

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO**

**CITOGENÉTICA CLÁSSICA E MOLECULAR DE TRÊS ESPÉCIES DE
CURIMATÍDEOS, COM ÊNFASE NO CROMOSSOMO B DE *Cyphocharax
nagelii* (CHARACIFORMES, CURIMATIDAE)**

ROSÂNGELA MARTINS DE OLIVEIRA

**SÃO CARLOS
2010**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO**

**CITOGENÉTICA CLÁSSICA E MOLECULAR DE TRÊS ESPÉCIES DE
CURIMATÍDEOS, COM ÊNFASE NO CROMOSSOMO B DE *Cyphocharax
nagelii* (CHARACIFORMES, CURIMATIDAE)**

ROSÂNGELA MARTINS DE OLIVEIRA

**Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Genética e Evolução do Centro de
Ciências Biológicas e da Saúde da
Universidade Federal de São Carlos,
como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutor em
Ciências (Ciências Biológicas), área
de concentração: Genética e
Evolução.**

**SÃO CARLOS
2010**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

O48cc

Oliveira, Rosângela Martins de.

Citogenética clássica e molecular de três espécies de curimatídeos, com ênfase no cromossomo B de *Cyphocharax nagelii* (Characiformes, Curimatidae) / Rosângela Martins de Oliveira. -- São Carlos : UFSCar, 2010.

136 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2010.

1. Citogenética. 2. DNA ribossômico. 3. Microdissecção cromossômica. 4. Telômeros. 5. Cromossomos supranumerários. 6. Cromossomo B. I. Título.

CDD: 574.87322 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO

**CITOGENÉTICA CLÁSSICA E MOLECULAR DE TRÊS
ESPÉCIES DE CURIMATÍDEOS, COM ÊNFASE NO
CROMOSSOMO B DE CYPHOCHARAX NAGELII
(CHARACIFORMES, CURIMATIDAE)**

Tese de Doutorado de Rosângela Martins de Oliveira

Banca Examinadora

Prof. Dr. Orlando Moreira Filho

Profa. Dra. Sanae Kasahara

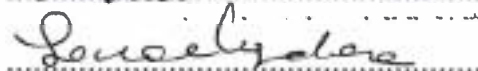
Profa. Dra. Doralice Maria Cella

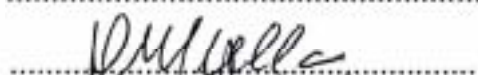
Prof. Dr. Adilson Ariza Zacaro

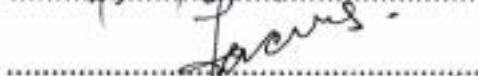
Profa. Dra. Gisele Orlandi Intoini

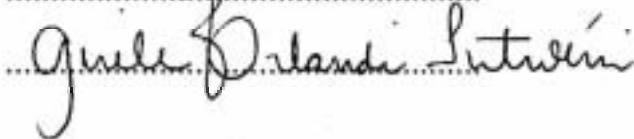
INTROINI











**Dedico esta tese aos meus pais
Geraldo M. de Oliveira (*in memoriam*)
e Valdeci M. L. Oliveira, pelo apoio
durante a execução deste trabalho, e
por me ensinarem que é possível
viver de forma honesta, íntegra,
honrada e justa.**

Em 1º de Janeiro de 1942...

Código Penal

Capítulo V

Dos Crimes Contra a Honra

Calúnia

Art. 138. Caluniar alguém, imputando-lhe falsamente fato definido como crime...

Difamação

Art. 139. Difamar alguém, imputando-lhe fato ofensivo à sua reputação...

Injúria

Art. 140. Injuriar alguém, ofendendo-lhe a dignidade ou o decoro...

Em 1º de Janeiro de 2010, ainda não aprendemos nada sobre o tema em questão.

Agradecimentos

Ao Laboratório de Citogenética de Peixes do Departamento de Genética e Evolução, ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos e ao CNPq, pela oportunidade, recursos financeiros e toda a estrutura disponibilizada para a realização deste trabalho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Orlando Moreira Filho, obrigada pela oportunidade de realizar este trabalho.

Ao professor Dr. Luis A. C. Bertollo, pelos ensinamentos citogenéticos.

Aos professores Dr. Fausto Foresti e Dr. Cláudio Oliveira, pela oportunidade de realizar grande parte dos experimentos do presente trabalho em seu laboratório.

À Prof^a. Doralice Maria Cella (Unesp-Rio Claro), pelos ensinamentos, amizade e por cuidar com tanto carinho da, que agora é nossa, tão amada Megui.

À Prof^a. Sanae Kasahara (Unesp-Rio Claro), pelos ensinamentos citogenéticos, pelas discussões filosóficas, por acreditar no meu trabalho e por sua amizade.

Ao Prof. Adilson Ariza Zacaro (Federal de Viçosa), pela transferência de seus conhecimentos, por suas sugestões de trabalho e por sua amizade.

Aos colegas de departamento que tornaram a minha vida mais alegre: André, Ana Karina, Carol (Santos), Carol (Argentina), Daniel (gaúcho), Emanuel (Manu), Fernanda, Fernando (Fefe), Flavinha, Karina, Maressa, Maurício (colombiano), Nelci, Paulo, Ritinha e Wellington.

Aos meus amigos de graduação que nunca me abandonaram e nunca deixaram de acreditar no meu sucesso: Alexandre (Alex), Douglas, Fabiana Casarin, Maurício e Milena.

À família Introíni (Maria do Carmo, Gisele, Simone e Apolinho) por me apoiarem em todas as etapas deste trabalho, pela amizade e companheirismo.

À minha amiga Débora (tilanga), que com sua paciência me apoiou nos momentos mais difíceis da realização deste trabalho. Obrigada por me receber em sua casa e ter aguentado minhas neuroses, psicoses e todas as outras

“oses” durante 6 meses!!! Você realmente é uma heroína!!! Estendo meus agradecimentos ao Pablo, que suportou sem murmurar a presença de um estranho no ninho durante tanto tempo!!! Eu sempre serei grata por tudo que vocês fizeram por mim!!

À minha amiga Celeste, pelo apoio e pela “transferência” de um pouco de sua paciência oriental!! Obrigada pelos sábios conselhos e por me ensinar que os momentos difíceis um dia passam. Agradeço pela frase: “Mais longe do fim você já esteve”, a qual me motivava todos os dias!!!

À minha amiga Thaís (“se liga cabeça”), por ouvir minhas reclamações e por participar tanto dos meus momentos de alegria quanto dos momentos de aflição. Obrigada pelo companheirismo e pela cumplicidade!!

Ao meu amigo Iderval, um ser humano competente, inteligente, solidário, bondoso, altruísta, sensato, humilde, generoso, otimista, alegre, sociável, extrovertido, honesto e fiel!! Obrigada por todos os seus ensinamentos e por me introduzir no universo da biologia molecular. Agradeço muito por você acreditar em mim e no meu trabalho e ainda, por entender que sou uma pessoa “desesperada”!!! Sem você este trabalho não teria acontecido!!!

À minha família, por tudo que fizeram, fazem e farão por mim!!! Por me ensinarem que é possível vencer as competições da vida com honestidade, justiça e honra. Pela compreensão de que vida dos seres humanos não é uma luta de vale-tudo.

À Megui e à Margô, minhas fofas, que me deixam feliz e alegre simplesmente porque existem.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. CONSIDERAÇÕES SOBRE A FAMÍLIA CURIMATIDAE	19
1.2. INFORMAÇÕES CITOGENÉTICAS DA FAMÍLIA CURIMATIDAE.....	21
1.3. CARACTERÍSTICAS DOS CROMOSSOMOS B	23
1.4. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE DNA RIBOSSÔMICO.....	29
1.5. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE SEQUÊNCIAS TELOMÉRICAS	32
1.6. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE MICRODISSECÇÃO CROMOSSÔMICA	34
2. OBJETIVOS	41
3. MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1. MATERIAIS	41
3.2. METODOLOGIA	44
3.2.1. <i>Obtenção das preparações cromossômicas mitóticas e meióticas</i>	44
3.2.2. <i>Técnica de bandamento C</i>	45
3.2.3. <i>Técnica de impregnação pela prata</i>	46
3.2.4. <i>Coloração com fluorocromos base-específicos</i>	46
3.2.5. <i>Identificação de sítios ribossômicos 18S e 5S</i>	47
3.2.5.1. <i>Método para extração de DNA de fígado usando Tiocianato de Guanidina</i> 47	
3.2.5.2. <i>Protocolo para obtenção da sonda de rDNA 5S</i>	49
3.2.5.3. <i>Protocolo para obtenção da sonda de rDNA 18S</i>	51
3.2.5.4. <i>Procedimento para precipitação das sondas de rDNA 5S ou 18S</i>	53
3.2.6. <i>Microdissecção cromossômica do cromossomo B de C. nagelii</i>	54
3.2.7. <i>Protocolo para obtenção da sonda de DNA telomérico</i>	57
3.2.8. <i>Protocolo para hibridação in situ fluorescente</i>	59
4. RESULTADOS	64
4.1. REGIÕES HETEROCROMÁTICAS POR BANDAMENTO C.....	66
4.2. REGIÃO ORGANIZADORA DE NUCLÉOLO (RON) POR IMPREGNAÇÃO PELA PRATA 67	
4.3. REGIÕES RICAS EM BASES AT OU CG POR FLUOROCROMOS BASE-ESPECÍFICOS 68	
4.4. SÍTIOS DE rDNA 5S E 18S.....	68
4.5. MICRODISSECÇÃO DO CROMOSSOMO B DE <i>CYPHOCHARAX NAGELII</i>	69
4.6. HIBRIDAÇÃO <i>IN SITU</i> COM SONDA DE DNA TELOMÉRICO EM <i>CYPHOCHARAX NAGELII</i>	70
5. DISCUSSÃO	89
5.1. A CITOGENÉTICA DE <i>CYPHOCHARAX NAGELII</i> , <i>CYPHOCHARAX MODESTUS</i> E <i>STEINDACHNERINA INSCULPTA</i>	89
5.2. CROMOSSOMOS B DE <i>CYPHOCHARAX NAGELII</i>	105
6. CONCLUSÕES	114
7. PERSPECTIVAS	116
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	118

Lista de Figuras

Introdução

Figura 1- Cladograma mais parsimonioso da hipótese de relação entre as famílias Curimatidae, Prochilodontidae, Anostomidae e Chilodontidae. Os quadrados indicam sinapomorfias. Baseado em VARI (1983).

Figura 2- Diagrama da unidade de rDNA 45S, com base na unidade de organização descrita para humanos (SUMNER, 2003) e para eucariotos (GORAB, 2001). ITS = Internal Transcribed Spacer; NTS = Non Transcribed Spacer.

Figura 3- Modelo de organização do rDNA 5S em eucarioto superior. NTS = Non Transcribed Spacer. (MARTINS and WASKO, 2004).

Figura 4- Estrutura dos telômeros, baseada na arquitetura proposta para mamíferos. A figura evidencia que o telômero forma um *t-loop* de fita dupla de DNA e um *D-loop* de fita simples de DNA. É observada a presença de proteínas interagindo com as estruturas em *loop* do DNA. Esquema retirado de GREIDER (1999). TRF2 = proteína ligada à fita dupla de DNA, uma falha na sua produção parece permitir a fusão telomérica de cromossomos.

Figura 5- Imagens do microscópio e da dinâmica da microdissecção manual. **A.** detalhe da platina e da lamínula com os cromossomos. Seta sinaliza pipeta para a coleta dos cromossomos e a cabeça de seta indica capilar para a microdissecção. Ambos são conduzidos manualmente. **B.** Campo visual de cromossomos a serem microdissectados. A seta indica a região que será retirada. **C.** Mostra a ponta do capilar e a região cromossômica já separada (disponível em UNESP-BOTUCATU <http://www.ibb.unesp.br/extensao/acidos_nucleicos/material_didatico/19_Hibridacao_in_situ_cromossomica.pdf>).

Materiais e Métodos

Figura 6- Exemplares machos de curimatídeos. **A.** *Cyphocharax nagelii*. **B.** *Cyphocharax modestus*. **C.** *Steindachnerina insculpta*. (Imagens ilustrativas sem escala).

Figura 7- Esquema que mostra a SSU (Small Subunit) do rDNA 45S. As abreviações designam primers existentes na literatura capazes de amplificar esta região. As caixas destacam os *primers* usados no presente trabalho (disponível em DUKE UNIVERSITY – www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm).

Figura 8- **A.** Gel de agarose 1% mostrando diversos testes realizados com *primers* para amplificação de DNA telomérico. A coluna da esquerda mostra em pares de base os tamanhos das bandas do *Low mass ladder*, o qual tem suas bandas observadas na coluna 0. Os produtos de PCR vistos nas colunas 1, 2, 3 e 4 seguiram o programa para amplificação da região telomérica descrito abaixo; aqueles observados nas colunas 7, 8 e 9 foram obtidos com o programa definido pelos autores IJDO et al (1991). As colunas 5 e 6, utilizadas como controle, mostram ausência de amplificação de DNA e conseqüentemente de contaminação nas demais PCR. Quanto às propriedades de cada PCR: a coluna 1 corresponde a uma PCR utilizando somente os primers Tel 1 e Tel 2; na coluna 2 é uma PCR usando o primer Tel 1 + DNA total e na coluna 3 é uma PCR usando o primer Tel 2 + DNA total (DNA total de *C. nagelii* como molde); na coluna 4 o produto é de uma PCR usando Tel 1 + Tel 2 + DNA total. Nas colunas 7, 8 e 9, as PCR foram realizadas conforme descrição das PCR das colunas 2, 3 e 4, respectivamente. **B.** Gel de agarose 1% mostrando o produto da PCR do cromossomo B microdissectado de *C. nagelii* (colunas 1 e 2). **C.** Produto de PCR visto em gel de agarose 1%. Na coluna 1, está uma banda de 400 pb correspondente ao rDNA 5S; na coluna 2, uma banda de 1800 pb de rDNA18S.

Resultados

Figura 9- Cariótipos com $2n=54$ cromossomos meta- e submetacêntricos (m/sm), em coloração seqüencial Giemsa-bandamento C. **A e B.** *Cyphocharax nagelii*. **C e D.** *Cyphocharax modestus*. **E e F.** *Steindachnerina insculpta*. Os pares em destaque são aqueles portadores de AgRON. Barra = $5\mu\text{m}$.

