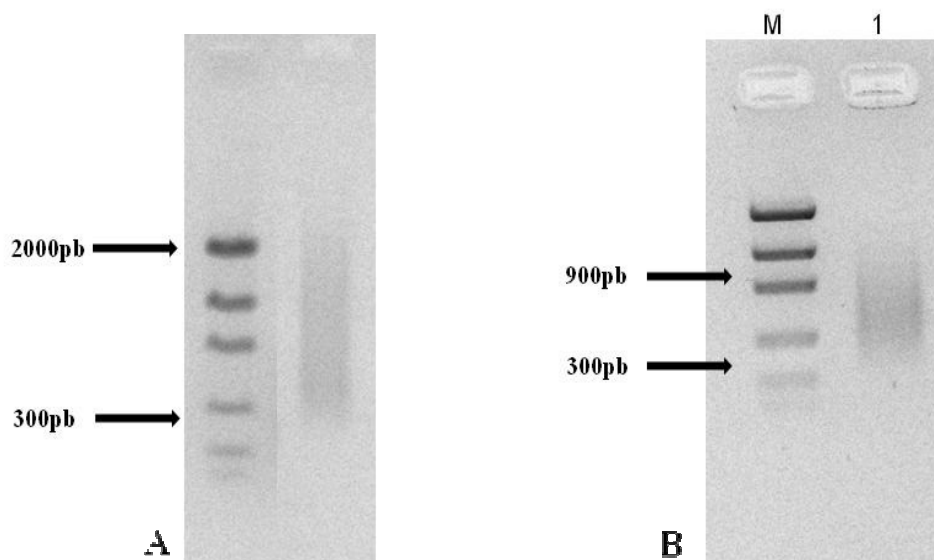
Até recentemente os transposons eram vistos como DNA “lixo” sem qualquer função importante. Porém, sabe-se hoje estes segmentos podem gerar mutações, modificar os padrões de expressão gênica e promover rearranjos cromossômicos, desempenhando assim, um papel fundamental na trajetória evolucionária de seus hospedeiros (Feschotte e Prithman, 2007). Neste sentido, a constatação dos movimentos de segmentos cromossômicos e genes no cariótipo das espécies podem resultar em informações de interesse para a compreensão do processo de diversificação e evolução das espécies. Assim, a reiterada ocorrência de cromossomos B em peixes evidencia a importância dos estudos que envolvem esses elementos genômicos, com o objetivo de melhor compreender sua origem, os mecanismos evolutivos envolvidos no seu processo de fixação nas diferentes populações, bem como o seu papel dentro do genoma desses vertebrados.

### **Referências Bibliográficas**

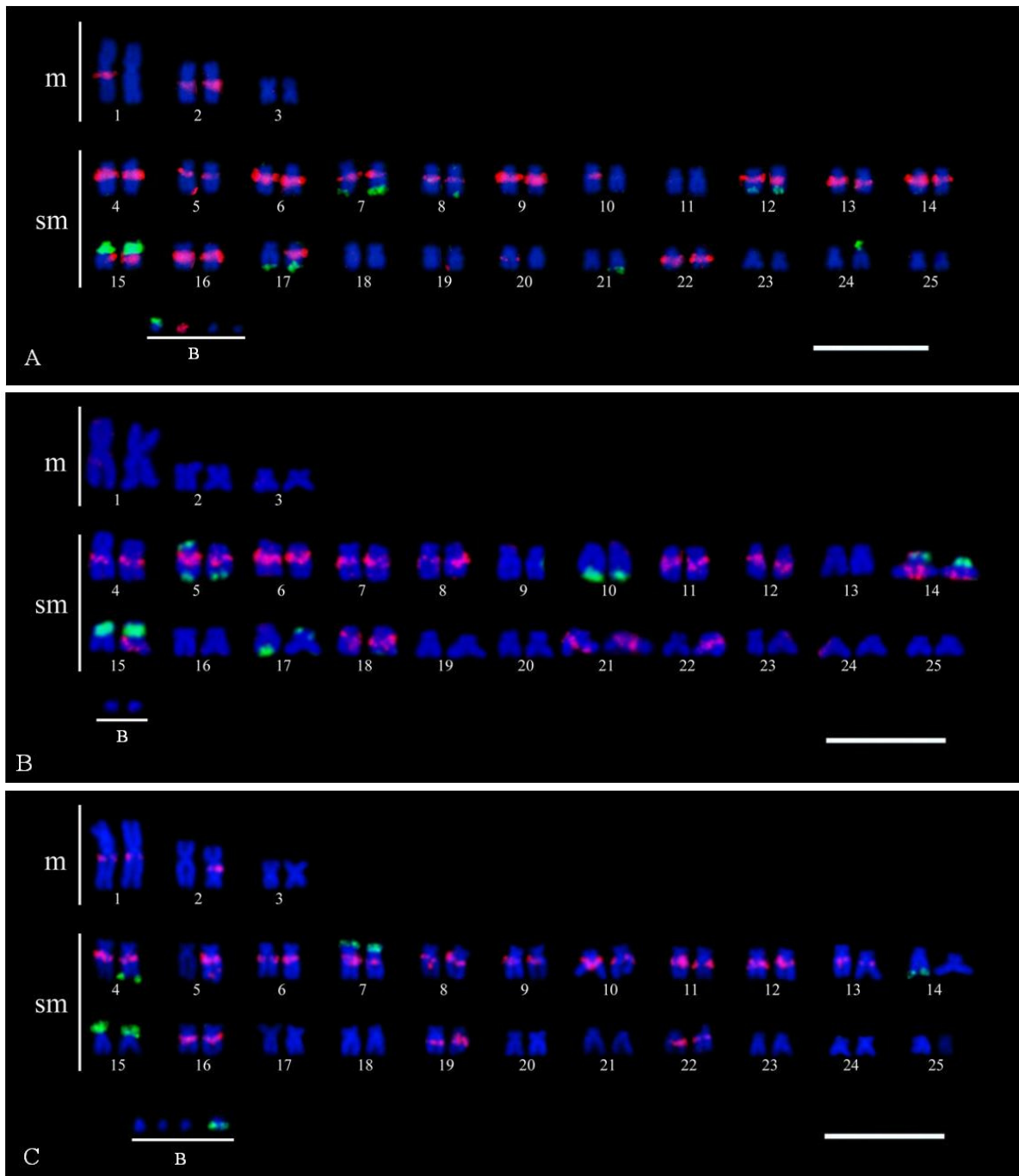
As referências correspondentes a este capítulo encontram-se no final desta tese.



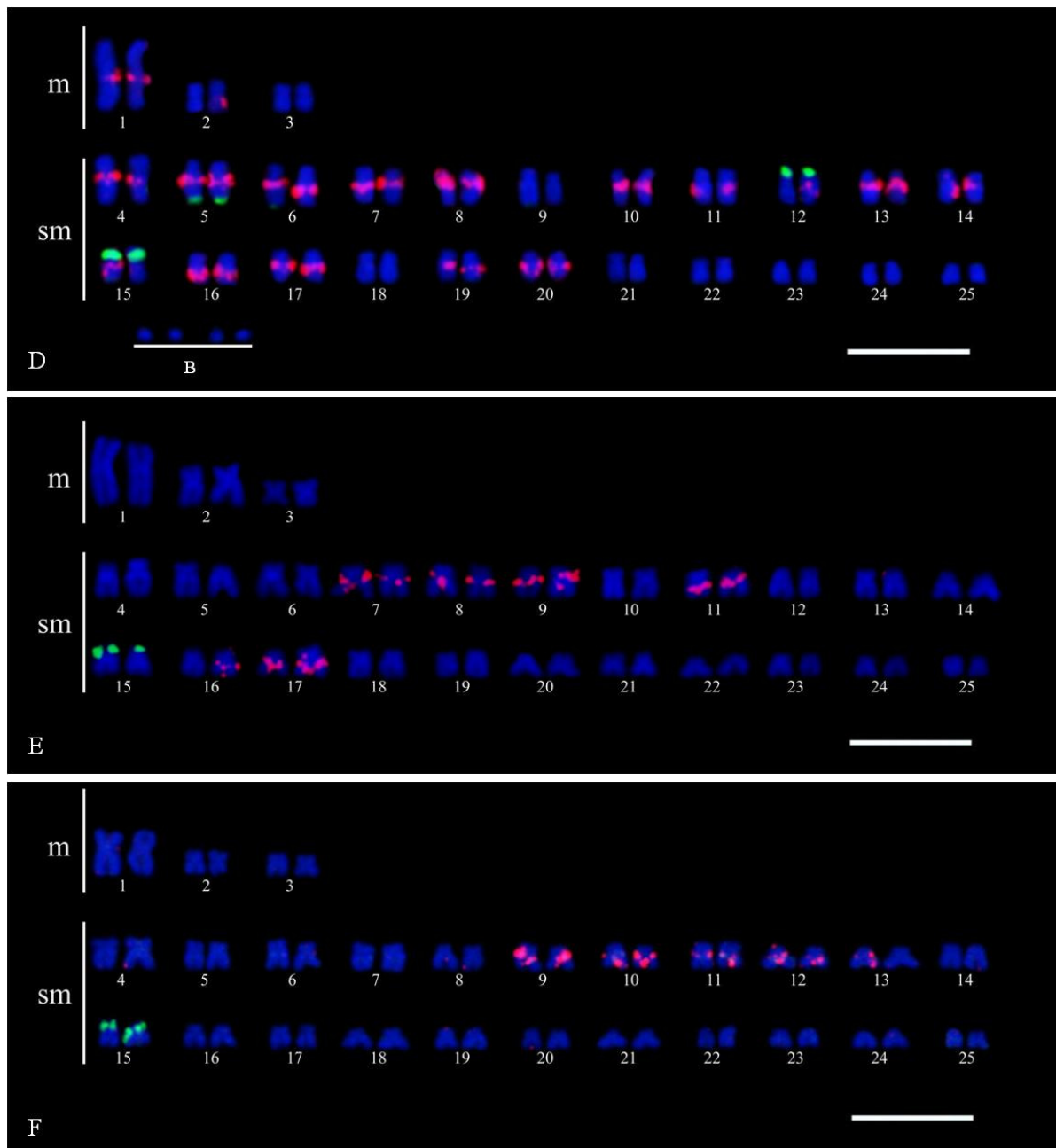
**Figura 1:** Tríplice coloração CMA<sub>3</sub>/DA/DAPI em metáfases de *Moenkhausia sanctaefilomenae* do ribeirão Araquá. As setas em branco indicam marcações ricas em GC nos cromossomos do complemento padrão e a seta em amarelo indica marcação em um cromossomo B heterocromático.



**Figura 2:** Análise dos fragmentos de DNA em *Moenkhausia sanctaefilomenae*. A) Gel de agarose 1% mostrando os fragmentos da 3ª PCR. B) fragmentos digeridos pela DNase para otimização da sonda para FISH.