Figura 10- Cariótipo de *Cyphocharax nagelii* com $2n=54 + 4$ cromossomos B, meta- submetacêntricos (m/sm). **A.** Cromossomos corados com Giemsa. **B.** A mesma metáfase vista em A, submetida a bandamento C. Em destaque o par portador de AgRON. Barra = $5\mu\text{m}$.

Figura 11- Metáfases mitóticas de quatro espécimens de *Cyphocharax nagelii*, em coloração seqüencial Giemsa-bandamento C-AgRON, portadoras de cromossomos B heterocromáticos. **A e B.** Indivíduo fêmea com $2n=54+1B$. **C e D.** Especimen fêmea com $2n=54+2B$. **E e F.** Indivíduo macho com $2n=54+3B$. **G e H.** Especimen macho com $2n=54+4B$. Em destaque cromossomos do par 6 portadores de AgRON. As setas indicam os cromossomos B e as cabeças de seta apontam os cromossomos portadores de AgRON. Barra = $5\mu\text{m}$.

Figura 12- Células meióticas de macho de *Cyphocharax nagelii* portador de cromossomo B (seta estreita), coradas com Giemsa. **A, B e C.** Metáfases I com $27\text{II} + 1B$ (A e B) e com $27\text{II} + 2B$ (C). **D.** Metáfase II com 27 cromossomos, sem a presença do cromossomo B. Setas largas indicam bivalentes com quiasmas terminais. Barra = $5\mu\text{m}$.

Figura 13- Coloração seqüencial Giemsa-bandamento C em células meióticas de macho de *Cyphocharax nagelii*, portador de cromossomos B. **A e C.** Metáfases I com $27\text{II} + 2B$ (seta estreita), coradas com Giemsa. **B e D.** As mesmas metáfases vistas em A e C após bandamento C, mostrando os cromossomos B heterocromáticos. **E e G.** Metáfases II em coloração Giemsa, com 27 cromossomos. **F e H.** As mesmas metáfases vistas em E e G, após bandamento C, sem nenhuma evidência do cromossomo B. Setas largas

mostram bivalentes com quiasmas terminais, e cabeça de seta bivalente com quiasma intersticial. Barra = 5µm.

Figura 14- Metáfases I com 27 bivalentes de *Cyphocharax nagelii* macho portador de cromossomos B, sem evidência desses elementos. **A, C e E.** Coloração convencional Giemsa. **B, D e F.** As mesmas metáfases vistas em A, C e E, após bandamento C. Setas largas indicam bivalentes com quiasma intersticial, setas estreitas mostram bivalentes com quiasmas terminais e cabeças de seta indicam bandas C adicionais. Barra = 5µm.

Figura 15- Células de um exemplar fêmea de *Cyphocharax nagelii* portadora de 1 cromossomo B, coradas com Giemsa. **A.** Metáfases somática com $2n=54 + 1B$ (seta). **B e C.** Metáfases oogoniais com $2n=54 + 1B$ (seta). **D.** Elementos paquitênicos mostrando um cromossomo B (seta). Barra = 5µm.

Figura 16- Cromossomos meióticos de um exemplar fêmea de *Cyphocharax nagelii* portador de 1 cromossomo B, corados com Giemsa. **A, B, C e D.** Metáfases I com um cromossomo B (seta). **E e F.** Metáfases I e II, respectivamente, sem cromossomo B identificável. Barra = 5µm.

Figura 17- Metáfases mitóticas submetidas a coloração DAPI (**A, C e E**) e CMA₃ (**B, D e F**). **A e B.** *Cyphocharax nagelii* com $2n=54 + 1B$. **C e D.** *Cyphocharax modestus* com $2n=54$. **E e F.** *Steindachnerina insculpta* com $2n=54$. As setas indicam as regiões CMA₃ positivas e as cabeças de seta, o cromossomo B. Barra = 5µm.

Figura 18- Espermatócitos I de *Cyphocharax nagelii* macho com $2n=27II$, submetidos a coloração DAPI (**A**) e CMA₃ (**B**). Bivalentes com quiasmas estão indicados pelas setas. Barra = 5µm.

Figura 19- Cariótipos com $2n=54$ cromossomos corados com DAPI, submetidos a hibridação *in situ* fluorescente com sondas de rDNA 18S e 5S. **A.** *Cyphocharax nagelii*: o par 6 contém rDNA 18S (verde) e os pares 3 e 20 rDNA 5S (rosa). **B.** *Cyphocharax modestus*: par 2 possui rDNA 18S (verde) e os

pares 3 e 20 o rDNA 5S (verde). **C.** *Steindachnerina insculpta*: par 7 com rDNA 18S (verde) e o par 3 com rDNA5S (rosa). verde=FITC; rosa=rodamina. Barra = 5µm.

Figura 20- Metáfases mitóticas com $2n=54$ cromossomos, coradas com DAPI e submetidas a hibridação *in situ* fluorescente com sondas de rDNA 5S. **A e B.** *Cyphocharax nagelii*. **C e D.** *Cyphocharax modestus*. **E e F.** *Steindachnerina insculpta*. Setas indicam rDNA 5S, cabeças de seta mostram rDNA 18S e setas largas indicam os cromossomos B. Barra = 5µm.

Figura 21- Pares cromossômicos mostrando as regiões de rDNA 45S, as quais são coincidentes com heterocromatina. **A.** *Cyphocharax nagelii*. **B.** *Cyphocharax modestus*. **C.** *Steindachnerina insculpta*.

Figura 22- Metáfases mitóticas de quatro indivíduos de *Cyphocharax nagelii*, submetidas à pintura cromossômica. **A, B, C e D.** Células coradas com DAPI, mostrando $2n=54+1B$, $2n=54+2B$, $2n=54+3B$ e $2n=54+4B$, respectivamente. **E, F, G e H.** As mesmas células vistas em A, B, C e D mostrando o sinal da hibridação *in situ* fluorescente com a sonda do cromossomo B microdissectado de metáfases do indivíduo mostrado em A. **A.** Fêmea. **B, C e D.** Machos. Note que os cromossomos B são igualmente hibridados. As setas indicam os cromossomos B. Barra = 5µm.

Figura 23- Cromossomos mitóticos corados com DAPI e submetidos a hibridação *in situ* com sonda do cromossomo B. **A e C.** Metáfases mitóticas de *Cyphocharax nagelii*, mostrando os cromossomos B hibridados com a sonda obtida por microdissecção desse mesmo elemento (setas). **B e D.** Metáfases mitóticas de *Cyphocharax modestus* e *Steindachnerina insculpta*, respectivamente, sem sinal de marcação pela sonda do cromossomo B. sinal verde=FITC, sinal rosa=rodamina. Barra = 5µm.

Figura 24- Metáfases mitóticas de *Cyphocharax nagelii*. **A, C e E.** Coradas com DAPI. **B, D e F.** As mesmas células vistas em A, C e E mostrando as marcações da hibridação *in situ* fluorescente com sequências teloméricas

(TTAGGG)_n. As setas indicam os cromossomos B e cabeças de seta sinalizam autossomos com sequências teloméricas intersticiais. Barra = 5µm.

Figura 25- Adaptação do cladograma proposto para os gêneros da família Curimatidae, com base em sinapomorfias morfológicas (VARI, 1989).

Lista de tabelas

Introdução

Tabela 1- Estudos citogenéticos realizados na família Curimatidae. 2n=número diplóide; MC=Morfologia Cromossômica; Crom. B=Cromossomos B; a=acrocêntrico; m=metacêntrico; sm=submetacêntrico; st=subtelocêntrico; +=apresenta registro.

Resultados

Tabela 2- Freqüência intraindividual de células portadoras de cromossomos B em espécimens de *Cyphocharax nagelii*. f=fêmea; m=macho.

Tabela 3- Freqüências de cromossomos B na população de *Cyphocharax nagelii* em quatro períodos de tempo, em três anos. f=fêmea; m=macho.

Resumo

Cyphocharax nagelii, *Cyphocharax modestus* e *Steindachnerina insculpta*, foram as espécies de curimatídeos analisadas no presente trabalho. Nas três espécies investigadas, os objetivos foram identificar sequências que pudessem ser usadas como marcadores cromossômicos, inferir sobre os mecanismos atuantes na evolução cromossômica destas espécies e paralelamente na família Curimatidae e ainda, determinar indiretamente a composição nucleotídica de regiões cromossômicas. Além disso, também foi objetivo do presente trabalho a análise do cromossomo B de *C. nagelii*, procurando investigar o comportamento mitótico e meiótico deste elemento e fazer inferências sobre sua origem e evolução. O número diplóide encontrado foi $2n=54$ com cromossomos meta- ou submetacêntricos, corroborando a macroestrutura cariotípica da família Curimatidae. Foi detectada a presença de cromossomos B em *C. nagelii*, e as análises indicaram que este elemento seria mitoticamente estável. A presença de cromossomos B em outras espécies de curimatídeos sugere que este elemento represente um mecanismo de diferenciação cariotípica adicional. Nas análises de células metafásicas I de *C. nagelii*, o cromossomo B comportou-se como um univalente, indicando uma possível instabilidade segregacional desse elemento. A técnica de bandamento C, evidenciou blocos de heterocromatina na região pericentromérica de todos os cromossomos do complemento, e alguns blocos teloméricos, nas três espécies estudadas; os cromossomos B de *C. nagelii* são heterocromáticos. Nas três espécies de curimatídeos não foram encontrados heteromorfismos cromossômicos, quanto ao tamanho, morfologia ou padrão de bandamento C, que pudessem estar associados à presença de cromossomos sexuais. A microdissecção cromossômica do B e a conseqüente hibridação *in situ* com a sonda produzida, mostraram que estes elementos compartilham muitas seqüências entre si, mas, o mesmo não ocorre com os cromossomos do complemento A de *C. nagelii* ou de *C. modestus* e *S. insculpta*. O uso dos fluorocromos base-específicos CMA₃/DAPI, impregnação por nitrato de prata e sondas de rDNA 18S, permitiram a identificação dos sítios de rDNA 45S. Estes sítios estão presentes em um par de autossomos nas três espécies estudadas, assim como na maioria dos curimatídeos. Em *C. nagelii* e em *C. modestus* a

região de rDNA 5S, está presente nos pares cromossômicos 3 e 20; em *S. insculpta* apenas o par 3 continha o gene de rRNA 5S. A presença de rDNA 5S no par 3 das três espécies descritas, aponta para uma possível localização conservada desse gene. Foi constatada uma diferença de tamanho entre os sítios de rDNA 5S, devido provavelmente a presença de dois *clusters* quantitativamente diferentes desta seqüência ribossômica. Os cromossomos B de *C. nagelii* não comportam seqüências de rDNA 5S ou 18S e não foram marcados diferencialmente pelo DAPI ou CMA₃. A hipótese de que a evolução cariotípica nos curimatídeos envolveria, rearranjos do tipo fissão/fusão cêntrica e inversão pericêntrica, foi sugerida. Seqüências de DNA telomérico (TTAGGG)_n foram utilizadas em *C. nagelii*. Os cromossomos do complemento A, bem como os cromossomos B mostraram sinais na região telomérica. Além disso, pelo menos dois pares autossômicos mostraram seqüências teloméricas na posição intersticial, corroborando a hipótese de evolução por fissão/fusão cêntrica e inversão pericêntrica para família Curimatidae.

Abstract

Cyphocharax nagelii, *Cyphocharax modestus*, and *Steindachnerina insculpta* were the curimatid species analyzed in the present work. The objectives for all species were to identify sequences that could be used as chromosomal markers, to infer on the active mechanisms in their chromosomal evolution and of the family Curimatidae, and to determine indirectly the nucleotide composition of chromosomal regions. Additionally, the present work also aimed to analyze the B chromosome of *C. nagelii*, investigating the mitotic and meiotic behavior of this element and making inferences on its origins and evolution. The encountered diploid number was of $2n=54$ with meta- and submetacentric chromosomes, corroborating the karyotypic macrostructure of the family Curimatidae. B chromosomes were detected in *C. nagelii* and analyses indicated that this element is potentially stable during mitosis. The presence of B chromosomes in other curimatid species suggests that this element represents an additional karyotypic differentiation mechanism. In the analyses of metaphase I cells of *C. nagelii*, the B chromosome behaved as a univalent, indicating possible segregation instability of this element. The C-banding technique evidenced heterochromatin blocks in the pericentromeric region of all chromosomes of the complement, as well as a few telomeric blocks, in the three studied species (B chromosomes in *C. nagelii* are heterochromatic). No chromosomal heteromorphisms regarding size, morphology, or C-banding pattern that could be associated with the presence of sex chromosomes were found in any of the three curimatid species. Microdissection of the B chromosome and consequent *in situ* hybridization with the produced probe showed that these elements share many mutual sequences, but the same does not occur with chromosomes of complement A of *C. nagelii*, *C. modestus*, or *S. insculpta*. The use of the base-specific CMA₃/DAPI fluorochromes, silver nitrate staining, and 18S rDNA probes allowed the identification of 45S rDNA sites. These sites are present in an autosome pair in the three studied species, as well as in most curimatids. In *C. nagelii* and *C. modestus*, the 5S rDNA region is present in chromosome pairs 3 and 20; in *S. insculpta* only pair 3 contained the 5S rDNA gene. The presence of 5S rDNA in the third pair of the three described species points to a possible conserved location of this gene. A size difference

was seen between the 5S rDNA sites, probably owing to the presence of two quantitatively different clusters of this ribosomal sequence. The B chromosomes of *C. nagelii* do not support 5S or 18S rDNA sequences and were not differentially marked by DAPI or CMA₃. The hypothesis that karyotypic evolution in curimatids involves rearrangements of the centric fission/fusion and pericentric inversion type was suggested. Telomeric DNA sequences (TTAGGG)_n were used in *C. nagelii*. The chromosomes of complement A as well as of complement B showed signs in the telomeric region. Furthermore, at least two autosome pairs exhibited telomeric sequences in an interstitial position, thus corroborating the hypothesis of centric fission/fusion evolution combined with pericentric inversion for the family Curimatidae.

1. Introdução

1.1. Considerações sobre a família Curimatidae

Os Characiformes representam um dos maiores grupos de peixes de água-doce do mundo. Existem aproximadamente de 1343 espécies de Characiformes descritas taxonomicamente. A distribuição biogeográfica desse grupo abrange as Américas do Sul, Central e do Norte e a África, mostrando maior diversidade de espécies nos maiores rios Neotropicais (BUCKUP, 1993, 1998; NELSON, 1994). A distribuição geográfica dos characiformes pode ser ampliada se forem considerados os fósseis encontrados na Europa (GAUDANT, 1980; BUCKUP, 1998).

Curimatidae, uma das famílias da ordem Characiformes, está composta de 8 gêneros e aproximadamente 120 espécies, as quais estão distribuídas pelas Américas do Sul e Central (WEITZMAN and VARI, 1998). No trabalho de revisão de peixes da América do Sul e Central, obra de REIS et al. (2003), constam 8 gêneros de curimatídeos e 97 espécies descritas. Em cada gênero o número de espécies é: *Curimata* – 13, *Curimatella* – 5, *Curimatopsis* – 5, *Cyphocharax* – 34, *Potamorhina* – 5, *Psectrogaster* – 8, *Pseudocurimata* – 6, *Steindachnerina* – 21. Para o gênero *Steindachnerina*, há a descrição de uma nova espécie em LUCINDA and VARI (2009), assim, o total de espécies de curimatídeos seria de 98.

No presente trabalho foram utilizados espécimens de *Cyphocharax nagelii*, *Cyphocharax modestus* e *Steindachnerina insculpta*, todos endêmicos do Alto Rio Paraná (VARI, 1991,1992; SANTOS et al., 2008). Alto Paraná ou Sistema do Alto Rio Paraná, inclui toda a drenagem do Rio Paraná à montante do antigo Salto de Sete Quedas. A margem esquerda do Rio Paraná tem como afluentes os rios Grande, Paranaíba, Paranapanema e Tietê (LANGANI et al., 2007). *C. nagelii* e *S. insculpta* foram coletados na área do Rio Grande, mais precisamente no ribeirão das Minhocas, um tributário do rio Piumhi, que por sua vez se liga ao Rio Grande. Não existe registro de análises citogenéticas em espécimens de curimatídeos coletados nesta área; contudo, estudos de ictiofauna evidenciam *C. nagelii* como umas das espécies mais abundantes do

Rio Grande (NOGUEIRA et al., 2003); e a biologia reprodutiva de *S. insculpta* do reservatório de Furnas já foi descrita (RIBEIRO et al., 2007).

As espécies de curimatídeos são popularmente conhecidas como sagüirus, birus ou papa-terras, e podem ser encontradas em diversos ecossistemas aquáticos (VARI, 1989). De maneira geral, as espécies possuem corpo fusiforme e o tamanho interespecífico dos indivíduos pode variar de 3,3 a 32 cm de comprimento. Os curimatídeos têm grandes modificações na boca, nos arcos branquiais e no sistema digestório, adaptações que os tornam eficientes na utilização de material orgânico, microdetritos, microvegetação e algas filamentosas (VARI, 1989; REIS et al., 2003).

O comportamento migratório para desova também faz parte da biologia reprodutiva de algumas espécies de Curimatidae. Para as três espécies analisadas no presente trabalho, *Cyphocharax nagelii*, *Cyphocharax modestus* e *Steindachnerina insculpta*, foram descritas populações que realizam migração durante o período reprodutivo (VARI, 1992). A desova na família Curimatidae pode ser total, como em *Curimatella lepidura* (ALVARENGA et al., 2006); ou parcial, como em *C. nagelii*, *C. modestus* e *S. insculpta* (PETESSE et al., 2007; RIBEIRO et al., 2007). Em algumas regiões do Brasil, os peixes curimatídeos migrantes acabam sendo vitimados pela pesca comercial predatória ou pela pesca de subsistência (VARI, 1992).

A filogenia, baseada em caracteres morfofisiológicos, considera que as famílias Anostomidae, Chilodontidae, Curimatidae e Prochilodontidae formam um grupo monofilético. Nesta relação de parentesco, as famílias Curimatidae e Prochilodontidae formam um grupo irmão, e as famílias Anostomidae e Chilodontidae outro grupo irmão. A figura 1 mostra claramente esta relação.

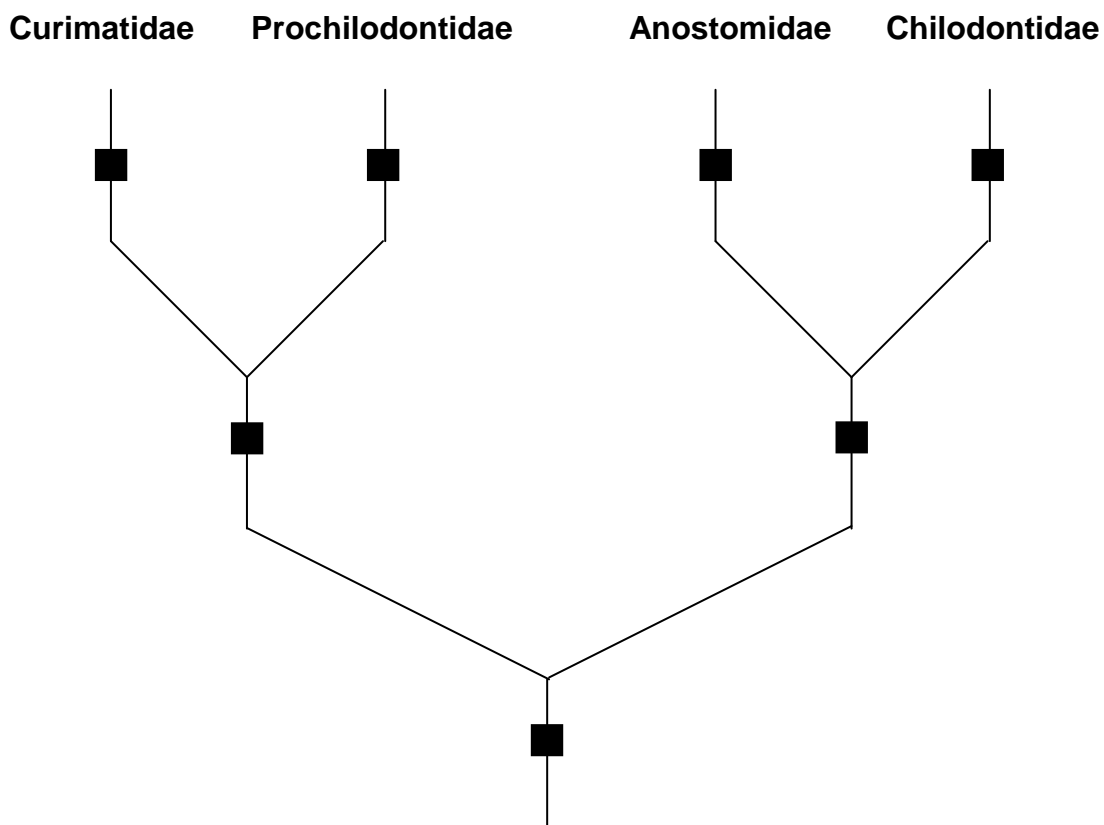


Figura 1- Cladograma mais parsimonioso da hipótese de relação entre as famílias Curimatidae, Prochilodontidae, Anostomidae e Chilodontidae. Os quadrados indicam sinapomorfias. Baseado em VARI (1983).

1.2. Informações citogenéticas da família Curimatidae

As análises citogenéticas nas espécies da família Curimatidae mostraram que existe um alto grau de conservação cariotípica macroestrutural nesta família. Existem, até o presente, 17 estudos publicados, os quais caracterizaram cromossomicamente 36 espécies/populações de curimatídeos (Tabela 1). Nestes estudos, 84% das espécies/populações possuem $2n=54$ cromossomos. Os cariótipos da maioria das espécies estão compostos por cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos. Adicionalmente, em cinco espécies foram encontrados cromossomos subtelo-cêntricos e acrocêntricos (FELDBERG et al, 1992, 1993; BRASSESCO et al., 2004).

A impregnação por nitrato de prata para evidenciar a Região Organizadora de Nucléolo (AgRON), mostrou que 95% das espécies/populações de curimatídeos possuía um par de cromossomos AgRON positivo; e apenas 5% continham mais de um par de cromossomos marcados pela prata, ou seja, apresentaram AgRON múltiplas. A heterocromatina constitutiva, evidenciada pela técnica de bandamento C, foi observada na região pericentromérica de todos os cromossomos em todas as espécies/populações submetidas a esta técnica. Adicionalmente, em algumas espécies foi possível observar bandas C teloméricas adicionais (VENERE et al., 2008).

As análises cromossômicas na família Curimatidae baseadas em técnicas de citogenética clássica foram mais abundantes, quando comparadas àquelas obtidas com técnicas de citogenética molecular. Em apenas quatro estudos foram empregados fluorocromos base-específicos (MARTINS et al., 1996, VENERE et al., 1999; De ROSA et al., 2007; TERIBELE et al., 2008). Com a utilização do fluorocromo Cromomicina (CMA₃) foi possível evidenciar as regiões organizadoras de nucléolos (RON), mostrando que essas regiões são ricas em bases nucleotídicas GC (De ROSA et al., 2007; TERIBELE et al., 2008). Até o presente, a técnica de hibridação *in situ* fluorescente com sondas de rDNA 5S e 18S, foi aplicada somente em *Cyphocharax modestus* e *Steindachnerina insculpta* (De ROSA et al., 2006, 2007; TERIBELE et al., 2008). No estudo realizado por De ROSA et al. (2006) nas espécies *C. modestus* e *S. insculpta*, foram encontrados 4 e 2 cromossomos portadores de seqüências de rDNA 5S, respectivamente. As sondas de rDNA 18S mostraram que em ambas as espécies apenas um par cromossômico é portador dessa região.

Na família Curimatidae, como diversos autores já sugeriram, existe uma conservação cariotípica macroestrutural (VENERE and GALETTI, 1989; FELDBERG et al., 1992; De ROSA et al., 2007; entre outros). Contudo, esses mesmos autores constataram que existem diferenças microestruturais muito importantes nessa família. Essas diferenças podem ser observadas em variações citogenéticas interespecíficas, tais como: no padrão de bandamento C, nos cromossomos portadores de AgRON (VENERE et al., 2008) e na quantidade de sítios de rDNA 5S. Além disso, um peculiar fator de

diferenciação interespecífica é a ocorrência de cromossomos B em algumas populações de *Cyphocharax gouldingi*, *Cyphocharax modestus*, *Cyphocharax spilatus* e *Steindachnerina insculpta* (VENERE and GALETTI, 1985; OLIVEIRA and FORESTI, 1993; MARTINS et al., 1996; VENERE et al., 1999; BRASSESCO et al., 2004; GRAVENA et al., 2007; De ROSA et al., 2008; VENERE et al., 2008).

Os cromossomos B encontrados nessas espécies são na grande maioria heterocromáticos, sugerindo, dessa maneira, que são formados por seqüências repetitivas de DNA. Considerando que as principais diferenças cariotípicas nos curimatídeos são microestruturais e que estão relacionadas à dinâmica de seqüências repetitivas, o estudo pormenorizado dos cromossomos B, nesse cenário, torna-se muito importante para a compreensão da evolução cromossômica na família Curimatidae. Cromossomos B são elementos peculiares nos cariótipos das espécies portadoras, merecendo, dessa maneira, considerações particulares.

1.3. Características dos cromossomos B

Quando se fala sobre cromossomos B é quase impossível não seguir um roteiro para abordar tal tema. Assim, na presente revisão sobre cromossomos B o roteiro terá os seguintes tópicos: definição, origem, manutenção, composição, função, evolução e comportamento mitótico e meiótico.

A definição de cromossomos B compilada por JONES and HOUBEN (2003) é bastante objetiva e diz que esses elementos são reconhecidos por três critérios: 1^o- são elementos dispensáveis e estão presentes em alguns indivíduos de uma determinada população, de uma determinada espécie ; 2^o- não emparelham ou recombinaem com os cromossomos do complemento A durante a meiose; 3^o- a herança desses elementos é não-mendeliana e irregular. Assim, os cromossomos B seriam cromossomos supernumerários ou supranumerários dispensáveis, que não se recombinariam com os cromossomos do complemento regular, seguindo seu próprio caminho evolutivo. Esses cromossomos já foram observados em diversas espécies/populações de animais, plantas e até mesmo de fungos.

Os cromossomos B podem surgir intraespecificamente a partir de autossomos ou de cromossomos sexuais; ou ainda, podem se originar interespecificamente por hibridização (JONES and REES, 1982; CAMACHO et al., 2000; JONES and HOUBEN, 2003). Na história evolutiva das espécies portadoras de B, existem hipóteses sobre quando esses elementos teriam surgido. Para canídeos, os cromossomos B encontrados nas espécies atuais teriam sua origem em um cromossomo B ancestral (YUDKIN et al., 2007); em Rodentia as espécies portadoras teriam herdado um mecanismo celular ancestral, o qual seria responsável pela origem e manutenção dos cromossomos B nas diferentes espécies (KARAMYSHEVA et al., 2002); ou ainda, como sugerido para o gafanhoto *Eyprepocnemis plorans*, a origem do cromossomo B estaria relacionada a um mecanismo chamado *de novo*, o qual sugere que o B dessa espécie passaria por ciclos de surgimento e desaparecimento (CAMACHO et al., 2000).

A perpetuação dos cromossomos B ao longo das gerações das espécies/populações portadoras pode ser explicada por duas hipóteses, as quais são: heterótica (“heterotic”) ou parasítica (“selfish”). Na hipótese heterótica os cromossomos B seriam mantidos por conferirem vantagem seletiva aos indivíduos portadores. Em contrapartida, a hipótese parasítica sugere que o cromossomo B teria efeitos deletérios, mas seria mantido através de um mecanismo de acúmulo, o qual permitiria a transmissão desses elementos acima do esperado mendeliano. Este mecanismo de acúmulo também é conhecido como “drive”. Assim, esses elementos seriam perpetuados por um equilíbrio entre seleção natural e mecanismo de acúmulo (JONES and REES, 1982; CAMACHO et al., 2000; GORLOV and TSURUSAKI, 2000).