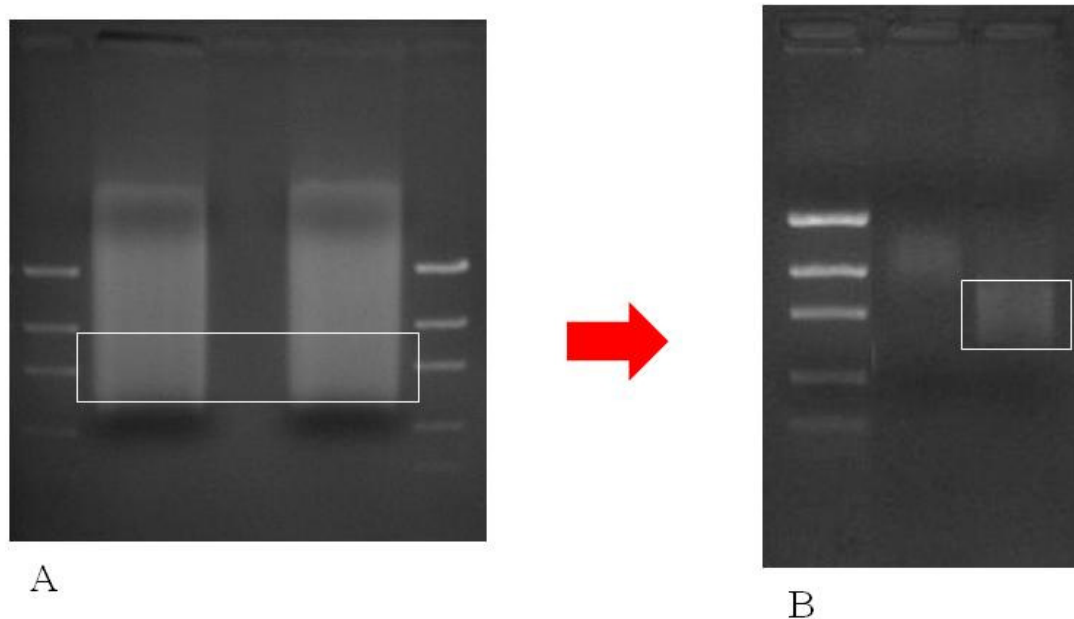


**Figura 3:** Hibridação *in situ* fluorescente em cromossomos metafásicos de populações de *Moenkhausia sanctaefilomenae* (A, B e C) após hibridação com sonda MsB (marcado com Digoxigenina) (vermelho), evidenciando marcações pericentroméricas nos cromossomos do complemento A. Notar marcação em apenas um dos cromossomos B em exemplar do ribeirão Araquá (A). A hibridação com sonda de DNAr 18S (marcado com biotina) (verde) marcou cromossomos relacionados à NOR, estando em sintenia com a marcação pela sonda MsB. Apenas um cromossomo B nas populações do ribeirão Araquá (A) e do córrego Olaria (C) apresentou marcação com a nucleolar. A barra representa 10 μm.

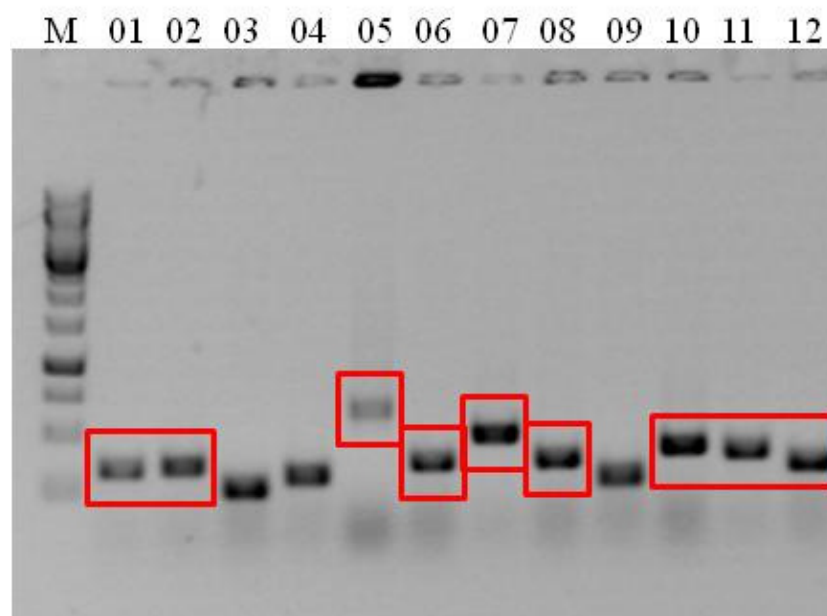


**Figura 4:** Hibridação *in situ* fluorescente em cromossomos metafásicos nas espécies *M. sanctaefilomenae*, população do ribeirão Cubatão (D), *M. cosmops* (E) e *M. oligolepis* (F), após hibridação com sonda MsB (marcado com Digoxigenina) (vermelho), evidenciando marcações pericentroméricas nos cromossomos do complemento A. A hibridação com sonda de DNAr 18S (marcado com biotina) (verde) marcou cromossomos relacionados à NOR nestas espécies, estando em sintenia com a marcação pela sonda MsB apenas em *M. sanctaefilomenae*. A barra representa 10  $\mu$ m.





**Figura 5:** Produção de sonda de cromossomo B de *Moenkhausia sanctaefilomenae*. A) Gel de agarose do produto da 2ª DOP-PCR. B) Purificação do gel de agarose dos fragmentos da 2ª DOP-PCR para clonagem.



**Figura 6:** Gel do produto de PCR dos clones obtidos para a espécie *M. sanctaefilomenae* a partir dos fragmentos da DOP-PCR. M - Marcador Ladder 1Kb plus; 1 a 12 - Clones amplificados com o primer M13.

**MsB-01**

CCTCTAGATGCATGCTCGAGCGGCCGCCAGTGTGATGGATATCTGCAGAATTCGCCCTTCCGACTCGAGG  
 GTTGTATGTGGTGTGGTTTCTGTTTCTGTGATACTTTGCTGAGGATAAATTATTTGTTTTTCATTGTT  
 GAATTGTAAAGAAAAATTTAAACCCTAAAGAGTTAAAGTCTGACCATTTACCCAATTGTGATTTTCATT  
 ATTTGTAACATAATAATTTTATTCATTTAGAAAACAGCATAACGAAGCATTGAATTAATAATGTGATTAAGTA  
 GAATGAATTTACAGGTACATTTTGCACAGATCTAATATTTCTAGCTATCTTTGCCTAGCTAGATGCTTGAG  
 ATGATTTTTCCACATAGTGAATCAGTGTGTATCCTTTTTGCCACATGATGGCCTCGAGAGAATCATGTG  
 GTCCGACTCGAGAGAATCATGTGGTCCGACTCGAGAGAATCATGTGGTCCGACTCGAGAGAATCATGTGG  
 TCCGACTCGAGTTCCCTATGTGGCCGACTCGAGATTCCCTATGTGTCCGACTCGAGTGGCGAATGTGGCCG  
 ACTCGAGAGTGCATGTGGTCCGACTCGAGGCAAGAATGTGGTCAAGGGCGAATTCAGCAACACTGGCG  
 GCCGTTACTAGTGGATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTACCTA  
 AATAGCTGG

**MsB-02**

CAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCCTCTAGATGCATGCTCGAGCGGCCGCCAG  
 TGTGATGGATATCTGCAGAAATTCGCCCTAAGGGCGAATTCAGCACACTGGCGGCCGTTACTAGTGGATC  
 CGAGCTCGGTACCAAGCTTGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTACCTAAATAGCTTGGCGTAATC  
 ATGGT

**MsB-05**

GTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCCTCTAGATGCATGCTCGAGCGGCCGCCAGTGTGATGGA  
 TATCTGCAGAATTCGCCCTTCAATGGCTGGGCGCTGGCCTCGCACCGCTGCGGATACGGATCGCCGCCA  
 TCGGCCAGGCGTTGCGGGATCCGTGGAAGGAGAACATCAGCTTCTGGCCACGGCCGTGCTGTTCCAGT  
 AGCGCTGGATGGAACCGGCAACGGCCTCGACCCAGCCGGGTGACCCGAATAGTCGCGCACCAGGCTGAC  
 CGTCACGCCGGGTTGCGGCGCTGCCAGGCATCGACGCGGTCTTCGACCGAGGCGGTGGTGGTGGTTCGAG  
 TATTGCGGATACAGCGGCAGCACCAAGGGCGAATTCAGCACACTGGCGGCCGTTACTAGTGGATCC  
 GAGCTCGGTACCAAGCTTGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTACCTAAATAGCTTGGCGTAAT

**MsB-06**

AGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCCTCTAGATGCATGCTCGAGCGGCCGCCAGT  
 GTGATGGATATCTGCAGAAATTCGCCCTTATTCGGATAGTGAAGGGCGAATTCAGCACACTGGCGGCCG  
 TTACTAGTGGATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTACCTAAATA  
 GCTTGGCGTAATCATGG

**MsB-07**

AATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCCTCTAGATGCATGCTCGAGCGGCCGCCAGTGTGA  
 TGGATATCTGCAGAAATTCGCCCTTACCATCCGCATCGTGTGCGAAATCACCGAGTCCAACGGCTCGTGC  
 TCGATGGCTTCGGTCTGCGGCGGCTCGCTGGCCATGATGGACGCCGGCGTCCGGTCAAGGATCACGTGG  
 CCGCGTGGCCATGGGCCGTGATCCTGGACGGTGGCAAGTTCGCCGTGCTGACGGACATCCTGGGTGACGA  
 AGATCACCAAGGGCGAATTCAGCACACTGGCGGCCGTTACTAGTGGATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTG  
 ATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGG

**MsB-08**

GTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCCTCTAGATGCATGCTCGAGCGGCCGCCAGTG  
 TGATGGATATCTGCAGAAATTCGCCCTTAGGGCGAATTCAGCACACTGGCGGCCGTTACTAGTGGATCCG  
 AGCTCGGTACCAAGCTTGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTACCTAAATAGCTTGGCGTAATCAT  
 GGT

**MsB-10**

ATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCCTCTAGATGCATGCTCGAGCGGCCGCCAGTGTGAT  
 GGATATCTGCAGAAATTCGCCCTTAGGGCATGAAGTTCCCGAGGCCGCCGACATCGTGGTGGTTCGGCCAT  
 GAGCAAGACCGGCCGCAACCGCCCGCGCAACGCCCTTCAACCTGCGCCAGCGCCTGCGCTGGGTTCGCGCTG  
 GCGCTGGGCCCTGTGCTCGGTGTCGCTGGTTGGCCGTGCTGCCTATGTGCAGATCATCAACAGCGACTTCT  
 ACCAGCGCCAGGGCGAGGCCGTTAAGGGCGAATTCAGCACACTGGCGGCCGTTACTAGTGGATCCGAG  
 CTCGGTACCAAGCTTGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGG

**MsB-11**

TACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCCTCTAGATGCATGCTCGAGCGGCCGCCAGTGTGATGGATATC  
 TGCAGAATTCGCCCTTGACCCGATCGATTTTCAGCGAAGCTGACGCGCAGTTCTTCGCCGAGCTGAGTGCG  
 GCCGCCGCGGACTTCAATCCGCAGGCCGTGGCTGCACCGACCGTTGCCGAAGCGTCCGTTGCGACGGATG  
 CCGAGGCCGGTTTCGAAGCAGGCTTCGATGATGACGCCGAGAACATCGACGAGGACATCCGCGAGGTGTT  
 CCTGGAAGAGTTTCGACGACGAACCTGGCCAATCTCGGCACCTTGCTGCCGGCATGGCGCATGCAGCCGGAC  
 AACATGGACCGGCTGCGGCCGATCCGCCGCATCTTCCACACCCTCAAGGGCAGTGGCCGCTGGTTCGGTG  
 CACGCACCCTGGGCGAGTTTCGCGTGGAAAGATCGAGGGCATGCTCAACCGCGTGCTCGATGGCAGCCGCC  
 GGCTTCGCCGGCGGTGCTGGCCAAAGGGCGAATTCAGCACACTGGCGGCCGTTACTAGTGGATCCGAGC  
 TCGGTACCAAGCTTGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTACCTAAATAGCTT

**MsB-12**

TGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCCTCTAGATGCATGCTCGAGCGGCCGCCAGTGT  
 GATGGATATCTGCAGAATTCGCCCTTCAGGCTCATGTGTGGTTTTCCTGCCGAGGGGACGCTCGATGGTGT  
 GGCAGGCACTTCGCAGGCTGCTATCGGGGAATGCTGGCGAAGCGGCTAGGAGGATTCGGCAGCCGGCTT  
 TCGAGAGTGGCCGCTCGCCATGCCCTGATAGCACCACAGAGATTCGCGCGATCTCCGGATTCGTTGCAGC  
 ATCGCTTGCAGGAACTGGCGTCTCTGCCCGGTTCTCCACAGGTTTATTAAAGCCTCTGTCAAGGGCGAA  
 TTCCAGCACACTGGCGGCCGTTACTAGTGGATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTGATGCATAGCTTGAGTAT  
 TCTATAGTGTACCTAAATAGCTTGGCGTAATCAT

**Figura 7:** Sequências de nucleotídeos dos fragmentos de DNA provenientes da DOP-PCR do microcromossomo B dissecado da espécie *Moenkhausia sanctaefilomenae*.

## Considerações Finais

Os estudos moleculares realizados no presente trabalho, em espécies do gênero *Moenkhausia* trouxeram uma particular contribuição acerca da organização genômica, tendo em vista a escassez de informações existentes, principalmente no que diz respeito à composição da heterocromatina constitutiva, visto que estudos anteriores já indicavam a importância da heterocromatina como elemento primordial no processo de diferenciação cromossômica. Do ponto de vista citogenético, entre os representantes do gênero *Moenkhausia* o número diplóide mais frequente é composto por 50 cromossomos, com cariótipos constituídos principalmente de cromossomos dos tipos metacêntricos e submetacêntricos, além de variações interespecíficas quanto à presença ou ausência de cromossomos B.

A análise citogenética convencional e molecular em exemplares da espécie *Moenkhausia sanctaefilomenae* provenientes do Ribeirão Araquá, evidenciou a distribuição da heterocromatina constitutiva localizada principalmente nas regiões centroméricas e pericentroméricas de diversos cromossomos do complemento cariotípico; blocos de heterocromatina também foram localizados na região telomérica em alguns cromossomos, além da presença de cromossomos B eucromáticos e heterocromáticos. A análise das regiões organizadoras de nucléolos evidenciou um sistema de RONS múltiplas e com a aplicação desta técnica não foram verificadas RONS ativas nos cromossomos B. Marcações cromossômicas por fluorocromos GC-específicos têm sido associada à identificação das RONS. Fluorocromos como a CMA<sub>3</sub> revelam regiões da cromatina ricas em GC, e o tratamento com este fluorocromo evidenciou sinais relacionados aos segmentos correspondentes às RONS, além de outras marcações nos cromossomos do complemento padrão, além da presença de pequenos sinais nos cromossomos B nesta espécie. A aplicação desta técnica, de certo modo, permitiria a identificação das RONS independentemente de sua atividade na interfase anterior. Contudo, sua aplicação com este objetivo não tem sido considerada definida, uma vez que regiões ricas em GC mas sem relação com a NOR também podem dar sinal positivo.

A aplicação da técnica double-FISH, evidenciou sítios com a sonda de DNAr 5S localizado na região centromérica de dois pares de cromossomos do complemento padrão e com a sonda de DNAr 18S foram localizados sítios ribossômicos no braço do

curto de um par constante, outra marcação em apenas um dos homólogos no braço longo de um par submetacêntrico, além da presença de sítios ribossômicos nos cromossomos B.

Portanto, com essas informações preliminares, a espécie *Moenkhausia sanctaefilomenae* do Ribeirão Araquá torna-se um modelo bastante interessante para estudos moleculares sobre a estrutura e função das sequências repetidas ligadas aos cromossomos B e também a possíveis eventos de rearranjos cromossômicos que tenham ocorridos nesta espécie.

Estudos com elementos repetitivos vêm crescendo nos eucariotos, principalmente nos peixes. No entanto, no presente trabalho foi isolada uma sequência repetitiva no genoma de *Moenkhausia sanctaefilomenae*, que foi denominada *MsHinf*. Esta sequência está organizada em *tandem*, caracterizando-se como uma sequência satélite. Essas sequências são altamente repetidas, apresentando-se geralmente organizadas em clusters nas regiões heterocromáticas.

Os experimentos de hibridação *in situ* foram realizados com o intuito de se estabelecer os padrões de distribuição e o possível grau de conservação do DNA satélite encontrados no genoma das espécies do gênero *Moenkhausia*. Esta sequência satélite está distribuída na região pericentromérica na maioria dos cromossomos do complemento A das populações de *M. sanctaefilomenae* e menos dispersas no genoma das espécies *M. cosmops* e *M. oligolepis*, evidenciando que essas sequências são compartilhadas, podendo refletir algum papel importante para sua manutenção nestas espécies e inferir sobre a existência de outras classes de heterocromatina de diferentes famílias de DNA satélite no genoma das espécies do gênero *Moenkhausia*.

A microdissecção de um cromossomo B heterocromático de *M. sanctaefilomenae* do ribeirão Araquá e a obtenção de sonda para pintura cromossômica foram metodologias eficientes em *Moenkhausia*. Em todas as populações/espécies testadas foram verificadas marcações na região pericentromérica dos cromossomos do complemento A, e apenas um cromossomo B da população do ribeirão Araquá apresentou-se totalmente hibridado. A ocorrência de sinais de hibridação em regiões pericentroméricas na maioria ou em parte dos cromossomos do complemento A permitiu concluir que somente este cromossomo B microdissectado teria sua origem a partir destes cromossomos, uma vez que o sinal de hibridação estava presente na região heterocromática deste cromossomo B que poderia ser composto de DNA repetitivo

presente também nos cromossomos do complemento autossômico, sugerindo uma possível origem intra-específica para este cromossomo.

Diferentes mecanismos poderiam explicar a origem independente dos cromossomos B nas populações de *M. sanctaefilomenae* postulada por processos normais de síntese do material genômico nas células ou no processo de reorganização estrutural dos cromossomos possibilitariam a liberação de elementos genômicos, dando a formação a pequenos fragmentos adicionais que ficaram a deriva no conteúdo nuclear seguindo processos naturais de manutenção ou desmanche. Seguidos processos de formação de novos centrômeros, telomerização da parte final destes elementos genômicos e amplificação do DNA, culminariam com a formação dos cromossomos B atualmente existentes.

Nas análises em *M. sanctaefilomenae* nas populações do ribeirão Araquá e córrego Olaria com a sonda de DNAr 18S, a presença de sítios ribossômicos foi verificada em alguns cromossomos do complemento A e em apenas um cromossomo B, não estando ativos quando submetidos à impregnação por nitrato de Prata. Com base nos resultados obtidos em relação às marcações encontradas nos cromossomos B com esta sonda, em hipótese as regiões organizadoras de nucléolos são propensas a quebras cromossômicas e isso poderia se constituir num mecanismo através do qual esses cromossomos B seriam gerados ou ainda poderiam se originar por transferência horizontal (elementos transponíveis). Considera-se que, os estudos com marcadores citogenéticos estruturais e moleculares realizados em peixes, com representantes do gênero *Moenkhausia* resultaram em informações de interesse, que poderá proporcionar condições para uma melhor compreensão da composição, estrutura, função, bem como da origem e evolução destes elementos genômicos nos peixes.

## Referências Bibliográficas

- Abuín M, Clably C, Martínez, P (1996). A NOR-associated repetitive element present in the genome of two Salmo species (*Salmo salar* and *Salmo trutta*). *Genome* 39: 671-679.
- Alberdi AJ, Fenocchio A (1997). Karyotypes of five Tetragonopterinae species (Pisces, Characidae) from Argentina. *Cytologia* v.62, n.2, p.171-176.
- Almeida-Toledo LF, Ozouf-Costaz C, Foresti F, Bonilho C, Porto-Foresti F, Daniel-Silva MFZ (2002). Conservation of the 5S-bearing chromosome pair and colocalization with major rDNA clusters in five species of *Astyanax* (Pisces, Characidae). *Animal Cytogenetics and Comparative Mapping. Vol: 97, 229-233.*
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, v.215, p.403-410.
- Amemiya CT, Gold JR (1986). Chromomycin A<sub>3</sub> stains nucleolus organizer regions on fish chromosomes. *Copeia* 226-231.
- Amores A, Martinez G, Reina J, Alvarez MC (1993). Karyotype, C-banding, and Ag-NOR analysis in *Diplodus bellottii* (Sparidae, Perciformes). Intra-individual polymorphism involving heterochromatic regions. *Genome* 36: 672-675.
- Andreatta AA, Almeida-Toledo LF, Oliveira C, Toledo-Filho AS. (1992). Chromosomes studies in *Hypoptopomatinae* (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). I: XX/XY sex chromosome heteromorphism in *Pseudotocinclus tietensis*. *Cytologia*, v.57, p.369-372.
- Andreatta AA, Almeida-Toledo LF, Oliveira C, Toledo-Filho AS. (1993). Chromosomes studies in *Hypoptopomatinae* (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). II: ZZ/ZW sex chromosome system, B chromosomes and constitutive heterochromatin differentiation in *Microlepidogaster leucofrenatus*. *Cytogenet. Cell Genet.* v.63, p. 215-220.
- Arefjev, VA (1990). Problems of Karyotypic variability in the family Characidae (Pisces, Characiformes) with description of somatic karyotypes for six species of tetras. *Caryologia* 43: 305-319.
- Artoni RF, Molina WF, Bertollo, LAC, Galetti Jr. PM (1999). Heterochromatin analysis in the fish species *Liposarcus anisitsi* (Siluriformes) and *Leporinus elongatus* (Characiformes) *Genet. Mol. Biol.* V.22 n.1.
- Artoni, RF, Vicari, MR, Bertollo, LAC (2000). Citogenética de Peixes Neotropicais: Métodos, Resultados e Perspectivas. *Biological and Health Sciences*, 6(1): 43-60.
- Artoni RF, Falcão J N, Moreira-Filho O, Bertollo LAC (2001). An uncommon condition for a sex chromosome system in Characidae fish. Distribution and differentiation of ZZ/ZW system in *Triportheus*. *Chromosome Res.* 9: 449-456.
- Artoni RF, Vicari MR, Endler AL, Cavallaro ZI, Jesus CM, Almeida MC, Moreira-Filho O, Bertollo, LAC (2006). Banding pattern of A and B chromosomes of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae), with comments on B chromosomes evolution. *Genetica* 127: 277-284.