Na hipótese de um mecanismo de acúmulo, este poderia ocorrer, por exemplo, através de processos celulares como a não-disjunção ou, através de fecundação preferencial por espermatozoides portadores de cromossomos B, os quais confeririam vantagem a estes gametas. JONES (1995), ainda aborda a possibilidade da manutenção de cromossomos B que não teriam mecanismo de acúmulo ou qualquer vantagem seletiva. O autor sugere que após o estabelecimento do polimorfismo dos cromossomos B, genes autossômicos promoveriam a neutralização destes. Assim, alguns cromossomos B

observados atualmente, estariam vivendo como “fósseis”, os quais seriam análogos a pseudogenes em um diferente nível de organização.

De maneira geral, os cromossomos B são constituídos de DNA repetitivo. Eles podem conter isolada ou concomitantemente seqüências nucleotídicas de rDNA 5S ou 18S, de elementos transponíveis, de DNA satélite, de região telomérica e/ou centromérica. A própria dinâmica das seqüências de DNA repetitivo dos genomas, de forma geral, pode justificar o surgimento e a constituição dos cromossomos B (PEPPERS et al., 1997; CAMACHO et al., 2000; JONES and HOUBEN, 2003).

Eventos tais como: *crossing over* desigual entre cromátides irmãs, *slippage* da DNA polimerase ou replicação em círculo rolante, envolvendo DNA repetitivo, poderia dar origem a fragmentos nucleotídicos que passariam a se comportar como cromossomos B (JONES and HOUBEN, 2003). As descobertas sobre a constituição dos cromossomos B, sugerem a princípio, que eles são muito semelhantes, neste quesito, aos autossomos e aos cromossomos sexuais. Contudo, concordando com ALFENITO and BIRCHLER (1993), cromossomos B e aqueles do complemento A, apresentam similaridades estruturais; todavia, mesmo que a estrutura seja similar, diferenças existem, pois o comportamento entre estes dois tipos de cromossomos é divergente. Como um exemplo dessas diferenças pode ser citado o cromossomo B de milho, cuja região centromérica e a heterocromatina adjacente a esta região, parecem promover a não-disjunção destes elementos durante a meiose (ALFENITO and BIRCHLER, 1993).

As seqüências repetitivas dos cromossomos B, de maneira geral, mostram-se heterocromáticas após a aplicação da técnica de bandamento C. Essa característica é utilizada para sugerir que esses elementos cromossômicos seriam transcricionalmente inativos (CAMACHO et al., 2000). Entretanto, em algumas espécies de plantas foi possível relacionar fenótipos com genes presentes nos cromossomos B (JONES and REES, 1982; BOUGOURD and JONES, 1997).

Mesmo que os cromossomos B não apresentem genes funcionais, o excesso de DNA devido a presença desses elementos pode se constituir em um fator fisiologicamente desfavorável para a célula (BOUGOURD and JONES, 1997). Existe uma correlação positiva entre efeito fenotípico e a presença de

números pares ou ímpares de cromossomos B. Em centeio a presença de números ímpares de cromossomos B está relacionada à redução na fertilidade (JONES and HOUBEN, 2003; JONES and REES, 1982). Ainda com relação à quantidade de cromossomos B, CAMACHO et al. (2000) sugerem que o máximo de cromossomos B que uma espécie é capaz de tolerar é determinado pelo máximo encontrado em indivíduos adultos. E este máximo depende de fatores tais como: intensidade de seleção, da história da espécie, de características relacionadas à transmissão e de outros fatores aleatórios.

Como anteriormente citado, os cromossomo B surgiriam dos cromossomos do complemento A, seja a partir de autossomos ou cromossomos sexuais, ou ainda pela hibridização de dois complementos regulares. Após terem sido originados os cromossomos B seguiriam um caminho evolutivo particular e independente dos demais cromossomos do complemento. Essa independência evolutiva teria relação com mecanismos celulares que promoveriam sua rápida diferenciação, impedindo que houvesse interação dos cromossomos B com aqueles do complemento A. Essa rápida diferenciação estaria vinculada, por exemplo, ao acúmulo de heterocromatina ou a metilação do DNA. Dessa maneira, o cromossomo B recém surgido ficaria isolado dos demais cromossomos, podendo seguir sua evolução independente por um processo análogo à catraca de Muller (CAMACHO et al., 2000; JONES and HOUBEN, 2003).

A independência dos cromossomos B em relação aos demais cromossomos regulares também pode ser verificada quando são analisados seu comportamento mitótico e meiótico. Em algumas espécies o cromossomo B é mitoticamente estável se comportando como um autossomo regular, como na rã *Leiopelma hochstetteri* (GREEN et al., 1993); em outras é instável e segrega-se aleatoriamente, como no centeio *Secale cereale* (NEVES et al., 1992). Durante a meiose os cromossomos B podem não emparelhar entre si nem com cromossomos do complemento regular, permanecendo como univalentes (CAMACHO et al., 2000; JONES and HOUBEN, 2003), ou podem formar bivalentes ou multivalentes entre si (JONES, 1995; DIAS et al., 1998; GORLOV and TSURUSAKI, 2000), ou ainda, podem passar por um mecanismo de breve emparelhamento chamado *touch and go* (NOKKALA et al., 2000).

O emparelhamento de cromossomos durante a meiose I é extremamente importante para que uma segregação regular desses elementos possa ocorrer (SUMNER, 2003). Assim, quando os cromossomos B se comportam como univalentes dificilmente terão segregação regular, e até mesmo seria inevitável perdas desses cromossomos durante a meiose (JONES, 1995; CAMACHO et al., 2000).

Desde 1982, quando JONES and REES publicaram sua monografia sobre cromossomos B, o uso da biologia molecular tem acrescentado muitas informações a respeito da constituição e da dinâmica dos cromossomos B. O uso de enzimas de restrição para isolar seqüências repetitivas de DNA, microdissecção cromossômica, experimentos sobre fosforilação e metilação de histonas, uso de hibridação *in situ* fluorescente com seqüências gênicas, como exemplo, de DNA ribossômico, são algumas das técnicas utilizadas no estudo dos cromossomos B (LÓPEZ-LEÓN, 1995; JONES and HOUBEN, 2003; KARAMYSHEVA et al., 2002). Segundo JONES and HOUBEN (2003) um “coquetel” de tecnologia molecular está sendo usado para se entender a estrutura, origem e evolução dos cromossomos B; além disso, os referidos autores comentam que o interesse atual seria a transmissão de genes ligados aos cromossomos B.

Recentemente foi publicada por CARVALHO et al. (2008) uma revisão sobre a ocorrência de cromossomos B em peixes neotropicais de água doce. Nesta revisão os autores reuniram informações que permitiram identificar a ordem Characiformes como sendo a detentora do maior número de espécies portadoras de cromossomos B. Nesta ordem foram encontradas 31 espécies portadoras de cromossomos B, as quais estão distribuídas nas famílias Anostomidae, Characidae, Crenuchidae, Curimatidae, Parodontidae e Prochilodontidae. Cromossomos B também foram encontrados nas ordens Siluriformes, Perciformes, Cyprinodontiformes, Gymnotiformes, Beloniformes e Synbranchiformes. Entre os Characiformes, a família Characidae possui o maior número de espécies portadoras de cromossomos B, ao todo são 14 espécies. Em segundo lugar, juntamente com a família Crenuchidae está a família Curimatidae, com 5 espécies portadoras de cromossomos B (CARVALHO et al., 2008; VENERE et al., 2008).

As características morfológicas dos cromossomos B em peixes neotropicais de água doce é bastante variada. Esta variação não é nenhuma surpresa, considerando a ampla distribuição desses elementos em famílias tão distintas. Assim, podem ser encontrados cromossomos B meta-, submeteta-, acro- ou subtelocêntricos (CARVALHO et al., 2008); eles podem ser considerados, em relação aos autossomos, como pequenos, médios ou grandes; são heterocromáticos ou eucromáticos. Outro aspecto já esperado é que as teorias sobre origem, manutenção e evolução dos cromossomos B em peixes neotropicais seja bastante diversificada.

Em *Astyanax scabripinnis* (Characidae), evidências estruturais e funcionais sugerem, baseadas respectivamente na distribuição de DNA satélite no cromossomo B e do comportamento meiótico deste elemento, que ele é um isocromossomo (MESTRINER et al., 2000). A hipótese de isocromossomo também é sugerida para a origem do cromossomo B de *Prochilodus lineatus*; contudo, os autores não descartam a possibilidade de que um mecanismo de não-disjunção tenha originado os cromossomos B de *P. lineatus*. As hipóteses para *P. lineatus* foram baseadas em análises citogenéticas envolvendo hibridação *in situ* fluorescente com sonda de DNA satélite (JESUS et al., 2003). Adicionalmente, para *P. lineatus* foi sugerida a ausência de “drive” para explicar o aumento na frequência de cromossomos B (OLIVEIRA et al., 1997). Segundo FELDBERG et al. (2004), *Cichla* sp. poderia ter se originado por hibridização interespecífica, e durante processo de introgressão dos genomas, rearranjos poderiam ter dado origem aos cromossomos B dessa espécie.

Estes são apenas alguns exemplos das análises de cromossomos B em peixes neotropicais. As técnicas de citogenética molecular e de biologia molecular têm sido modestamente utilizadas nas pesquisas dos elementos adicionais de peixes neotropicais, quando comparadas a outros grupos de animais de outras regiões biogeográficas. A comparação torna-se ainda mais desvantajosa para peixes neotropicais quando são citados os estudos em plantas, os quais mostram resultados tecnologicamente muito requintados.

1.4. Considerações gerais sobre DNA ribossômico

Os genes de RNA ribossômico, em eucariotos, estão organizados em duas diferentes famílias multigênicas. Estas famílias estão compostas de centenas a milhares de cópias destes genes, repetidas em *tandem*. Os genes de rRNA são transcricionalmente divididos em duas classes (PHILLIPS and REED, 1996; MARTINS et al., 2004). A primeira é conhecida como rDNA 45S e codifica os rRNA 18S, 5,8S e 28S, em eucariotos superiores. Abaixo segue um esquema da organização do gene de rDNA 45S:

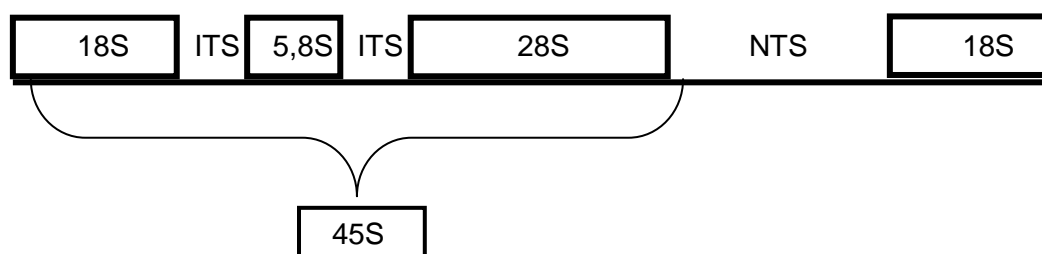


Figura 2- Diagrama da unidade de rDNA 45S, com base na unidade de organização descrita para humanos (SUMNER, 2003) e para eucariotos (GORAB, 2001). ITS = Internal Transcribed Spacer; NTS = Non Transcribed Spacer.

As múltiplas cópias da unidade de rDNA 45S, agrupadas em *tandem*, formam a Região Organizadora de Nucléolo (RON), a qual pode ser rica em bases nucleotídicas CG (MILLER, 1981; SUMNER, 2003). Em alguns estudos cromossômicos, já foi possível constatar a presença de heterocromatina adjacente ou intercalar a RON (PENDÁS et al., 1993; PHILLIPS and REED, 1996; ARTONI et al., 1999; MARGARIDO and GALETTI, 2000). Em *Leporinus elongatus* (Characiformes), os resultados utilizando técnicas como coloração com MM+ (mitramicina), AgRON, bandamento C e bandamento com solução salina quente, mostram que existe a possibilidade de que heterocromatina rica em bases CG, intercale sítios de rDNA 45S (ARTONI et al., 1999). No mesmo

estudo, análises cromossômicas na espécie *Liporsarcus anisitsi* (Siluriformes), usando as mesmas técnicas, sugerem que a heterocromatina está adjacente ao sítio de AgRON, e que a mesma não possui grandes quantidades de bases CG.

O sítio de rDNA 45S é considerado um bom marcador cromossômico, podendo até ser utilizado como uma característica espécie-específica. Em algumas espécies do gênero *Parodon* (Characiformes, Parodontidae) as RON foram consideradas espécie-específica (VICENTE et al., 2001). Dessa forma, muitas técnicas citogenéticas têm sido utilizadas para identificar estas seqüências de DNA ribossômico. A impregnação pela prata (HOWELL and BLACK, 1980), uma técnica simples, é capaz de evidenciar RON que estiveram ativas na intérfase precedente (SUMNER, 1990). A coloração com antibióticos fluorescentes CG-específicos, por exemplo, CMA₃ (cromomicina) ou MM⁺ (mitramicina), também têm sido usadas para demarcar sítios de rDNA 45S. A precisão na identificação das RON tem sido alcançada com o emprego da técnica de hibridação *in situ* fluorescente, utilizando, de maneira usual, sondas de rDNA 18S ou 28S (PHILLIPS and REED, 1996; MARTINS et al., 2004; GROMICHO et al., 2005).

A outra classe de DNA ribossômico, que não faz parte da RON, é aquela que codifica o rRNA 5S. Logo abaixo um diagrama da região de rDNA 5S em eucarioto superior.



Figura 3- Modelo de organização do rDNA 5S em eucarioto superior. NTS = Non Transcribed Spacer. (MARTINS and WASKO, 2004)

O gene para rRNA 5S está organizado em repetições que envolvem o sítio 5S e um espaçador não transcrito (NTS), formando uma unidade que pode estar repetida em tandem de 100 a 300.000 vezes. O rDNA 45S tem um número menor de cópias, quando comparado ao rDNA 5S (HADJIOLOV, 1985). Em trabalhos de mapeamento físico de cromossomos, o rDNA 5S,

assim como o 45S, tem se mostrado um bom marcador cromossômico, inclusive espécie-específico (MARTINS et al., 2002; MARTINS and WASKO, 2004). O nível de refinamento do mapeamento físico com rDNA 5S chega até a diferenciação entre sexos, como na truta *Oncorhynchus mykiss* (MORÁN et al., 1996).

Os genes para rRNA 5S, são bastante conservados entre diferentes taxa; entretanto, a região NTS evolui rapidamente, sendo diversificada até mesmo entre espécies do mesmo gênero. Este segmento não transcrito tem sido usado em estudos sobre a evolução de famílias multigênicas, e como evidência de eventos evolutivos recentes (MARTINS and WASKO, 2004).

O DNA ribossômico 45S é transcrito pela DNA polimerase I e o DNA ribossômico 5S é transcrito pela DNA polimerase III. As repetições da região 45S, as quais correspondem ao nucléolo na intérfase, formam uma estrutura altamente complexa em termos funcionais; nos cromossomos esta região pode aparecer menos condensada e é conhecida como constrição secundária. Em contrapartida, a região rDNA 5S, nas análises cromossômicas convencionais, não mostra nenhuma peculiaridade que permita a sua identificação. Até o presente o rDNA 45S pode ser destacado nos cromossomos com o uso de AgRON, fluorocromos e hibridação *in situ* fluorescente; entretanto, o rDNA 5S só pode ser identificado citogeneticamente, na grande maioria dos organismos, através de hibridação *in situ* (SUMNER, 2003; GALETTI and MARTINS, 2004).

A quantidade de sítios de rDNA 45S ou 5S pode ser muito variada entre diferentes organismos. *Astyanax altiparanae* (Characiformes), no estudo feito por FERNANDES and MARTINS-SANTOS (2006), mostrou que o sítio de rDNA 45S está disperso em mais de um par cromossômico e que o sítio de rDNA 5S está apenas em um par. Na família Curimatidae, *Cyphocharax modestus*, tem apenas um par portador de RON e mais de um par com rDNA 5S (De ROSA et al., 2006, 2007). Existem espécies, como *Anaecypris hispânica* (Cypriniformes) que tem múltiplas regiões de ambas as classes de DNA ribossômico (GROMICHO et al., 2005). Finalmente, a situação mais simples, na qual apenas um par é portador de rDNA 45S e outro par é portador do 5S, ou seja, sem que estes genes estejam no mesmo cromossomo, ocorre, por exemplo, no gastrópode *Melarhaphe neritoides* (COLOMBA et al., 2002).

Estas duas classes de DNA ribossômico podem ser encontradas em cromossomos distintos (MARTINS et al., 2000), ou ainda em organização sintênica no mesmo cromossomo (HATANAKA and GALETTI, 2004). A disposição independente desses genes em cromossomos distintos é uma condição bastante comum. Considerando a complexidade funcional que envolve essas regiões, a condição individualizada desses sítios parece ser mais vantajosa. Segundo GALETTI and MARTINS (2004), a independência desses sítios evitaria que ocorressem translocações indesejadas de seqüências 5S dentro do arranjo 45S, ou vice-versa.

A questão evolutiva dessas regiões é lembrada em MARTINS and GALETTI (1999). Estas famílias multigênicas podem evoluir, por exemplo, por conversão gênica ou *crossing-over* desigual. A eficiência de tais mecanismos poderia ser garantida quando essas duas classes de DNA ribossômico estivessem separadas em cromossomos distintos (MARTINS and GALETTI, 1999). Quanto à posição, e considerando o grupo de peixes, o gene de rRNA 45S pode ocupar a região cromossômica intersticial (HATANAKA and GALETTI, 2004), ou terminal (De ROSA et al., 2007). O mesmo ocorre para o gene de rRNA 5S em peixes; contudo, uma revisão citogenética dos dados sobre mapeamento físico desta última região, mostrou que a posição intersticial é predominante, mesmo entre ordens diferentes de peixes (MARTINS and WASKO, 2004).

1.5. Considerações gerais sobre seqüências teloméricas

As porções finais dos cromossomos de eucariotos e da molécula de DNA de alguns procariotos são conhecidas como telômero (SUMNER, 2003). A esta região são atribuídas diversas funções, tais como: proteção contra recombinação intercromossômica; envolvimento na senescência e imortalização de células; em alguns organismos atuam na organização do DNA na interfase; podem colaborar com o emparelhamento dos cromossomos durante a meiose, através da sua interação com o envoltório nuclear; comportam-se como heterocromatina em alguns organismos, mesmo que não se mostrem citogeneticamente como tal tipo de cromatina, promovendo efeito de posição e inativação de genes (GREIDER, 1999; SUMNER, 2003). Os

telômeros estão organizados de maneira peculiar. Em seguida está uma figura que mostra, de maneira geral, a estrutura particular dos telômeros.

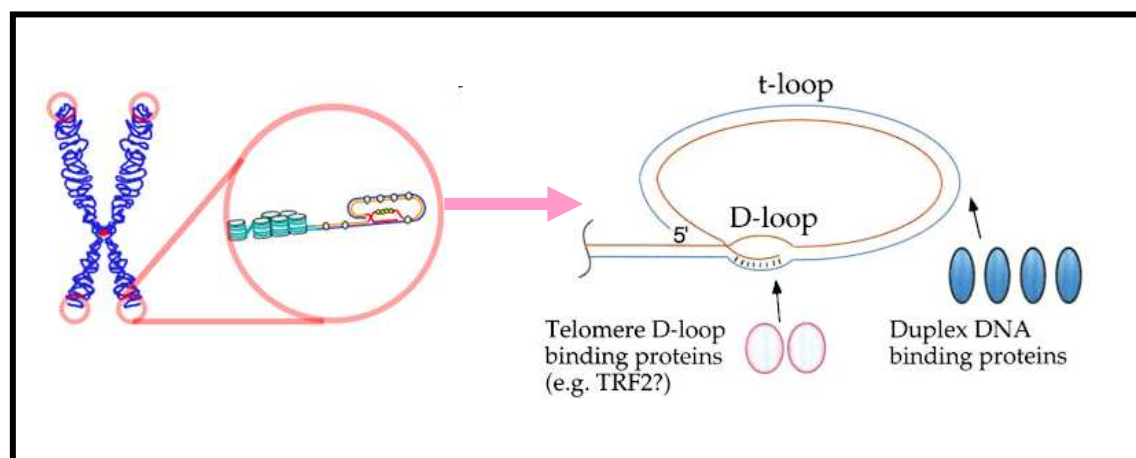


Figura 4- Estrutura dos telômeros, baseada na arquitetura proposta para mamíferos. A figura evidencia que o telômero forma um *t-loop* de fita dupla de DNA e um *D-loop* de fita simples de DNA. É observada a presença de proteínas interagindo com as estruturas em *loop* do DNA. Esquema retirado de GREIDER (1999). TRF2 = proteína ligada à fita dupla de DNA, uma falha na sua produção parece permitir a fusão telomérica de cromossomos.

A sequência nucleotídica encontrada na região telomérica é bastante simples e é formada por pequenos monômeros repetidos em *tandem*; além disso, as unidades são bastante conservadas, mesmo entre diferentes *taxa*. Assim, a sequência telomérica $(TTAGGG)_n$ é compartilhada, por exemplo, entre *Xenopus*, ratos e humanos (SUMNER 1990, 2003; GREIDER 1999). Com relação à conservação da sequência $(TTAGGG)_n$ é possível encontrar textos que dizem que todos os vertebrados possuem esse motivo nucleotídico na região telomérica (PHILLIPS and REED, 1996).

Assim, existem registros de hibridação *in situ* fluorescente usando a sequência telomérica descrita nas ordens de peixes Anguilliformes, Cypriniformes, Cyprinodontiformes, Gymnotiformes e Salmoniformes (MEYNE et al., 1989; PHILLIPS and REED, 1996, SILVA et al., 2009).

A despeito do seu aspecto conservado, a citogenética tem usado as sondas de DNA telomérico como importante evidência de rearranjos cromossômicos. Sinais intersticiais de hibridação em alguns cromossomos de algumas espécies de peixes, têm fornecido indícios de que eventos de fusão atuaram na evolução cariótica dessas espécies.

Exemplos de espécies com marcações cromossômicas teloméricas intersticiais podem ser encontrados nas ordens de peixes: Perciformes, Salmoniformes (Teleostei) e Rajiformes (Chondrostei) (PHILLIPS and REED, 1996; ROCCO et al., 2001; MARTINS et al., 2004). No gênero *Salvelinus* (Salmoniformes) já existem estudos relacionando as seqüências (TTAGGG)_n com a transposição de sítios de RON (REED and PHILLIPS, 1995; ZHUO et al., 1995). Os referidos estudos concentram-se em resultados de hibridações teloméricas aplicadas aos cromossomos do complemento regular; todavia, já existem registros de marcação telomérica (TTAGGG)_n em cromossomos supernumerários ou B, como exemplo, em Rodentia (PEPPERS et al., 1997).

1.6. Considerações gerais sobre microdissecção cromossômica

As análises citogenéticas voltadas à organização estrutural dos cromossomos, as quais fornecerão subsídios para estudos cromossômicos comparativos, necessitam constantemente do isolamento de seqüências nucleotídicas específicas capazes de satisfazer tais objetivos. O *flow-sorting*, também conhecido como FAC (Fluorescence Activated Cell sorting), e a microdissecção cromossômica, são dois métodos eficientes no fornecimento de seqüências nucleotídicas que podem ser empregadas como marcadores cromossômicos.

No primeiro método, o *flow-sorting*, cromossomos inteiros são selecionados (citometria de fluxo), com base em seu tamanho e afinidade por fluorocromos base-específicos AT ou GC, e então separados (VRÁNA et al., 2000; HENNING et al., 2008). Uma das vantagens da *flow-sorting* é conseguir separar grandes quantidades de cromossomos (VRÁNA et al., 2000).

A microdissecção cromossômica pode ser dividida em: captura automática (atômica ou a laser) ou captura manual. A captura atômica ou AFM (Atomic Force Microscope) consiste basicamente em escolher um fragmento de interesse através de um scanner, e cortar com um laser o pedaço escolhido.

Após o corte, o fragmento pode ser capturado com um microcapilar convencional, e finalmente submetido a uma PCR- Polymerase Chain Reaction (IWABUCHI et al., 2002).

A microdissecção a laser, de maneira geral, está baseada no corte total ou de partes de cromossomos, e na sua adesão a um filme termoplástico ou outro tipo de membrana. O DNA é extraído desta membrana e submetido à PCR (IHLASEH et al., 2007). Por último, na microdissecção manual os cromossomos, ou fragmentos destes, são retirados de lamínulas através de um micromanipulador acoplado a um microscópio invertido. O micromanipulador contendo um capilar ou agulha é manualmente controlado para que a microdissecação aconteça. Obviamente, os cromossomos microdissectados de forma manual também são submetidos a PCR (HENNING et al., 2008).

No presente trabalho, foi utilizada a técnica de microdissecção manual (Figura 5, no final deste parágrafo), a qual possibilitou a obtenção de seqüências do cromossomo B de *Cyphocharax nagelii*. Após a microdissecção foram usadas algumas estratégias para se amplificar os fragmentos desconhecidos do cromossomo B, as quais foram: uma RAMP-PCR (RAMP- *Polymerase Chain Reaction*), uma enzima termoestável e um conjunto de *primers* degenerados.

A PCR-RAMP acontece em condições de baixa estringência, ou seja, temperaturas de anelamento dos *primers* muito baixas. O termo RAMP é empregado com referência à variação gradual na temperatura de anelamento dos *primers* (ver Métodos). Assim, RAMP neste caso não tem relação com o método *Randomly Amplified Microsatellite Polymorphism*. O uso de uma enzima relativamente mais termoestável é importante considerando que a RAMP-PCR sofre muitas variações de temperatura, e utiliza muitos ciclos na tentativa de amplificar o maior número de fragmentos. Os *primers* possuem a seqüência 5'CCGACTCGAGNNNNNNATGTGG3', e são degenerados porque o N pode ser uma base A, T, C ou G. Portanto, realizar amplificação com esse *primer* significa trabalhar com um conjunto de 4096 (4^6) *primers* diferentes. Essas estratégias foram baseadas em TELENIUS et al. (1992) com modificações. Convém ressaltar que na literatura existem muitas estratégias para amplificar cromossomos microdissectados, uma delas pode ser obtida em HENNING et al. (2008).

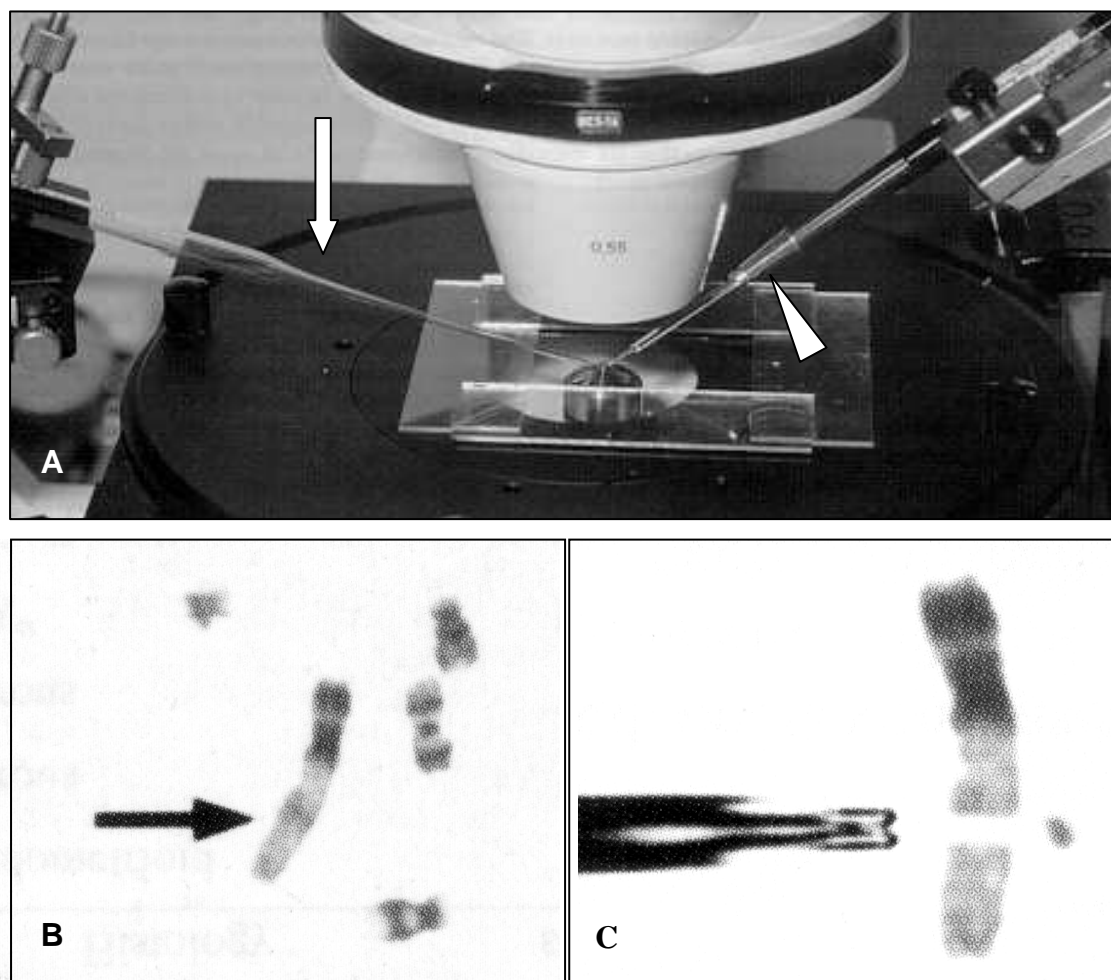


Figura 5- Imagens do microscópio e da dinâmica da microdissecção manual. **A.** detalhe da platina e da lamínula com os cromossomos. Seta sinaliza pipeta para a coleta dos cromossomos e a cabeça de seta indica capilar para a microdissecção. Ambos são conduzidos manualmente. **B.** Campo visual de cromossomos a serem microdissectados. A seta indica a região que será retirada. **C.** Mostra a ponta do capilar e a região cromossômica já separada (disponível em UNESP-BOTUCATU <http://www.ibb.unesp.br/extensao/acidos_nucleicos/material_didatico/19_Hibridacao_in_situ_cromossomica.pdf>).