- Azevedo MFC, Oliveira C, Martins C, Wasko AP, Foresti F (2005). Isolation and characterization of a satellite DNA family in *Achirus lineatus* (Teleostei: Pleuronectiformes: Achiridae). *Genetica*, v.125, p.205-210.
- Bachmann L, Schibel JM, Raab M, Sperlich D (1993). Satellite DNA as a taxonomic marker. *Biochem. System. Ecol.*, 21: 3-11.
- Benine RC (2002). *Moenkhausia levidorsa*, a new species from Rio Aripuanã, Amazon Basin, Brazil (Characiformes: Characidae). *Ichthyol. Explor. Freshwaters*, vol. 13, n° 4, pp. 289-294.
- Bertollo LAC, Takahashi CS, Moreira-Filho O (1978). Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Rev. Bras. Genet.* 1: 103-120.
- Bertollo LAC, Fontes MS, Fenocchio AS, Cano J (1997). The X1X2Y sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus*. I. G-, C- and chromosome replication banding. *Chrom. Res.* 5: 493-499.
- Bertoni L, Attolini C, Faravelli M, Simi S, Giulotto E (1996). Intrachromosomal telomere-like DNA sequences in Chinese hamster. *Mamm Genome*, 7: 853-855.
- Beukeboom, LW (1994). Blwildering Bs an impression of the 1st B – chromosome conference, *Heredity*, 73: 328-336.
- Bezerra DD, Bertollo LAC (2003). Karyotypic studies on *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Pisces, Erythrinidae) populations. A biodiversity analysis. *Caryologia (Firenze)*, v. 56, n. 3, p. 303-311, 2003.
- Biet E, Sun J, Dutreix M (1999). Conserved sequence preference in DNA binding among recombinant proteins: abnormal effect of sDNA secondary structure. *Nucl. Acid. Res.*, v.27, p.596- 600.
- Brinkman JN, Sessions SK, Houben A, Green DM (2000). Structure and evolution of supernumerary chromosomes in the Pacific giant salamander, *Dicamptodon tenebrosus*. *Chromosome Res.*, 8: 477-485.
- Bugrov AG, Karamysheva TV, Pyatkova MS (2003). B chromosomes of the *Podisma sapporensis* Shir (Orthoptera, Acrididae) analyzed by chromosome microdissection and FISH. *Folia Biol Krakow*, 51: 1-11.
- Bugrov AG, Karamysheva TV, Rubtsov DN, Andreenkova OV, Rubtsov NB (2004). Comparative FISH analysis of distribution of B chromosome repetitive DNA in A and B chromosomes in two subspecies of *Podisma kanoi* Storozh (Orthoptera, Acrididae). *Cytogenet Genome Res.*, 106: 284-288.
- Bugrov AG, Karamysheva TV, Perepelov EA (2007). DNA content of the B chromosomes in grasshopper *Podisma kanoi* Storozh (Orthoptera, Acrididae). *Chromosome Research*, 15: 315-325.
- Camacho, JPM (1993). Polymorphisms and geographic distribution. In: First B – Chromosome conference. Universidade Autonoma de Madrid. Madrid. Spain.
- Camacho JPM, Sharbel TF, Beukeboom LW (2000). B chromosome evolution. *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. B* 355: 163-178.
- Camacho JPM (2005). B chromosomes. In: Gregory, TR. *The evolution of the genome*. San Diego, California, USA, p. 223-286.



- Canapa A, Cerioni PN, Barucca M, Olmo E, Caputo V (2002). A centromeric satellite DNA may be involved in heterochromatin compactness in gobiid fishes. *Chromosome Research* 10: 297-304.
- Carvalho RA, Dias AL (2005). Cytogenetics characterization of B chromosomes in two populations of *Iheringichthys labrosus* (Pisces, Pimelodidae) from the Capivara reservoir (Paraná-Brazil). *Caryologia*, 58: 269-273.
- Carvalho RA, Martins-Santos IC, Dias AL (2008). Review Paper: B chromosomes: an update about their occurrence in freshwater Neotropical fishes (Teleostei). *Journal of Fish Biology*, 72: 1907-1932.
- Castiglia R, Garagna S, Merico V, Oguge N, Corti M (2006). Cytogenetics of a new cytotype of African *Mus* (subgenus *Nannomys*) *minutoides* (Rodentia, Muridae) from Kenya: C- and G- banding and distribution of (TTAGGG)<sub>n</sub> telomeric sequences. *Chromosome Research* 14: 587-594.
- Cavallaro ZI, Bertollo LAC, Perfectti F, Camacho JPM (2000). Frequency increase and mitotic stabilization of a B chromosome in the fish *Prochilodus lineatus*. *Chrom. Res.* 8: 627-634.
- Centofante L, Bertollo LAC, Moreira-Filho O. (2001). Comparative cytogenetics among sympatric species of *Characidium* (Pisces, Characiformes). Diversity analysis with the description of a ZW sex chromosome system and natural triploidy. *Caryologia* 55: 253-260.
- Cestari NA (1973). Métodos de estudo dos cromossomos de vertebrados. *in*: Exercícios práticos de genética. Companhia Editora Nacional – Editora da Universidade de São Paulo. Pp. 29-31.
- Charlesworth B, Snegowski P, Stephan W (1994). The evolution dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature*, v.371, p.215-220.
- Cheng YM, Lin BY (2003). Cloning and characterization of maize B chromosome sequences derived from microdissection. *Genetics*, 164: 299-310.
- Chew JSK, Oliveira C, Wright JM, Dobson MJ (2002). Molecular and cytogenetic analysis of the telomeric (TTAGGG)<sub>n</sub> repetitive sequences in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae). *Chromosoma*, v.111, p. 45-52.
- Claro, FL (2008). *Gymnotus carapo* e *Gymnotus sylvius* (Teleostei: Gymnotidae). Uma abordagem citogenético molecular. Dissertação mestrado, USP-São Paulo.
- Csank AK, Henikoff S (1998). Something from nothing: the evolution and utility of satellite repeats. *Trends Genet.*, v.14, n.5, p.200-204.
- Dantas ESO, Vicari MR, Souza IL, Moreira-Filho O, Bertollo LAC, Artoni, RF (2007). Cytotaxonomy and karyotype evolution in *Moenkhausia sanctaefilomenae*, 1903 (Teleostei, Characidae). *The nucleus* vol. 50 (3): 505-518.
- Datta U, Dutta P, Mandal RK (1988). Cloning and characterization of a highly repetitive fish nucleotide sequence. *Gene*, 62: 331-336.
- Deininger PL, Moran JV, Batzer MA, Kazazian JRHH (2003). Mobile elements and mammalian genome evolution. *Current Opinion in Genetics & Development*, v.13, p.651-658.

- De Rosa LVS, Foresti F, Wasko AP, Oliveira C, Martins C (2008). Identification and description of distinct B chromosomes in *Cyphocarax modestus* (Characiformes, Curimatidae). *Genetics and Molecular Biology*, v. 31, p. 265-269.
- Devlin RH, Stone GW, Smailus DE (1998). Extensive direct-tandem organization of a long repeat DNA sequence on the y chromosome of *Chinook salmon* (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Journal of Molecular Evolution*, 46 (3): 277-287.
- Devlin RH, Nagahama Y (2002). Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture* 208:191-364.
- Dias AL, Foresti F (1993). Cytogenetic studies on fishes of the family *Pimelodidae* (Siluroide). *Rev. Brasil. Genet.* 16, 3. 585-600.
- Dias AL (1994). Estudo do complexo sinaptonêmico de *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae) e *Astyanax scabripinnis* (pisces, Characidae): Análise da sinapse dos cromossomos supranumerários. Tese. Universidade Federal de São Carlos, SP. 97p.
- Dimitri P (1997). Constitutive heterochromatin and transposable elements in *Drosophila melanogaster*. *Genetica*, 100: 85-93.
- Diniz D, Laudicina A, Bertollo LAC (2008). Chromosomal location of 18S and 5S rDNA sites in *Triporthus* fish species (Characiformes, Characidae). *Genetics and Molecular Biology*, 32, 1, 37-41.
- Diniz D, Moreira-Filho O, Bertollo LAC (2008). Molecular cytogenetics and characterization of a ZZ/ZW sex chromosome system in *Triporthus nematurus* (Characiformes, Characidae). *Genetica*, 133: 85-91.
- Diniz D, Laudicina A, Cioffi MB, Bertollo LAC (2008). Microdissection and whole chromosome painting. Improving sex chromosome analysis in *Triporthus* (Teleostei, Characiformes). *Cytogenet Genome Research* 122: 163-168.
- Dobigny G, Ozouf-Castaz C, Bonillo C, Volobouev V (2002). "Ag-NORs" are not always true NORs: new evidence in mammals. *Cytogenet Genome Res* 98: 75-77.
- Doolittle WF, Sapienza C (1980). Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution. *Nature*, v.284, p.601-603.
- Egozcue Y. (1971). Técnicas em citogenética. *Editora Espaxs, Barcelona, 144pp.*
- Ekker M, Fritz A, Westerfield M (1992) Identification the two families of satellite-like repetitive DNA sequences from the zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Genomics* 13: 1169-1173.
- Ezaz T, Quinn AE, Miura I, Sarre SD, Georges A, Graves JAM (2005) The dragon lizard *Pogona vitticeps* has ZZ/ZW micro-sex chromosomes. *Chromosome Res* 13:763-776.
- Fagundes V, Yonenaga-Yassuda Y (1998). Evolutionary conservation of whole homeologous chromosome arms in the Akodont rodents *Bolomys* and *Akodon* (Muridae, Sigmodontinae): maintenance of interstitial telomeric segments (ITBs) in recent event of centric fusion. *Chromosome Research*, 6: 643-648.
- Falcão JN, Moreira-Filho O, Bertollo LAC (1984). An additional chromosome in two fish species. *Rev. Brasil. Genet.* VII (1): 109-118.

- Fenocchio AS, Bertollo LAC (1990). Supernumerary chromosome in a *Rhamdia hilarii* population (Pisces, Pimelodidae). *Genetica* 81: 193-198.
- Fenocchio AS, Bertollo LAC, Takahashi CS, Camacho JP (2000). Considerations on B-chromosome origin and distribution in fish populations of genus *Rhamdia* (Siluriformes, Pimelodidae). *Folia Biologica* 48, 105-109.
- Ferreira IA, Martins C (2008). Physical chromosome mapping of repetitive DNA sequences in Nilo tilapia *Oreochromis niloticus*: Evidences for a differential distribution of repetitive elements in the sex chromosomes. *Micron* 39: 411-418.
- Ferro DAM, Moreira-Filho O, Bertollo LAC (2003). B chromosome polymorphism in the fish, *Astyanax scabripinnis*. *Genetica* 119: 147-153.
- Feschotte C, Pritham EJ (2007). DNA transposons and the evolution of eukaryotic genomes. *Annu. Rev. Genet.*, v.41, p.331-368.
- Finato AO, Varella-Garcia M, Tajara EH, Taddei VA, Morielle-Versute R (2000). Intrachromosomal distribution of telomeric repeats in *Eumops glaucinus* and *Eumops perotis* (Malossidae, Chiroptera). *Chromosome Research*, 8: 563-569.
- Fischer C, Ozouf-Costaz C, Crollius HR, Dasilva C, Jaillon O, Bouneaus L, Bonillo C, Weissenbach J, Bertoni A (2000). Karyotype and chromosome location of characteristic tandem repeats in the pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. *Cytogenet. Cell. Genet.*, 88: 50-55.
- Fisher C, Bouneau L, Coutanceau JP, Weissenbach J, Volff JN, Ozouf-Costaz C (2004). Global heterochromatic colocalization of transposable elements with minisatellites in the compact genome of the pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. *Gene*, v.336, p.175-184.
- Flavell RB, Bennett MD, Smith JB, Smith DB (1974). Genome size and the proportion of repeated nucleotide sequence DNA in plants. *Biochemical Genetics* v.12, p.257-269, 1974.
- Fontana F, Tagliavini J, Congiu L, Lanfredi M, Cgicca M, Laurenti C, Rossi R (1998). Karyotypic characterization of the great sturgeon, *Huso huso*, by multiple staining techniques and fluorescent in situ hybridization. *Marine Biol.* 132: 495-501.
- Foresti F, Almeida-Toledo LF, Toledo-Filho SA (1981). Polymorphic nature of nucleolus organizer regions in fishes. *Cytogen. Cell Genet.* 31:137-144.
- Foresti F, Almeida-Toledo LF, Toledo-Filho SA (1989). Supranumerary chromosomes systems, C-banding pattern characterization and multiple nucleolus organizer regions in *Moenkhausia sactaefilomenae* (Pisces, Characidae). *Genética*, 79, 107-114.
- Foresti F, Oliveira C, Almeida-Toledo LF (1993). A method for chromosome preparations from large specimens of fish using in vitro short treatment with colchicine. *Experientia* 49: 810-813.
- Foresti, F (1998). Hipótese alternativa sobre a origem dos cromossomos supranumerários em peixes. VII Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicais. Resumos A1, Londrina-PR.
- Franck JPC, Wright JM, Mc Andrew BJ (1992). Genetic variability in a family of satellite DNAs from tilapia (Pisces: Cichlidae). *Genome* 35: 719-725.
- Franck JPC, Wright JM (1993). Conservation of a satellite DNA sequences (SATB) in the tilapiine and haplochromine genome (Pisces, Cichlidae). *Genome*, 36: 187-194.

- Franck JPC, Kornfield I, Wright JM (1994). The utility of SATA satellite DNA sequences for inferring phylogenetic relationships among the three major genera of tilapiine cichlid fishes. *Mol. Phylogenet Evol* 3: 10-16.
- Fujiwara A, Abe S, Yamaha E, Yamazaki F, Yoshida MC (1998). Chromosomal localization and heterochromatin association of ribosomal RNA gene loci and silverstained nucleolar organizer regions in salmonid fishes. *Chromosome Res.* 6:463-471.
- Galetti-Júnior PM, Foresti F (1986). Evolution of the ZZ/ZW system in *Leporinus* (Pisces, Anostomidae). *Cytogenet. Cell Genet.*, v.43, p.43-46.
- Galetti-Júnior PM, Foresti F. (1987). Two new cases of ZZ/ZW heterogamety in *Leporinus* (Anostomidae, Characiformes) and their relationship in the phylogeny of the group. *Bras. J. Genet.* 10: 135-140.
- Galetti-Júnior PM, Rasch EM (1993). Chromosome studies in *Poecilia latipunctata* with NORs polymorphism as shown by silver nitrate and chromomycin A<sub>3</sub> (Teleostei: Poeciliidae). *Ichthyol. Explor. Freshwaters* 4: 269-277.
- Galetti-Júnior PM, Martins C (2004). Contribuição da hibridação *in situ* para o conhecimento dos cromossomos dos peixes. In: *FISH: Conceitos e Aplicações na Citogenética*. Ed. M.Guerra. Editora da SBG. p.61-88.
- Garagna S, Ronchetti E, Mascheretti S, Crovella S, Formenti D, Rumpher YS, Romanini MGM (1997). Non-telomeric chromosome localization of (TTAGGG)<sub>n</sub> repeats in the genus *Eulemur*. *Chromosome Res.*, v.5, p. 487-491.
- Garagna S, Marziliano N, Zuccotti M, Searle JB, Canpanna E (2001). Pericentromeric organization at the fusion point of mouse Robertsonian translocation chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 171-175.
- Garrido-Ramos MA, Jamilena M, Lozano R, Rejón CR, Rejón MR (1994). Cloning and characterization of a fish centromeric satellite DNA. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 71: 345-351.
- Garrido-Ramos MA, Jamilena M, Lozano R, Rejón CR, Rejón MR (1995). The *EcoRI* centromeric satellite DNA of Sparidae family (Pisces, Perciformes) contains a sequence motive common to other vertebrate centromeric satellite DNAs. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 71: 345-351.
- Garrido-Ramos MA, De La Herran R, Jamilena M, Lozano R, Rejón CR, Rejón MR (1999). Evolution of centromeric satellite DNA and its use in phylogenetic studies of the Sparidae family (Pisces, Perciformes). *Mol. Phylogenet. Evol.*, 12: 200-2004.
- Gery J (1977). *Characoids of the world*. Neptune City, New Jersey. TFH Publications, 672p.
- Go Y, Rakotoarisoa G, Kawamoto Y, Randrianjafy A, Koyama N (2000). PRINS analysis of the telomeric sequence in seven lemurs. *Chromosome Research*, 8: 57-65.
- Gornung E, Gabrielli I, Cataudella S, Sola L (1997). CMA<sub>3</sub>-banding pattern and fluorescence *in situ* hybridization with 18S rDNA genes in zebrafish chromosomes. *Chrom. Res.* 5: 40-46.
- Green DM (1990). Muller's ratchet and the evolution of supernumerary chromosomes. *Genome*, v. 33, p.818-824.

- Griffiths AJF, Gelbart WM, Miller JH, Lewontin RC (2001). *Genética Moderna*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.
- Gromicho M, Ozouf-Costaz C, Collares-Pereira MJ (2005). Lack of correspondence between CMA<sub>3</sub>, Ag-positive signals and 28S rDNA loci in two Iberian minnows (Teleostei, Cyprinidae) evidenced by sequential banding. *Cytogenet Genome Res* 109:507–511.
- Gromicho M, Coutanceau JP, Ozouf-Costaz C, Collares-Pereira MJ (2006). Contrast between extensive variation of 28S rDNA and stability of 5S rDNA and telomeric repeats in the diploid-polyploid *Squalius alburnoides* complex and in its maternal ancestor *Squalius pyrenaicus* (Teleostei, Cyprinidae) *Chromosome Research* 14:297–306.
- Gross MC, Schneider CH, Valente GT, Martins C, Feldberg E (2010). Variability of 18S rDNA locus among *Symphysodon* fishes: chromosomal rearrangements. *Journal of Fish Biology*, 76: 1117-1127.
- Guerra M (1988). *Introdução a Citogenética Geral*. Editora Guanabara, Rio de Janeiro.
- Gutknecht J, Sperlich D, Bachmann L (1995). A species specific satellite DNA family of *Drosophila subsilvestris* appearing predominantly in B chromosomes. *Chromosoma*, 103: 539-544.
- Haaf T, Schmid M, Steinlein C, Galetti Jr PM, Willard HF (1993). Organization and molecular cytogenetics of satellite DNA family from *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae). *Chromosome Research*, 1: 77-86.
- Hatanaka T, Galetti J. PM (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, Almeida-Toledo, LF (2008). Use of chromosome microdissection in fish molecular cytogenetics. *Genet. Mol. Biol.*, vol.31, no.1, p.279-283.
- Hochberg VBM, Erdtmann B (1988). Cytogenetical and morphological considerations on *Rhamdia quelen* (Pisces, Pimelodidae): the occurrence of B chromosomes and polymorphic NOR regions. *Rev. Bras. Gent.* 11: 563-576.
- Houben A, Leach CR, Verlin D, Rofe R, Timmis JN (1997). A repetitive DNA sequence common to the different B chromosomes of the genus *Brachycome*. *Chromosoma*, 106: 513-519.
- Houben A, Field BL, Saunders VA (2001). Microdissection and chromosome painting of plant B chromosomes. *Methods in Cell Science* 23: 115-124.
- Howel WM, Black DA (1980). Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36: 1014-1015.
- Hsu TC, Spirito SE, Pardue ML (1975). Distribution of 18S + 28S ribosomal genes in mammalian genomes. *Chromosoma* 53: 25-33.
- Huang C, Huang F, Wang Y, Hsiao P, Lo T (1993). Molecular cloning and relationship of highly repetitive *HindIII* sequences in three cyprinid species: silver carp, bighead