Dependendo do objetivo do trabalho, o produto da microdissecção pode ser usado diretamente em hibridações *in situ* fluorescente, verificando sem especificidade nucleotídica, qual a distribuição dos fragmentos amplificados. Contudo, em determinadas situações o conhecimento dos fragmentos microdissectados seria importante. A clonagem dos fragmentos possibilitaria a

montagem de uma biblioteca, a qual seria utilizada para a determinação das seqüências e de hibridações com seqüências específicas. Segundo TERUEL et al. (2009), este seria um árduo trabalho. Além do trabalho, os custos de investigação de uma biblioteca de fragmentos microdissectados são extremamente altos. A dimensão do trabalho e dos prováveis gastos podem ser calculados através de experiências como as de ALFENITO and BIRCHLER (1993) e de CHENG and LIN (2003), que realizaram microdissecção de cromossomos B. Os primeiros autores fizeram um *screening* de 5000 fagos, enquanto que os segundos autores um *screening* de 1671 clones.

Existem estudos envolvendo a microdissecção de autossomos, cromossomos sexuais ou cromossomos B. No peixe *Eigenmannia* sp. (Gymnotiformes), um autossomo foi microdissectado e a hibridação *in situ* com a sonda obtida, mostra seqüências compartilhadas somente entre os homólogos (HENNING et al., 2008). Na truta *Salvelinus namaycush* (Salmoniformes) parte do cromossomo Y foi microdissectado, e este fragmento apresentou homologia com uma região do cromossomo X (REED et al., 1995). A mesma situação vista em *S. namaycush*, ou seja, envolvendo cromossomos sexuais também pode ser observada no gênero *Triportheus* - Characiformes (DINIZ et al., 2008). Existem diversos estudos envolvendo microdissecção de cromossomos B em diferentes *taxa*. O cromossomo supernumerário de *Locusta migratoria* (Orthoptera) foi recentemente microdissectado por TERUEL et al. (2009). Sequências do cromossomo B de *L. migratoria* mostraram homologia com alguns autossomos e com o cromossomo sexual X.

Tabela 1- Estudos citogenéticos realizados na família Curimatidae. 2n=número diplóide; MC=Morfologia Cromossômica; Crom. B=Cromossomos B; a=acrocêntrico; m=metacêntrico; sm=submetacêntrico; st=subtelocêntrico; +=apresenta registro.

Espécies	2n	MC	Par AgRON	rDNA 18S	rDNA 5S	DAPI/ CMA₃	Crom. B	Outras técnicas	Referências
<i>Curimata cyprinoides</i>	54	m/sm	3,7					Banda C	3,17
<i>Curimata inornata</i>	54	m/sm	3,21,22					Banda C	3,17
<i>Curimata Kneri</i>	54	m/sm/st	27						3
<i>Curimata ocellata</i>	56	m/sm	26						3
<i>Curimata vittata</i>	54	m/sm	9						3
<i>Curimatella alburna</i>	54	m/sm	14						3
<i>Curimatella dorsalis</i>	54	m/sm	2,13					Banda C	8,11
<i>Curimatella imaculata</i>	54	m/sm	24					Banda C	17
<i>Curimatella lepidura</i>	54	m/sm	9						2
<i>Curimatella meyeri</i>	54	m/sm	9						3,8
<i>Curimatopsis myersi</i>	46	m/sm							8
<i>Cyphocharax gilbert</i>	54	m/sm	2					Banda C,G	6,17
<i>Cyphocharax cf. gillii</i>	54	m/sm							2
<i>Cyphocharax gouldingi</i>	54	m	2				+	Banda C	17
<i>Cyphocharax modestus</i>	54	m/sm	2	+	+	+	+	Banda C	1,2,7,9,12,13,14,15,16,17,18

Espécies	2n	MC	Par AgRON	rDNA 18S	rDNA 5S	DAPI/ CMA₃	Crom. B	Outras técnicas	Referências
<i>Cyphocharax nagelii</i>	54	m/sm	6,25	+	+	+	+	Banda C	6,17,18
<i>Cyphocharax cf. spilurus</i>	54	m/sm	10						2
<i>Cyphocharax platanus</i>	58	m/sm/st	5,6					Banda C	11,17
<i>Cyphocharax spilotus</i>	54	m/sm	1				+	Banda C	11
<i>Cyphocharax vanderi</i>	54	m/sm	6						2
<i>Cyphocharax voga</i>	54	m/sm	6					Banda C	2,11
<i>Potamorhina altamazonica</i>	102	m/sm/a	5					Banda C	4
<i>Potamorhina latior</i>	56	m/sm/st	25					Banda C	4
<i>Potamorhina pristigaster</i>	54	m/sm	25					Banda C	4
<i>Potamorhina squamoralevis</i>	102	m/sm/a	1 par (?)						11
<i>Psectrogaster amazônica</i>	54	m/sm	17					Banda C	17
<i>Psectrogaster curviventris</i>	54	m/sm	20					Banda C	8,11
<i>Psectrogaster rutiloides</i>	54	m/sm	9						3
<i>Steindachnerina amazônica</i>	54	m/sm	2,23					Banda C	17
<i>Steindachnerina brevipina</i>	54	m/sm	15,17					Banda C	8,11
<i>Steindachnerina conspersa</i>	54	m/sm	2					Banda C	2,11
<i>Steindachnerina elegans</i>	54	m/sm	21,25					Banda C	2,17

Espécies	2n	MC	Par AgRON	rDNA 18S	rDNA 5S	DAPI/ CMA₃	Crom. B	Outras técnicas	Referências
<i>Steindachnerina gracilis</i>	54	m/sm	1 par (?)					Banda C	17
<i>Steindachnerina cf. guenteri</i>	54	m/sm	24					Banda C	10
<i>Steindachnerina insculpta</i>	54	m/sm	7,22,25	+	+	+	+	Banda C,R	2,5,6,12,13,14,16,17,18
<i>Steindachnerina leuciscus</i>	54	m/sm	15						3

Referências: 1-VENERE and GALETTI (1985); 2- VENERE and GALETTI (1989); FELDBERG et al. (1992); 4- FELDBERG et al. (1993); 5- OLIVEIRA and FORESTI (1993); 6- VENERE and GALETTI (1995); 7- MARTINS et al. (1996); 8- NAVARRETE and JULIO (1997); 9- VENERE et al. (1999); 10- CARVALHO et al. (2001); 11- BRASSESCO et al. (2004); 12- De ROSA et al. (2006); 13- De ROSA et al. (2007); 14- GRAVENA et al. (2007); 15- De ROSA et al. (2008); 16- TERIBELE et al. (2008); 17- VENERE et al. (2008); 18- presente trabalho.

2. Objetivos

Para contribuir com a citogenética da família Curimatidae e identificar a origem, constituição e comportamento do cromossomo B de *C. nagelii*, o presente trabalho teve como objetivo:

- Caracterizar os cromossomos das três espécies de curimatídeos, usando técnicas de citogenética clássica, tais como bandamento C e impregnação pela prata, juntamente com aquelas de citogenética molecular, isto é, sondas de rDNA 5S e 18S, e fluorocromos base-específicos DAPI e CMA₃;
- Testar a hipótese de que os cromossomos B de *C. nagelii* teriam se originado intraespecificamente do complemento A, utilizando a microdissecção deste elemento adicional;
- Verificar se *S. insculpta*, uma espécie simpátrica a *C. nagelii*, e *C. modestus* possuem sequências nucleotídicas do cromossomo B microdissectado. Tal experimento colaboraria para a compreensão da origem das sequências que formam o cromossomo B de *C. nagelii*;
- Explorar a natureza química da heterocromatina constitutiva do cromossomo B de *C. nagelii*, empregando sondas de DNA ribossômico e fluorocromos base-específicos;
- Verificar o alcance da amplificação realizada após a microdissecção do cromossomo B de *C. nagelii*, usando sondas teloméricas (TTAGGG)_n. Além disso, verificar se estas sequências forneceriam informações sobre a ocorrência de rearranjos cromossômicos através de marcações não teloméricas.

3. Materiais e Métodos

3.1. Materiais

No presente trabalho, foram analisados oitenta e cinco indivíduos de *Cyphocharax nagelii* (54 machos e 31 fêmeas), quarenta exemplares de *Steindachnerina insculpta* (22 machos e 18 fêmeas) e, vinte e seis espécimens de *Cyphocharax modestus* (10 machos e 16 fêmeas). Todos os exemplares de

C. nagelii (Figura 6) e de *S. insculpta* foram coletados no Ribeirão Minhoca, município Capitólio (S 20°31'55.2"; W 46°02'42.1"), estado de Minas Gerais. Os espécimens utilizados para a identificação taxonômica de *C. nagelii* (MNRJ 29324) e de *S. insculpta* (MNRJ 29327 e MNRJ 29328) foram depositados no Museu Nacional de Zoologia do Rio de Janeiro. A identificação dos exemplares de *C. nagelii* e de *S. insculpta* foi realizada pelo Prof. Dr. Paulo Andreas Buckup do Museu de Zoologia do Rio de Janeiro e pelo Prof. Dr. Francisco Langeani Filho da UNESP-São José do Rio Preto. Os indivíduos de *C. modestus* foram coletados no Rio Piracicaba, município de Santa Maria da Serra (S 22°38'23"; W 48°03'11"), estado de São Paulo, e os exemplares foram depositados no Departamento de Morfologia da UNESP-Botucatu. Os espécimens de *C. modestus* foram identificados pelo Prof. Dr. Cláudio Oliveira da UNESP – Botucatu. As preparações cromossômicas mitóticas foram obtidas a partir de células dos rins e as preparações meióticas a partir de testículo ou ovário de indivíduos adultos. Segue alguns dados adicionais das espécies estudadas (REIS et al., 2003): *Cyphocharax nagelii* (Steindachner, 1881), localidade tipo – Minas Gerais e São Paulo, comprimento máximo – 16,3 cm, distribuição geográfica – Bacia do Alto Paraná; *Cyphocharax modestus* (Fernández-Yépez, 1948), localidade tipo – Rio Batalha (São Paulo), comprimento máximo – 16,2 cm, distribuição geográfica – Bacia do Alto Paraná e Rio Paraguay (Brasil e Paraguay); *Steindachnerina insculpta* (Fernández-Yépez, 1948), localidade tipo – Rio Tatuhy (São Paulo), comprimento máximo – 10,6 cm, distribuição geográfica – Bacia do Alto Paraná.

Posição taxonômica das espécies estudadas:

Reino Animalia

Filo Chordata

Subfilo Vertebrata

Classe Actinopterygii

Subclasse Neopterygii

Infraclasse Teleostei

Odem Characiformes

Família Curimatidae

Espécies *Cyphocharax modestus*, *Cyphocharax nagelii*,
Steindachnerina insculpta

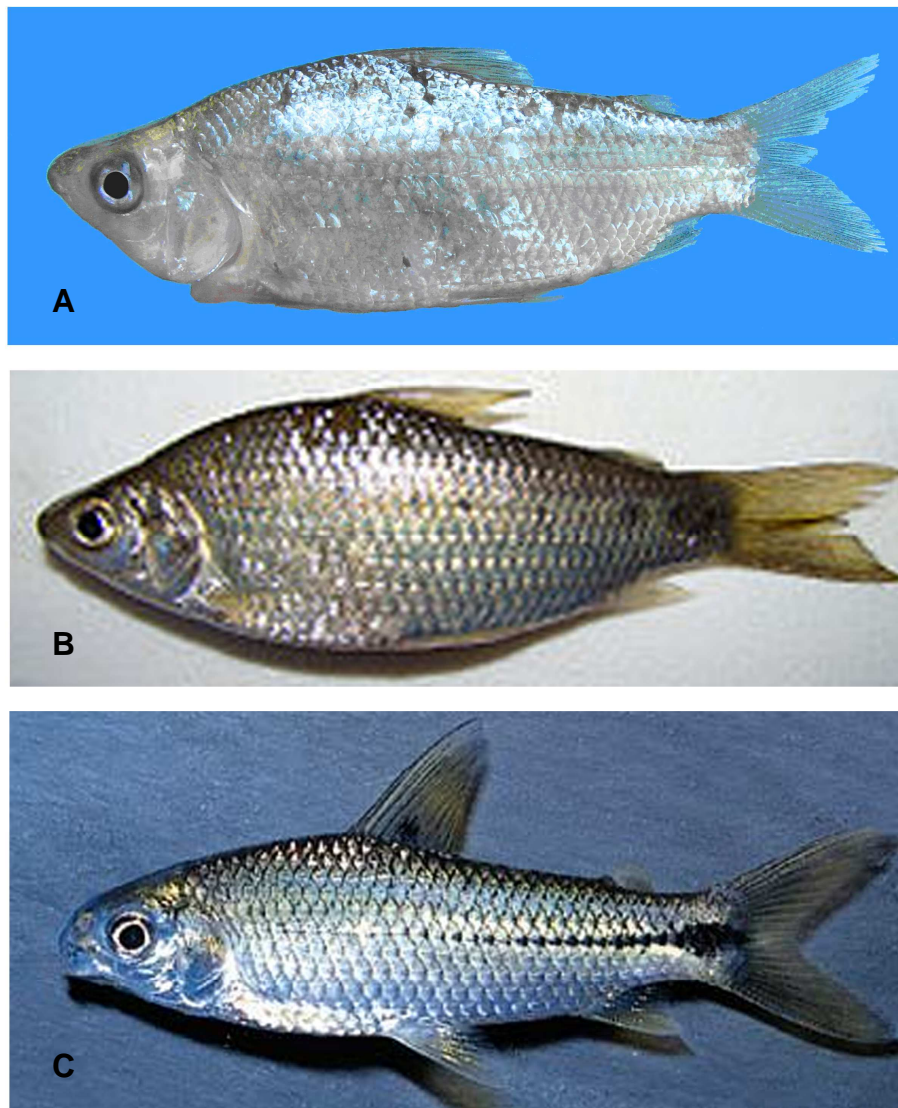


Figura 6- Exemplos machos de curimatídeos. **A.** *Cyphocharax nagelii*. **B.** *Cyphocharax modestus*. **C.** *Steindachnerina insculpta*. (Imagens ilustrativas sem escala).