- carp and grass carp. Proceedings of the National Science Council. Part B: Life Sciences, 17: 85-90.
- Jamilena M, Garrido-Ramos M, Ruiz-Rejón M, Ruiz-Rejón C, Parker JS (1995). Characterization of repeated sequences from microdissected B chromosomes of *Crepis capillaris*. *Chromosoma*, 104: 113-120.
- Jesus CM, Galetti-Júnior PM, Valentini SR, Moreira-Filho O (2003). Molecular characterization and chromosomal localization of two families of satellite DNA in *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae), a species with B chromosomes. *Genetica* 118: 25-32.
- Jones RN (1975). B-chromosome systems in flowering plants and animal species. *Intern. Rev. Cytol.* 40, 1-100.
- Jones RN, Rees H (1982). B chromosomes. New York. Academic Press, 266p.
- Kao TT (1990). Microdissection and microcloning of human chromosome 21. *Proceedings of Clinical and Biological Research* 360: 89-104.
- Kassahara S (2009). Introdução à pesquisa em citogenética de vertebrados. 1ª Ed. Ribeirão Preto, SP: Sociedade Brasileira de Genética.
- Khazanehdari KA, Jones GH (1996). Meiotic synapsis of the *Allium porrum* B chromosome: evidence for a derived isochromosome origin. *Genome* 39: 1199-1204.
- Kidwell MG (2002). Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. *Genetica*, v.115, p.49-63.
- Koehler MR, Haaf T, Guttenbach M, Scharti M, Schmid M (1997). Cytogenetics of the genus *Leporinus* (Pisces, Anostomidae) II. Molecular cytogenetics, organization and evolutionary conservation of a chromosome-specific satellite DNA from *Leporinus obtusidens*. *Genetica*, 5: 325-331.
- Leach CR, Houben A, Timmis JN (2004). The B chromosomes in *Brachycome*. *Cytogenet Genome Res.*, 106: 199-209.
- Lee C, Sasi R, Lin CC (1993). Interstitial localization of telomeric DNA sequences in the Indian muntjac chromosomes: further evidence for tandem chromosome fusions in the karyotypic evolution of the Asian muntjacs. *Cytogenetics Cell Genetics*, 63: 156-159.
- Levan A, Fredga K, Sandberg AA (1964). Nomenclature for centromeric position of chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220.
- Lewin B (2004). Retrovirus and retroposons. In: *Genes VIII*. Carlson G. Ed: Pearson Prentice Hall. NJ. p.493-509.
- Li YC, Kord AB, Fahima T, Berles A, Nero E (2002). Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutation mechanisms: a review. *Molecular Ecology*, v.11, p.2453-2465.
- Lim JK, Simmons MJ (1994). Gross chromosome rearrangements mediated by transposable elements in *Drosophila melanogaster*. *Bioessays*, 16: 269-275.
- Lima FCT, Malabarba LR, Buckup PA, Silva JFP, Vari RP, Harold A, Benine R, Oyakawa OT, Pavanelli CS, Menezes NA, Lucena CAS, Malabarba MCSL, Lucena Z MS, Reis RE, Langeani F, Cassati L, Bertaco VA, Moreira C, Lucinda PHF (2003). Genera *Incertae Sedis* in Characidae. In: Reis RE, Kullander SO, Ferraris Jr.

- C.J. (Org.) Checklist of freshwater fishes of South and Central America. Porto Alegre: EDIPUCRS, p.106-109, 2003.
- Liu Z, Li P, Kocabas A, Karsi A, 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. *Biochem. Biophys. Res. Commun* v.289, p.317-324.
- Lohe AR, Hilliker AJ, Roberts PA (1993). Mapping simple repeat DNA sequences in heterochromatin of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 134: 1149-1174.
- Lohe AR, Hilliker AJ (1995). Return of the H-word (heterochromatin). *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 5: 746-755.
- Long H, Qi ZX, Sun XM (2008). Characters of DNA constitution in the rye B chromosome. *J Integr Plant Biol.*, 50: 183-189.
- Long EO, David ID (1980). Repeated genes in eukaryotes. *Ann. Rev. Biochem.* 49: 727-764.
- López-Léon MD, Neves N, Schwarzacher JS, Heslop-Harrison JS (Pat.), Hewitt, GM e Camacho, JPM (1994). Possible origin of a B chromosome deduced from its DNA composition using double fish technique. *Chromosome Research* v.2, p. 87-92.
- Maistro EL, Mata EP, Oliveira C, Foresti F (1998). Unusual occurrence of a ZZ/ZW sex chromosome system and supernumerary chromosomes in *Characidium cf. fasciatum* (Pisces, Characiformes, Characidiinae). *Genetica* 104: 1-7
- Maistro EL, Oliveira C, Foresti F (2000). Cytogenetic analysis of A and B-chromosomes of *Prochilodus lineatus* (Teleostei, Prochilodontidae) using different restrictions enzyme banding na staining methods. *Genetica* v. 108, p. 119-125.
- Maistro, EL, Oliveira C, Foresti F (2001). Citogenetic characterization of a supranumerary chromosome segment and of B-chromossomes in *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae). *Genetica*, New York, 110: 177-183.
- Maistro EL, Oliveira C, Foresti F (2002). Cytogenetic analysis of A and B chromosomes of *Rhamdia hilarii* (Teleostei, Pimelodidae): c-banding, silver nitrate and CMA<sub>3</sub> staining and restriction endonucleases banding. *Cytologia* 67, 25-31.
- Mantovani M, Abel LDS, Mestriner CA, Moreira-Filho O (2000). Accentuated polymorphism of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): tools for understanding karyotypic evolution. *Genética*, Dordrecht, v 109, n. 3, p. 161-168.
- Mantovani M, Abel LDS, Mestriner CA, Moreira-Filho O (2005). Conserved 5S and variable 45S rDNA chromosomal localization revealed by FISH in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Genetica* 123: 211-216.
- Marchal JA, Acosta MJ, Nietzel H, Sperling K, Bullejos M, Diaz de la Guardia R, Sánchez A (2004). X chromosome painting in *Microtus*: Origin and evolution of the giant sex chromosomes. *Chrom. Res.*, 12 (8): 767-776.
- Margarido VP, Galetti-Jr. PM (2000). Amplification of a GC-rich heterochromatin in the freshwater fish *Leporinus desmotes* (Characiformes, Anostomidae). *Genetics and Molecular Biology, Ribeirão Preto* v. 23, n. 3, p.560-573.

- Martins C (2006). Chromosomes and Repetitive DNAs: A contribution to the Knowledge of the fish genome. Fish Cytogenetics. Science Publishers, Enfield, NH, USA, pp. 421-453.
- Martins C, Galetti Jr. PM (1998). Karyotype similarity between two sympatric *Schizodon* fish species (Anostomidae, Characiformes) from the Paraguay River basin. Genet. Mol. Biol. 21: 355-360.
- Martins C, Galetti Jr. PM (1999). Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). Chromosome Research 7: 363-367.
- Martins C, Galetti Jr. PM (2000). Conservative distribution of 5S rDNA loci in *Schizodon* (Pisces, Anostomidae) chromosomes. Chromosome Res 8: (4) 353-355.
- Martins C, Galetti Jr. PM (2004). Contribuição da hibridização *in situ* para o conhecimento dos cromossomos de peixes. In: FISH- conceitos e aplicações na citogenética. Ed. Guerra M. Sociedade Brasileira de Genética. p.61-88.
- Martins C, Wasko AP (2004). Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish genome. In: Focus on Genome Research, C. R. Willians (ed.). Nova Science Publishers, Hauppauge, NY., pp. 289-318.
- Martins C (2007). Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome: In: Fish Cytogenetics. Eds: Pisano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F, Kapoor BG. Science Publisher, Inc., USA.
- Martínez JC, Morán P, García-Vázquez E, Pendás AM (1996). Chromosomal localization of the major and 5S rDNA genes in the European eel (*Anguilla anguilla*). Cytogenet. Cell Genet. 73: 149-152.
- Matsuda M, Kusama T, Oshiro T, Kurihara Y, Hamaguchi S, Sakaizumi M (1997). Isolation of a sex chromosome-specific DNA sequence in the medaka, *Oryzias latipes*. Genes Genet. Syst., 72: 263-268.
- Mayr B, Kalat M, Rab P (1986). Localization of NORs and counter-stain-enhanced fluorescence studies in *Salmo gairdneri* and *Salmo trutta*. Theor. Appl. Genet. 71: 703-707.
- Mazzuchelli J, Martins C (2009). Genomic organization of repetitive DNAs in the cichlid fish *Astronotus ocellatus*. Genetica, 136: 461-469.
- McCallister B, Werren JH (1997). Hybrid origin of a B-chromosome (PSR) in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. Chromosoma 106: 243-253.
- McQuade L, Hill R, Francis D (1994). B chromosome systems in the greater glider, *Petauroides volans* (Marsupialia, Pseudocheiridae). 2. Investigation of B chromosome DNA sequences isolated by micromanipulation and PCR. Cytogenet Cell Genet. 66: 155-161.
- Meltzer, PS, Guan, XY, Burgess, A, Trent, J (1992). Rapid generation of region specific probes by chromosome microdissection and their application. Nat. Genet. 1: 24-8.
- Mestriner CA, Bertollo LAC, Galetti-Júnior PM. (1995). Chromosome banding and synaptonemal complexes in *Leporinus lacustris* (Pisces, Anostomidae): analysis of a sex system. Chromosome Research v.3, p.440-443.



- Mestriner CA, Galetti Jr. PM, Valentini SR, Ruiz IRG, Abel LDS, Moreira-Filho O, Camacho JPM (2000). Structural and functional evidence that a B chromosome in the characidae fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome. *Heredity* v. 85, p. 1-9.
- Metcalfe CJ, Eldridge MD, Johnston PG (2007). Mapping the distribution of the telomeric sequence (T2AG3)<sub>n</sub> in the Macropoidea (Marsupialia) by fluorescence *in situ* hybridization. II. The ancestral 2n=22 macropodid karyotype. *Cytogenetics Genome Research*, 116: 212-217.
- Meyne J, Ratliff RL, Moyziz RK (1989). Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)<sub>n</sub> among vertebrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 86, p. 7049-7053.
- Meyne J, Baker RJ, Hobart HH, Hsu TC, Ryder OA, Ward OG, Wiley JE, Wurster-Hill DH, Yates TL, Moyziz RK (1990). Distribution of non telomeric sites of (TTAGGG)<sub>n</sub> telomeric sequence in vertebrate chromosomes. *Chromosoma*, v. 99, p. 3-10.
- Miklos GLG (1985). Localized highly repetitive DNA sequences in vertebrate and invertebrate genomes. *Mol. Evol. Genet.*, p.241-321, 1985.
- Mitchell-McGrath, Helgeson JP (1998). Differential behavior of *Solanum brevidens* ribosomal DNA loci in a somatic hybrid and its progeny with potato. *Genome*, 41: 435-439.
- Mizoguchi, SMHN, Martins-Santos, IC (1997). Macro-and microchromosomes B in females of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Heredity*, v. 127, p. 249-253.
- Morán P, Martínez JL, García-Vázquez E, Pendas AM (1996). Sex chromosome linkage of 5S rDNA in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Cytogenet. Cell Genet.* 75: 145-150.
- Moreira-Filho O, Fenocchio AS, Pastori MC, Bertollo LAC (2001) Occurrence of a metacentric macrochromosome B in different species of the Genus *Astyanax* (Pisces, Characidae, Tetraodonidae). *Cytologia* v. 66, p. 59-64.
- Morelli S (1998). Citogenética evolutiva em espécies do gênero *Hoplias*, grupo lacerdae. Macroestrutura cariotípica, heterocromatina e regiões organizadoras de nucléolo. Tese de Doutorado. Universidade de São Carlos-SP.
- Miyazawa CS (1997). Citogenética dos characídeos da Bacia do Rio Paraguai. Análises citotaxonômicas evolutivas e considerações bio-geográficas. Tesis, universidade Federal de São Carlos (SP). 175p.
- Molina WF, Galetti PM (2002). Robertsonian rearrangements in the reef fish Chromis (Perciformes, Pomacentridae) involving chromosomes bearing 5S rRNA genes. *Genetics and Molecular Biology*, v. 25, n.4, p. 373-377.
- Moyziz RK, Buckingham JM, Cram LS, Dani M, Deaven LL (1988) A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)<sub>n</sub>, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 6622-6626.
- Mühlmann-Diaz MC, Christian AT, Bedford JS (1995). Chromosome microdissection. Tenth International Congress of Radiation Research. Würzburg, Germany.