3.2. Metodologia

3.2.1. Obtenção das preparações cromossômicas mitóticas e meióticas

A técnica de “air drying”, descrita por BERTOLLO et al. (1978), foi utilizada para obtenção dos cromossomos mitóticos e meióticos. O procedimento desenvolvido encontra-se detalhado logo abaixo:

- 1- Foi injetada uma solução de fermento biológico (10mg/mL), intraperitonealmente (0,1 ml por animal);
- 2- O peixe foi deixado em um aquário bem aerado por aproximadamente 24 horas; quando possível, foi reaplicada a solução de fermento e após mais 24 horas, foram sacrificados e porções anterior e posterior do rim, testículo ou ovário foram retiradas;
- 3- Os rins, testículo ou ovário foram transferidos separadamente para uma pequena cuba de vidro, contendo 1ml de meio RPMI (GIBCO@RPMI Media 1640 – Invitrogen);
- 4- Uma suspensão celular homogênea foi obtida através de leves movimentos de aspiração e expiração do material com uma seringa hipodérmica (de vidro) desprovida de agulha;
- 5- Foram acrescentadas 4 gotas de solução de colchicina a 0,0025%, a qual atuou durante 30 minutos; o material foi centrifugado e o sobrenadante descartado;
- 6- Foram colocados 8 mL de KCl a 0,075M e o material foi homogeneizado; a suspensão obtida permaneceu em estufa a 37 °C durante 20 minutos;
- 7- Após o tratamento com KCl (solução hipotônica), foram acrescentadas algumas gotas de fixador recém preparado (álcool metílico: ácido acético – 3:1), o material foi homogeneizado com pipeta Pasteur e centrifugado por 10 minutos a 900 rpm;
- 8- Descartado o sobrenadante, foram adicionados 12 ml de fixador recém preparado; o material foi homogeneizado e centrifugado por 10 minutos a 900 rpm;

9- O item 8 foi repetido por mais duas vezes. Após a última centrifugação e eliminação do sobrenadante, foi adicionado 1ml de fixador e o material foi bem homogeneizado. Este foi, então, acondicionado em pequenos frascos tipo “Eppendorff” e armazenado a 4 °C;

10- As lâminas, cobertas com uma película de água a 50-60°C, foram preparadas com cinco gotas da suspensão celular obtida, as quais foram “pingadas” sobre diferentes regiões;

11- As lâminas foram secas ao ar e coradas com solução de Giemsa a 5%, em tampão fosfato (pH 6,8), por 7 minutos;

12- A seguir, as lâminas foram lavadas com água destilada, e após estarem secas foram analisadas com microscópio de luz.

As lâminas utilizadas para hibridação *in situ* fluorescente foram preparadas de forma semelhante àquela descrita acima, até o item 10.

3.2.2. Técnica de bandamento C

A técnica descrita por SUMNER (1972), com algumas modificações, foi utilizada para a marcação da heterocromatina constitutiva. Todas as preparações cromossômicas obtidas foram submetidas à coloração seqüencial Giemsa-banda C, e o procedimento empregado para a visualização da heterocromatina está descrito abaixo:

1- As lâminas, contendo os cromossomos mitóticos ou meióticos, foram tratadas com uma solução de HCl 0,2N à temperatura ambiente durante 15 minutos, e depois lavadas com água destilada;

2- Em seguida, essas foram colocadas em uma cuba contendo solução de hidróxido de bário 5% a temperatura ambiente, durante 2 minutos (tempo experimental), e depois, foram colocadas em solução de HCl 0,2N; em seguida, foram lavadas em água destilada;

4- A seguir foram incubadas em solução salina 2xSSC a 60 °C por 45 minutos; após, lavadas em água destilada;

5- As preparações cromossômicas foram coradas com Giemsa a 5% em tampão fosfato pH 6,8 durante 10 minutos; lavadas em água destilada, e após estarem secas foram analisadas com microscópio de luz.

3.2.3. Técnica de impregnação pela prata

Para a identificação das regiões organizadoras de nucléolos (RONs), foi empregada a técnica de impregnação pela prata descrita por HOWELL and BLACK (1980), com algumas modificações:

1- Sobre uma lâmina preparada conforme a técnica empregada para obtenção dos cromossomos mitóticos ou meióticos, foram “pingadas” três gotas de solução aquosa de gelatina a 2% (acrescida de ácido fórmico na proporção de 1mL para cada 100 ml de solução) e seis gotas de solução aquosa de nitrato de prata a 50%;

2- As lâminas foram cobertas com lamínula e incubada em estufa a 60°C por um período de aproximadamente 5 minutos, dependendo da coloração da lâmina;

3- Após o tempo apropriado, ou quando as lâminas assumiram uma coloração marrom, estas foram lavadas com água destilada, retirando a lamínula com o fluxo da água;

4- Após estarem secas, as lâminas foram analisadas ao microscópio de luz.
Obs.: A técnica sequencial Giemsa-bandamento C-AgRON também foi utilizada.

3.2.4. Coloração com fluorocromos base-específicos

Os fluorocromos GC-específico e AT-específico, cromomicina (CMA₃) e DAPI 4'-6-diamino-2-phenylindole (DAPI), respectivamente, foram empregados de acordo SCHWEIZER (1980), com modificações:

- 1- As lâminas com cromossomos mitóticos ou meióticos foram preparadas com pelo menos 3 dias de antecedência;
- 2- Essas foram tratadas com formamida 70% em 2XSSC (concentração final de 0,6XSSC) a 70°C por 2 minutos;
- 3- 80 µl da solução de cromomicina (CMA₃) (0,3 mg/ml) foram colocados sobre a lâmina contendo os cromossomos mitóticos ou meióticos; a lâmina foi coberta com lamínula e incubada por 1 hora, a temperatura ambiente;
- 4- A lamínula foi retirada e a lâmina lavada em tampão McIlvaine e depois com água de torneira;
- 5- As lâminas foram coradas com 30µl de “Antifading with DAPI” (Vectashield);
- 6- Armazenadas na geladeira;
- 7- Após 5 dias, analisadas com fotomicroscópio de epifluorescência.

3.2.5. Identificação de sítios ribossômicos 18S e 5S

3.2.5.1. Método para extração de DNA de fígado usando Tiocianato de Guanidina

Soluções

Tampão de lise celular

Reagente	Concentração final
NaCl	100 mM
Tris-HCl pH 8.0	100 mM
EDTA pH 8.0	25 mM
SDS (em água ultra-pura)	0,5%

As soluções de NaCl, de Tris e EDTA foram autoclavadas antes de fazer o tampão; posteriormente, a solução tampão foi filtrada em um filtro estéril.

Solução para precipitar proteínas

Reagente	Concentração final
Tiocianato de Guanidina (Guanidine Thiocyanate)	4 M
Tris-HCl pH 7,5	0,1 M

A solução foi aquecida para diluir o tiocianato; logo em seguida foi filtrada com um filtro estéril de nitrato de celulose. Filtros de Polyethersulfone também podem ser usados; contudo, não devem ser usados filtros de acetato de celulose, pois esses se dissolvem.

Outros reagentes

Reagente	Concentração
Proteinase K	20 mg/mL
RNAse	4 mg/mL
Isopropanol (J.T. Baker)	100%
Etanol	70%

Lise Celular e tratamento com RNAse

- 1- Foi colocado um fragmento de fígado com aproximadamente 10 mg, em um tubo de 1,5 mL tipo "Eppendorf"; acrescentou-se 300µl de solução de lise celular. O tecido foi macerado o máximo possível;
- 2- 1,5 µl de proteinase K (20 mg/mL) foram adicionados ao tubo. O tubo foi agitado levemente para misturar a proteinase;
- 3- O tubo contendo os fragmentos de fígado foi incubado por cerca de 3 horas a 57°C, macerando o tecido a cada 30 minutos, até que ele estivesse totalmente dissolvido;
- 4- Após a dissolução do tecido, foram acrescentados 1,5 µl de RNAse (4mg/mL) e o tubo foi incubado a 37°C por 1 hora. Caso, no final da extração ainda tenha RNA, essa etapa pode ser novamente realizada;

5- O tubo foi então centrifugado a 3000 rpm, e o sobrenadante foi transferido para outro tubo de 1,5 mL (tipo “Eppendorf”); o “pellet” foi descartado;

Precipitação de proteínas

6- Foi adicionado 100 µl da solução de precipitação de proteínas, e o tubo foi vertido para que houvesse a mistura;

7- O tubo foi centrifugado a 13000 rpm por 10 minutos;

8- As etapas 6 e 7 foram repetidas para uma melhor purificação do DNA;

9- O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e o “pellet” descartado;

Precipitação do DNA

10- 430 µl de isopropanol 100% foram adicionados ao tubo. O tubo foi “invertido” gentilmente 50 vezes, auxiliando a separação do DNA da solução;

11- O tubo foi centrifugado a 13000 rpm por 10 minutos;

12- O sobrenadante foi descartado cuidadosamente para não retirar o “pellet”;

13- 300 µl de álcool 70% foram adicionados para lavar o “pellet”; nesta etapa o tubo também foi invertido algumas vezes para realizar a lavagem do “pellet”;

14- O tubo foi centrifugado a 13000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado;

15- O tubo foi colocado em uma estufa a 60°C para secar;

16- O DNA ficou eluindo na geladeira por no mínimo 20 horas em 200 µl de água ultra-pura.

3.2.5.2. Protocolo para obtenção da sonda de rDNA 5S

As seqüências de rDNA 5S foram obtidas através de PCR (Polymerase Chain Reaction), utilizando os *primers* A (5'-TACGCCCGATCTCGTCCGATC-3') e B (5'-CAGGCTGGTATGGCCGTAAGC-3'); para as amplificações DNA total de *C. nagelii*, *C. modestus* e *S. insculpta* foi utilizado. Esses *primers* amplificam genes de rDNA 5S e seus espaçadores NTS (Non Transcribed Spacer); esses *primers* foram desenhados a partir da seqüência do rDNA 5S

de *Salmo gardnerii* descrita por KOMIYA and TAKEMURA (1979) e do rDNA 5S (região codificante) de *Salmo Salar* descrita por PENDÁS et al. (1994). A amplificação da região de rDNA 5S foi realizada com um Termociclador-GeneAmp PCR system 2400, Perkin Elmer; e para que a amplificação ocorresse foi preciso usar o mix para PCR: Go Taq® Green Master Mix (Promega – catálogo M7123). As sondas foram obtidas e marcadas por PCR, usando Digoxigenin-11-dUTP-alkali-stable (catálogo - 11093088910 - Roche) ou Biotin-16-dUTP (catálogo - 11093070910 - Roche).

Procedimento para a reação de PCR (rDNA 5S)

Reagentes	Concentração final
Água ultra-pura	q.s.p. 10 µl
Primer A	0,25 µM
Primer B	0,25 µM
Go Taq Green Master Mix	6,25 µl (0,25 mM de cada dNTP)
DNA	100 ng
Volume final	10 µl

Procedimento para a reação de PCR com nucleotídeo marcado

Reagentes	Concentração final
Água ultra-pura	q.s.p. 25 µl
Primer A	0,25 µM
Primer B	0,25 µM
Go Taq Green Master Mix	12,5 µl (0,25 mM de cada dNTP)
dUTP- digoxigenina	0,11 mM (30%) (*0,25 mM)
DNA	200 ng
Volume final	25 µl

*Quando na PCR foi utilizado dUTP – biotina a concentração final deste foi de 0,25 mM (50%).

Programa para a amplificação do rDNA 5S

O programa usado foi: 94°C – 5 minutos; 2 ciclos de 95°C – 1 minuto, 65°C – 30 segundos, 72°C – 45 segundos; 2 ciclos de 95°C – 1 minuto, 63°C – 30 segundos, 72°C – 45 segundos; 2 ciclos de 95°C – 1 minuto, 61°C – 30 segundos, 72°C – 45 segundos; 25 ciclos de 95°C – 1 minuto, 63°C – 30 segundos, 72°C – 45 segundos; extensão final de 72°C – 7 minutos.

Os produtos de PCR foram observados em gel de agarose 1% e forneceram fragmentos de 400 pb (Fig. 9C, no final do item Materiais e Métodos).

3.2.5.3. Protocolo para obtenção da sonda de rDNA 18S

As sondas de rDNA 18S foram obtidas através de PCR (Polymerase Chain Reaction), utilizando os primers NS1 (5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3') e NS8 (5'-TCCGCAGGTTACCTACGGA-3'); as amplificações usaram DNA total de *C. nagelii*. Estes primers foram descritos por WHITE et al. (1990) e amplificam a região SSU (Small Subunit), ou seja, o rDNA 18S nos eucariotos superiores (Figura 8). A amplificação da região de rDNA 18S foi realizada com um Termociclador- GeneAmp PCR system 2400, Perkin Elmer. As sondas foram obtidas e marcadas por PCR, usando Biotin-16-dUTP (catálogo - 11093070910 - Roche).