- Mühlmann-Diaz MC, Ulsh BA, Whicker FW, Hinton TG, Congdon JD, Robinson JF, Bedford. (2001). Conservation of chromosome 1 in turtles over 66 million years. *Cytogenet Cell Genet* 92(1-2):139-43.
- Nakayama I, Foresti F, Tewari R, Scharti M, Chourrout D (1994). Sex chromosome polymorphism and heterogametic males revealed by two cloned DNA probes in the ZW/ZZ fish *Leporinus elongatus*. *Chromosoma*, 103: 31-39.
- Nanda I, Schrama D, Feichtinger W, Haaf T, Schartl M, Schmid M (2002). Distribution of telomeric (TTAGGG)<sub>n</sub> sequences in avian chromosomes. *Chromosoma*, 111: 215-227.
- Nanda I, Fugate M, Steinlein C, Schmid M (2008). Distribution of (TTAGGG)<sub>n</sub> telomeric sequences in karyotypes of the *Xenopus* species complex. *Cytogenetics Genome Res.*, 122: 396-400.
- Neo DM, Bertollo LAC, Moreira-Filho O. (2000). Morphological differentiations and possible origin of B chromosomes in natural Brazilian population of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Genetica* v. 108, p. 211-215.
- Netto, MRCB (2000). Caracterização cromossômica e molecular das espécies do gênero *Centropomus* (Centropomidae, Perciformes). Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP.
- Nirchio M, Oliveira C, Ferreira IA, Granado A, Ron E (2007). Extensive polymorphism and chromosomal characteristics of ribosomal DNA in the characid fish *Triphorteus venezuelensis* (Characiformes, Characidae). *Genetics and Molecular Biology*, 30: 25-30.
- Nowak R (1994). Mining treasures from “junk DNA”. *Science*, v.263, p.608-610.
- Oliveira C, Foresti F (1993). Occurrence of supernumerary microchromosome in *Steindachnerina insculpta* (Pisces, Characiformes, Characidae). *Cytobios* 76: 183-186.
- Oliveira C, Saboya SMR, Foresti F, Senhorini JA, Bernadino G. (1997). Increased B chromosome frequency and absence of drive in the fish *Prochilodus lineatus*. *Heredity* v.79, p.473-476.
- Oliveira C, Nirchio M, Granado A, Levy S (2003). Karyotypic characterization of *Prochilodus mariae*, *Semaprochilodus kneri* and *S. laticeps* (Teleostei: Prochilodontidae) from Caicara del Orinoco, Venezuela. *Neotropical Ichthyology* 1, 47-52.
- Oliveira C, Foresti F, Almeida-Toledo LF (2007). Karyotypic evolution in Neotropical fishes. In: *Fish Cytogenetics*. Pisano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F, Kapoor BG. Eds. Enfield, Science Publisher, Inc., 111-164.
- Orti G, Meyer A (1997). The radiation of Characiform fishes and the limits of resolution of mitochondrial ribosomal DNA sequences. *Systematic Biology*, V. 46, Issue 1, p. 75-100.
- Pagnozzi JM, De Jesus Silva MJ, Yonenaga-Yassuda Y (2000). Intraspecific variation in the distribution of the interstitial telomeric (TTAGGG)<sub>n</sub> sequences in *Micoureus demerarae* (Marsupialia: Didelphidae). *Chromosome Res.* 8: 585-591.

- Pagnozzi JM, Ditchfield AD, Yonenaga-Yassuda Y (2002). Mapping the distribution of the interstitial telomeric (TTAGGG)<sub>n</sub> sequences in eight species of Brazilian marsupials (Didelphidae) by FISH and the correlation with constitutive heterochromatin. Do ITS represent evidence for fusion events in American marsupials? *Cytogenetics Genome Res.* 98: 278-284.
- Pansonato Alves JC, Paiva LRS, Oliveira C, Foresti F (2010). Interspecific chromosomal divergences in the genus *Characidium* (Teleostei: Characiformes, Characidae). *Neotropical Ichthyology*, 8(1): 77-86.
- Paintner-Marques TR, Giuliano-Caetano L, Dias AL. (2002). Multiple NORs in *Bryconamericus aff. Exodon* (Osteichthyes, Characidae, Tetragonopterinae). *Hereditas* 137: 107-112.
- Parise-Maltempi PP, Martins C, Oliveira C, Foresti F (2007). Identification of a new repetitive element in the sex chromosomes of *Leporinus elongatus* (Teleostei: Characiformes: Anostomidae): new insights into the sex chromosomes of *Leporinus*. *Cytogenet. Gen. Res.*, v.116, n.3, p.218-223.
- Pauls E, Bertollo LAC (1983). Evidence for a system supernumerary chromosomes in *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881 (Pisces, Prochilodontidae). *Caryologia* 36 (4): 307-314.
- Pauls E, Bertollo LAC (1990). Distribution of a supernumerary chromosome system and aspects of karyotypic evolution in the genus *Prochilodus* (Pisces, Prochilodontidae). *Genetica* 81: 117-123.
- Pellegrino KC, Rodrigues MT, Yonenaga-Yassuda Y (1999). Chromosomal evolution in the Brazilian lizards of genus *Leposoma* (Squamata, Gymnophthalmidae) from Amazon and Atlantic rain forests: banding patterns and FISH of telomeric sequences. *Hereditas*, 131: 15-21.
- Pendás AM, Moran P, Garcia-Vasquez E (1993). Multi-chromosomal location of ribosomal RNA genes and heterochromatin association in brown trout. *Chromosome Res.* 1: 63-67.
- Pendás AM, Moran P, Garcia-Vasquez E (1993a). Ribosomal RNA genes are interspersed throughout a heterochromatic chromosome arm in Atlantic salmon. *Cytogenetics and Cell Genetics* 63: 128-130.
- Pendas AM, Moran P, Garcia-Vasquez E (1993b). Multichromosomal location of ribosomal RNA genes and heterochromatin association in brown trout. *Chromosome Research* 1: 63-67.
- Pendas AM, Moran P, Freije JP, Garcia-Vasquez E (1994). Chromosomal location and nucleotide sequence of two tandem repeats of the Atlantic salmon 5S rDNA. *Cytogenetics and Cell Genetics* 67: 31-36.
- Peres WAM, Bertollo LAC, Moreira-Filho O (2008). Physical mapping of the 18S and 5S ribosomal genes in nine Characidae species (Teleostei, Characiformes) *Genetics and Molecular Biology* 31, 1, 222-226.
- Peppers JA, Wiggins LE, Baker RJ (1997). Nature of B chromosomes in the harvest mouse *Reithrodontomys megalotis* by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Chromosome Research*, v. 5, p. 475-476.

- Pfister SC (1997). Contribuição aos estudos cariotípicos da família Characidae da bacia do rio São Francisco, Três Marias, MG. *Dissertação de mestrado*. Departamento de Genética e Evolução. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos 111p.
- Phillips RB, Hartley SE (1988). Fluorescent banding patterns of the chromosomes of the genus *Salmo*. *Genome* 30: 193-197.
- Phillips RB, Reed KM (1996). Application of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) techniques to fish genetics: a review. *Aquaculture*, 140: 197-216.
- Phillips RB, Honkol NR, Reed KM, Stein D (2001). Chromosome painting supports lack of homology among sex chromosome in *Oncorhynchus*, *Salmo* and *Salvelinus* (Salmonidae). *Genetica* 111: 119-123.
- Pieczarka JC, Nagamachi CY, O'briem PCM, Yang F, Rens W, Barros RMS, Noronha RCR, Rissino JD, Oliveira EHC, Fergusonsmith MA (2005). Reciprocal chromosome painting between two South American bats: *Carollia brevicauda* and *Phyllostomus hastatus* (Phyllostomidae, Chiroptera). *Chromosome Research* 13: 339-347.
- Pimpinelli S, Berloco M, Fanti L, Dimitri P, Bonaccorsi S, Marchetti E, Caizzi R, Caggese C, Catti M (1995). Transposable elements are stable components of *Drosophila melanogaster* heterochromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 3804-3808.
- Pinkel D, Straume T, Gray JW (1986). Cytogenetic analysis using quantitative high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 83, p.2934-2938.
- Plohl M, Luchetti A, Mestrovic N, Mantovani B (2008). Satellite DNAs between selfishness and functionality: structure, genomics and evolution of *tandem* repeats in centromeric (hetero) chromatin. *Gene* 409: 72-82.
- Portela-Castro ALB, Júlio Jr. HF, Nishiyama PB (2001). New occurrence of microchromosomes B in *Moenkhausia sanctaflomenae* (Pisces, Characidae) from the Paraná River of Brazil: analysis of the synaptonemal complex. *Genética*, 110:277-283.
- Portela ALBS, Galetti Jr. PM, Bertollo LAC (1988). Considerations on the chromosome evolution of Tetragonopterinae (Pisces, Characidae). *Rev. Brasil. Genet.* 11 (2): 307-316.
- Portela-Castro ALBS (1999). Citogenética de peixes da Subfamília Tetragonopterinae (Pisces, Characidae): Aspectos Citotaxonomico e Evolutivos. *Tesis* Universidade Estadual de Maringá-PR.
- Portela-Castro ALB & Júlio-Jr. HF (2002). Karyotype relations among species of subfamily Tetragonopterinae (Pisces, Characidae): Cytotaxonomy and Evolution Aspects. *Cytologia* 67: 329-336.
- Porto Foresti F, Oliveira C, Maistro EL, Foresti F (1997). Estimated frequency of B-chromosomes and populational diversity of *Astyanax scabripinnis paranae* in a small stream. *Brasil. J. Genet.* 20: 377-380.
- Post A (1965). Vergleichende Untersuchungen der Chromosomenzahlen bei Susswasser Teleosteen. *Z. Zool. Syst. Evol. Forsch.* 3: 47-93.
- Randolf LF (1928). Types of supernumerary chromosomes in maize. *Anat. Rec.* 41:102.

- Reed KM, Dorschner MO, Philips RB (1997). Characteristics of two salomonid repetitive DNA families in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Cytogenet. Cell. Genet., 79: 184-187.
- Reis RE, Kullander SO, Ferraris-Jr. CJ (2003). Check list of the freshwater fishes of south and Central America. Porto Alegre: EDIPUCRS.
- Robles F, Herrán R, Ludwig A, Rejón CR, Rejón MR, Garrido-Ramos MA (2004). Evolution of ancient satellite DNAs in sturgeon genomes. Gene, 133-142.
- Rocchi A (1992). On the heterogeneity of heterochromatin. Caryologia 35(2) 169-189.
- Rocco L, Costagliola D, Stingo V (2001). (TTAGGG)<sub>n</sub> telomeric sequence in selachian chromosomes. Heredity, v.87, p. 583-588.
- Roncon-Stange EA, Almeida-Toledo LF (1993). Supernumerary B chromosomes restricted to males in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). Rev. Brasil. Genet. 16 (3): 601-615.
- Rubtsov NB, Karamysheva TV, Andreenkova OV (2004). Comparative analysis of micro and macro B chromosomes in the Korean Field mouse *Apodemus peninsulae* (Rodentia, Murinae) performed by chromosome microdissection and FISH. Cytogenet Genome Res., 106: 289-294.
- Ruiz-Herrera A, Nergadze SG, Santagostinho M, Giulotto E (2008). Telomeric repeats far from the ends: mechanisms of origin and role in evolution. Cytogenet Genome Res., 122: 219-228.
- Sajdak SL, Reed KM, Phillips RB (1998). Intraindividual and interspecies variation in the 5S rDNA of coregonid fish. J Mol Evol 46: 680-688.
- Salvador LB, Moreira-Filho O (1992). B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). Heredity 69: 50-56.
- Salvadori S, Deina AM, Coloccia E, Rossi E, Zufardi O (1995). Localization of (TTAGGG) telomeric sequences and ribosomal genes in Atlantic cels. Chromosome Research Oxford v.3, p.54-58.
- Sambrook J, Russel DW (2001). Molecular cloning. A laboratory manual. 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Santani A, Raudsepp T, Chowdhary BP (2002). Interstitial telomeric sites and NORs in Hartmann's zebra (*Equus zebra hartmannae*) chromosomes. Chromosome Res. 10: 527-234.
- Santos, AF (1999). Estudos citogenéticos em peixes dos gêneros *Bryconops* e *Moenkhausia* (Teleostei, Characidae, Tetragonopterinae). MSc Dissertation. Universidade Federal de São Carlos/Fundação Universidade do Amazonas.
- Sharbel TF, Green DM, Houben A (1998). B-chromosome origin in the endemic New Zealand frog *Leiopelma hochstetteri* through sex chromosome devolution. Genome, 41: 14-22.
- Scheel, JJ (1973). Fish chromosome and their evolution. Interval Report os Danmarks Akvarium. 22p.
- Schmid, M (1980). Chromosome banding in Amphibia. IV. Differentiation of GC-and AT-rich chromosome regions in Anura. Chromosoma 77: 83-113.

- Schmid M, Guttenbach M. (1988). Evolutionary diversity of reverse (R) fluorescent chromosome bands in vertebrates. *Chromosoma* 97: 101-114.
- Schmid M, Feichtinger W, Nanda I, Schakowski R, Visbal Garcia R (1994). Na extraordinarily low diploid chromosome number in the reptile *Gonatodes taniae* (Squamata, Gekkonidae). *J. Hered.*, 85: 255-260.
- Schmid M, Ziegler CG, Steinlein, C, Nanda I, Scharl M (2006). Cytogenetics of the bleak (*Alburnus alburnus*), with special emphasis on the B chromosomes. *Chromosome Research* 14: 231-242.
- Schueler MG, Higgins AW, Rudd MK, Gustasha WK, Willard H (2001). Genomic and genetic definition of a functional human centromere. *Science*, v.294, p.109-115.
- Schweizer D (1976). Reverse fluorescent chromosome banding with Chromomycin and Dapi. *Chromosoma* 92: 143-148.
- Schweizer D (1980). Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatic regions (DA-DAPI bands) in human chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 27: 190-193.
- Scherthan H (1990). Localization of the repetitive telomeric sequence (TTAGGG)<sub>n</sub> in two muntjac species and implications for their karyotypic evolution. *Cytogenetics Cell Genet.* 53: 115-117.
- Silva MJJ, Yonenaga-Yassuda Y (1998b). heterogeneity and meiotic behaviour of B and sex chromosomes, banding patterns and localization of (TTAGGG)<sub>n</sub> sequences by fluorescence *in situ* hybridization in the neotropical water rat *Nectomys* (Rodentia, Cricetidae). *Chromosome Res.*, v.6, p. 455-462.
- Silva DS, Milhomem SSR, Pieczarka JC, Nagamachi CY (2009). Cytogenetic studies in *Eigenmania virescens* (Sternopygidae, Gymnotiformes) and new inferences on the origin of sex chromosomes in the *Eigenmannia* genus. *BMC Genetics*, v. 10, p. 74-79.
- Singer MF (1982). Highly repeated sequences in mammalian genomes. *Int. Rev. Cytol* 76: 67-112.
- Southern EM (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, 98: 503-517.
- Souza IL, Moreira-Filho O, Galetti Jr. PM (1996). Heterochromatin differentiation in the characid fish *Astyanax scabripinnis*. *Revista Brasileira de Genética, Ribeirão Preto*, v. 19, n. 3, p. 405-410.
- Speicher RM, Carter N P (2005). The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. *Nature* 6: 782-792.
- Sumner AT. (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research* 75: 304-306.
- Sumner AT (1990). *Chromosome Banding*. Vol.1. Unwin Hyman Inc., Londres, UK.
- Sumner AT (2003). *Chromosomes: organization and function*. Blackwell Publishing. North Berwick, UK. 287p.
- Taguchi T, Akimaru K, Hirai Y, Mwenda JM, Taguchi KY (2003). A probe generated by chromosome microdissection, useful for analyzing Y chromosome evolution in Old World monkeys. *Chromosome Res.*, 11 (2): 147-152.

- Telenius H, Carter NP, Bebb CE, Nordenskjold M, Ponder BA, Tunnacliffe A (1992). Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics*, 13: 718-25.
- Teruel M, Cabrero J, Montiel EE, Acosta MJ, Sánchez A, Camacho JPM (2009). Microdissection and chromosome painting of X and B chromosomes in *Locusta migratoria*. *Chromosome Research*, 17: 11-18.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994). ClustalW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic. Acids Res.*, v.22, p.4673-4680.
- Thomsen PD, Hoyheim B, Christensen K (1996). Recente fusion events during evolution of pig chromosomes 3 and 6 identified by comparison with the babirusa karyotype. *Cytogenetics Cell. Genet.*, 73: 203-208.
- Trifonov VA, Perelman PL, Kawada SI, Iwasa MA, Oda SI, Graphodatsky AS (2002). Complex structure of B-chromosomes in two mammalian species: *Apodemus peninsulae* (Rodentia) and *Nyctereutes procynoides* (Carnivora). *Chromosome Res.*, 10: 109-116.
- Vari RP (1983). Phylogenetic relationship of the families Curimatidae, Prochilodontidae, *Anostomidae* and *Chilodontidae* (Pisces, Characiformes). *Smithsonian contributions to Zoology* 378: 1-58.
- Vênere PC, Galetti Jr. PM. (1985). Natural triploidy na chromosome B in the fish *Curimata modesta* (Curimatidae, Characiformes). *Rev. Brasil. Genet.* v. 4, p. 681-687.
- Vênere PC, Miyazawa CS, Galetti Jr. PM (1999). New cases of supernumerary chromosomes in characiform fishes. *Genetics and Molecular Biology*, 22: 345-349.
- Ventura K, Silva MJ, Fagundes V, Christoff AU, Yonenaga-Yassuda Y (2006). Non-telomeric sites as evidence of chromosomal rearrangement and repetitive (TTAGGG)<sub>n</sub> arrays in heterochromatic and euchromatic regions in four species of Akodon (Rodentia, Muridae). *Cytogenetics Genome Research*, 115: 169-175.
- Vermeesch JR, De Meurichy W, Van Den Berghe H, Marynen P, Petit P (1996). Differences in the distribution and nature of the interstitial telomeric (TTAGGG)<sub>n</sub> sequences in the chromosomes of the Giraffidae, okapi (*Okapia johnstoni*), and giraffe (*Giraffa camelo pardalis*): evidence for ancestral telomeres at the okapi polymorphic rob (5;26) fusion site. *Cytogenetics Cell Genetics*, 72: 310-315.
- Vicari MR, Artoni RF, Bertollo LAC (2003). Heterochromatin polymorphism associated with 18S rDNA: a differential pathway among *Hoplias malabaricus* fish populations. *Cytogenetic and Genome Research*, 101: 24-28.
- Vicari MR, Almeida MC, Bertollo LAC, Moreira-Filho O, Artoni RF (2006). Cytogenetic analysis and chromosomal characteristics of the polymorphic 18S rDNA in the fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae) *Genetics and Molecular Biology*, 29, 4, 621-625.
- Vicari MR, Moreira-Filho O, Artoni RF, Bertollo LAC (2006). ZZ/ZW sex chromosome system in an undescribed species of the genus *Apareiodon* (Characiformes, Parodontidae). *Cytogenetics and Genome Research* 114: 163-168.

- Vicente V E, Bertollo LAC, Valentini SR, Moreira-Filho O (2003). Origin and differentiation of sex chromosome system in *Parodon hilarii* (Pisces, Parodontidae). satellite DNA, G and C-banding. *Genetica* 119: 115-120.
- Viñas A, Gómez C, Martínez P, Sánchez, L (1996). Localization of rDNA genes in European eel (*Anguilla anguilla*) by FISH. *Genome* 39: 1220-1223.
- Vissoto PC, Foresti F, Oliveira C (1999). Supernumerary chromosomes in two species of the family Pimelodidae (Teleostei, Siluriformes). *Chrom. Sci.* 3: 9-13.
- Volubujev VT (1981). B-chromosomes systems of the mammals. *Caryologia* 34: 1-23.
- Wasko AP, Galetti Jr. PM (2000). Mapping 18S ribosomal genes in fish of the genus *Brycon* (Characidae) by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Genetics and Molecular Biology*, 23, 1, 135-138.
- White MJD (1973). *Animal cytology and evolution*. 3<sup>a</sup> ed. London: Cambridge University Press.
- Wiley JE, Meyne J, Little ML, Stout JC (1992). Interstitial hybridization sites of the (TTAGGG)<sub>n</sub> telomeric sequence on the chromosomes of some North American hybrid frogs. *Cytogenetics Cell Genet.*, 61: 55-57.
- Wilson EB (1907). The supernumerary chromosomes of Hemiptera. *Science*.
- Wright JM (1989). Nucleotide sequence, genomic organization and evolution of a major repetitive DNA family in tilapia (*Oreochromis mossambicus/hornorum*). *Nucleic Acids Res.* 17: 5071-5079.
- Wurster-Hill DH, Ward OG, Davis BH, Park JP, Moyziz RK (1989). Fragile sites, telomeric DNA sequences, B chromosomes and DNA content in raccoon dogs, *Nyctereutes procyonoides*, with comparative notes on foxes, coyote, wolf and raccoon. *Cytogenetics Cell Genet.* 49: 278-281.
- Yang F, O'Brien PCM, Milne BS (1999). A complete comparative chromosome map for the dog, fox, and human and its integration with canine genetic maps. *Genomics*, 62: 189-202.
- Yonenaga-Yassuda, Y (2004). Contribuição da FISH à Citogenética de Mamíferos e Répteis. Cap.4, p.89-114. FISH: Conceitos e Aplicações na Citogenética.
- Ziegler CG, Lamatsch DK, Steinlein C, Engel W, Schartl M, Schmid M (2003). The giant B chromosome of the cyprinid fish *Alburnus alburnus* harbours a retrotransposons-derived repetitive DNA sequence. *Chrom. Res.*, 11: 23-35.