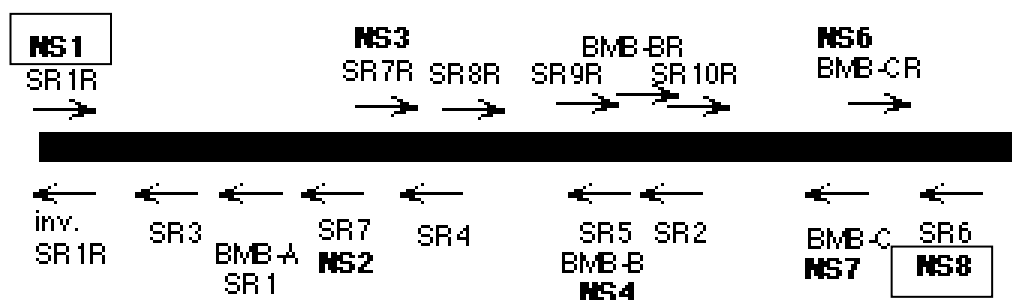


Figura 7- Esquema que mostra a SSU (Small Subunit) do rDNA 45S. As abreviações designam primers existentes na literatura capazes de amplificar esta região. As caixas destacam os *primers* usados no presente trabalho (disponível em DUKE UNIVERSITY – www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm).

Procedimento para a reação de PCR

Reagentes	Concentração final
Água ultra-pura	q.s.p. 25 µl
Tampão da Taq (pht)	1X
MgCl ₂	0,16 mM
dNTP mix	0,05 mM
Primer NS1 (F)	0,1 µM
Primer NS8 (R)	0,1 µM
Taq polimerase (pht)	0,05 U/µl
DNA	200 ng
Volume final	25 µl

Procedimento para a reação de PCR com nucleotídeo marcado

Reagentes	Concentração final
Água ultra-pura	q.s.p. 50 µl
Tampão da Taq (pht)	1X
MgCl ₂	0,16 mM
dATP	0,05 mM
dCTP	0,05 mM
dGTP	0,05 mM
dTTP	0,025 mM (50%)
dUTP- Biotina	0,025 mM (50%)
Primer NS1 (F)	0,1 µM
Primer NS8 (R)	0,1 µM
Taq polimerase (pht)	0,05 U/µl
DNA	200 ng
Volume final	50 µl

Programa para a amplificação do rDNA 18S

O programa usado foi: 25 ciclos de 94 °C – 1 minuto e 30 segundos; 56°C – 1 minuto e 30 segundos, 72°C – 1 minuto e 30 segundos; extensão final de 72°C – 10 minutos.

Os produtos de PCR foram observados em gel de agarose 1% e forneceram fragmentos de 1800 pb (Fig. 9C, no final do item Materiais e Métodos).

3.2.5.4. Procedimento para precipitação das sondas de rDNA 5S ou 18S

Foram acrescentados a cada 50 µl de sonda de rDNA 5S ou 18S, 100 µl de etanol 100% e 5 µl de acetato de sódio 3M -pH 5- (solução de acetato de sódio 3M com o pH 5 = 5,23 g de acetato de sódio, 1240 µl de ácido acético e 18 mL de água destilada). A mistura ficou precipitando por 3 horas no freezer -80°C,

ou por 10 horas na geladeira. Foi centrifugada por 15 minutos a 13000 rpm e o sobrenadante foi descartado cuidadosamente. Acrescentou-se 50 µl de etanol 70% e o tubo foi novamente centrifugado a 13000 rpm, por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o DNA ficou secando em estufa a 60°C, até que não tivesse mais líquido no tubo. A sonda foi eluída em 20 µl de água ultra-pura, esperando no mínimo 10 horas em geladeira antes de usá-la. No caso da sonda de rDNA 18S, devido ao seu tamanho de 1800 pb, ela foi cortada com a enzima DNase. Aos 20 µl de sonda de rDNA 18S foi acrescentado 7 µl de solução de DNase (0,001%), permanecendo a solução por 40 minutos a uma temperatura de 15°C para ativação da enzima, e 10 minutos a 90°C para inativação da enzima. Após a inativação da enzima a sonda foi diretamente usada no *mix* para hibridação.

3.2.6. Microdissecção cromossômica do cromossomo B de *C. nagelii*

Os cromossomos B microdissectados foram obtidos de uma preparação cromossômica de uma fêmea de *C. nagelii* (18576) que continha um B por metáfase. As células para microdissecção foram pingadas sobre lamínulas e os cromossomos foram corados por 7 minutos com Giemsa 5%. A microdissecção foi realizada usando um microscópio Zeiss AXIOvert 100 ao qual estava acoplado um micromanipulador Eppendorf TransferMan NK2. Foram microdissectados 10 cromossomos B, os quais foram imediatamente transferidos para o mix DOP-PCR (*Degenerated Oligonucleotid Primer-Polymerase Chain Reaction*) contendo um conjunto de *primers* 5'CCGACTCGAGNNNNNNATGTGG3'. No desenho dos *primers* cada N pode ser uma base nucleotídica A, T, C ou G, formando dessa maneira, uma combinação de 4096 *primers* diferentes (TELENIUS et al., 1992).

Procedimento para o mix DOP – PCR

Reagente	Concentração final
dNTP mix	0,2 Mm
Primer DOP	2 μ M
Tampão enzima (ThermoSequenase-USB)	1X
Cromossomos microdissectados	--
Água ultra-pura	q.s.p. 10 μ l
Enzima (ThermoSequenase-USB)	10 U (***) acrescentada no final)
Volume final	10 μ l

***O tubo contendo o mix DOP-PCR com os cromossomos microdissectados foi aquecido a 90°C por 10 minutos, e em seguida foi realizado um *spin* no tubo para então serem acrescentadas as 10U de ThermoSequenase.

Programa para a primeira amplificação dos cromossomos microdissectados (RAMP-PCR)

O programa usado foi: 94°C - 3 minutos; 12 ciclos de 94°C - 1 minuto e 30 segundos; 37°C - 2 minutos, aumentando 0.2°C/segundo até 72°C (RAMP), 72°C - 2 minutos; 30 ciclos de 94°C – 1 minuto e 30 segundos, 56°C – 1 minuto, 72°C – 1 minuto e 30 segundos.

O produto da PCR foi observado em gel de agarose 1%, sendo possível visualizar um arraste com fragmentos de tamanhos entre 100 e 400 pb (Fig. 9B, no final do item Materiais e Métodos).

Procedimento para a PCR- *Standard*

Uma parte do produto da RAMP-PCR, sem nenhum processo de purificação, foi submetido a uma PCR *standard* para se ter um estoque da sonda, conforme descrição:

Reagentes (PCR Standard)	Concentração final
Água ultra-pura	q.s.p. 20 µl
Tampão Taq (pht)	1X
MgCl ₂	0,16 mM
dNTP mix	0,08 mM
Primer DOP	1 µM
Enzima Taq polimerase (pht)	0,05 U/µl
Produto da RAMP/PCR	2 µl
Volume final	20 µl

Uma terceira PCR foi realizada a partir da PCR *Standard*, sem nenhuma purificação do produto, para a marcação dos fragmentos que foram utilizados na hibridação *in situ* fluorescente:

Reagentes (PCR marcada)	Concentração final
Água ultra-pura	q.s.p. 50 µl
Tampão Taq (pht)	1X
MgCl ₂	0,16 mM
dATP	0,08 mM
dCTP	0,08 mM
dGTP	0,08 mM
dTTP	0,056 mM (****0,04 mM)
dUTP- digoxigenina	0,024 mM (****0,04 mM)
Primer DOP	1 µM
Enzima Taq (pht)	0,05 U/ µl
Produto da PCR Standard	3 µl
Volume final	50 µl

****Quando foi usado dUTP-biotina, a concentração final foi de 0,04 mM de dTTP (50%) e 0,04 mM de dUTP (50%). A sonda obtida foi então precipitada e eluída conforme está descrito no item 3.2.5.4.

3.2.7. Protocolo para obtenção da sonda de DNA telomérico

As sequências de DNA telomérico foram obtidas com base em IJDO et al. (1991), com algumas modificações. Os primers utilizados foram: Tel 1 (5'TTAGGG3')₆ e Tel 2 (5'CCCTAA3')₆. Conforme descrição dos autores, foi realizada uma PCR sem molde de DNA, utilizando somente os primers, os quais devido a sua complementaridade, serviram de molde para que novas moléculas pudessem ser produzidas. Além disso, foram feitas PCRs usando o DNA extraído de *Cyphocharax nagelii* com os primers isoladamente e em conjunto. Para descartar a possibilidade de contaminação das PCR, foram realizadas PCR somente com um primer de cada vez e obviamente sem nenhum DNA com molde. Os resultados dessas PCR podem ser observados na Figura 9A, no final do item Materiais e Métodos.

Procedimento para as diferentes PCR das sequências de DNA telomérico

PCR com primers Tel 1 e Tel 2

Reagentes	Concentração final
Água ultra-pura	q.s.p. 50 µl
Tampão Taq (pht)	1X
MgCl ₂	0,16 mM
dNTP mix	0,05 mM
Tel 1	1 µM
Tel 2	1 µM
Enzima Taq (pht)	2 Unidades
Volume final	50 µl

PCR marcada com primers Tel 1 e Tel 2

Reagentes	Concentração final
Água ultra-pura	q.s.p. 50 µl
Tampão Taq (pht)	1X
MgCl ₂	0,16 mM
dATP	0,05 mM
dCTP	0,05 mM
dGTP	0,05 mM
dTTP	0,035 mM
dUTP - digoxigenina	0,015 mM
Tel 1	1 µM
Tel 2	1 µM
Enzima Taq (pht)	2 Unidades
Volume final	50 µl

PCR com Tel 1 e molde de DNA

Reagentes	Concentração final
Água ultra-pura	q.s.p. 50 µl
Tampão Taq (pht)	1X
MgCl ₂	0,16 mM
dNTP mix	0,05 mM
Tel 1	1 µM
Enzima Taq (pht)	2 Unidades
DNA	200 ng
Volume final	50 µl

PCR marcada com Tel 1 e molde de DNA

Reagentes	Concentração final
Água ultra-pura	q.s.p. 50 µl
Tampão Taq (pht)	1X
MgCl ₂	0,16 mM
dATP	0,05 mM
dCTP	0,05 mM
dGTP	0,05 mM
dTTP	0,035 mM
dUTP - digoxigenina	0,015 mM
Tel 1	1 µM
DNA	200 ng
Enzima Taq (pht)	2 Unidades
Volume final	50 µl

A PCR utilizando Tel 2 e DNA como molde, foi realizada seguindo o mesmo procedimento descrito acima para PCR usando Tel 1 e DNA como molde.

Programa para amplificação da região telomérica

Com o objetivo de diminuir o tamanho dos fragmentos gerados nas PCR, deixando-os adequados para a hibridação *in situ* fluorescente dos cromossomos, duas estratégias foram utilizadas: o aumento na concentração de primers e a diminuição dos tempos de anelamento e alongação durante as PCR, sendo o ponto de partida para tais alterações as determinações dos autores IJDO et al. (1991). O programa descrito pelos referidos autores também foi utilizado. Entretanto, as sondas produzidas e utilizadas seguiram o programa alterado. Este resultou em: 10 ciclos de 94°C - 1 minuto, 55°C - 10 segundos, 72°C - 30 segundos; 30 ciclos de 94°C - 1 minuto, 60°C - 10 segundos, 72°C - 45 segundos; extensão final de 72°C - 1 minuto.

O produto da PCR foi observado em gel de agarose 1%, sendo possível visualizar fragmentos de diferentes tamanhos, conforme Fig. 9A.

A precipitação e a eluição da sonda de DNA telomérico seguiu o protocolo descrito no item 3.2.5.4.

3.2.8. Protocolo para hibridação *in situ* fluorescente

Foram testados três protocolos diferentes para hibridação *in situ* fluorescente e aquele que permitiu os melhores resultados, está descrito detalhadamente. Este protocolo foi baseado inicialmente em PINKEL et al. (1986).

Tratamento com RNase

- 1- As lâminas foram lavadas em tampão PBS 1X durante 5 minutos, em temperatura ambiente e com agitação (*shaker*);
- 2- Foram desidratadas em série alcoólica 70, 85 e 100%, por 5 minutos em cada concentração, deixando-as secar;
- 3- As lâminas foram incubadas em 100 µl de RNase (concentração final = 0,05 mg/mL diluída em 2XSSC), por 1 hora em câmara úmida a 37°C;
- 4- Foram lavadas 3 vezes por 5 minutos cada em 2XSSC (*shaker*);
- 5- Lavadas em tampão PBS 1X por 5 minutos (*shaker*).

Tratamento com pepsina

- 6- Incubadas em solução de pepsina 0,005% por 10 min a 37°C;
- 7- Lavadas em PBS 1X por 5 minutos (*shaker*).

Fixação

- 8- Fixadas em formaldeído 1% durante 10 minutos;
- 9- Lavadas em PBS 1X por 5 minutos (*shaker*);
- 10- Desidratadas em série alcoólica 70, 85 e 100%, por 5 minutos em cada, deixar secar.

Hibridação

- 11- Os cromossomos foram desnaturados em uma solução de formamida 70% e SSC (concentração final = 0,6XSSC) a 70°C, por 3 minutos e 20 segundos;
- 10- Desidratadas com série alcoólica gelada a 70, 85 e 100%, por 5 minutos em cada, deixar secar. Durante esta etapa o mix de hibridação contendo a sonda foi colocado a 100°C por 10 minutos, para desnaturar o DNA. Decorrido este tempo, o tubo permaneceu no gelo. O mix de hibridação foi preparado durante a incubação das lâminas em RNase;

12- Após as lâminas estarem secas, foram acrescentados 100 µl do mix de hibridação em cada uma, e as mesmas foram cobertas com lamínulas e permaneceram hibridando por no mínimo 16 horas a 37°C em câmara úmida.

Lavagens pós-hibridação

13- As lamínulas foram retiradas e as lâminas foram lavadas por 2 vezes em uma solução de formamida 15% e 0,2XSSC a 42°C, durante 10 minutos cada (*shaker*);

14- Lavadas por 3 vezes em uma solução de 0,1XSSC a 60°C por 5 minutos cada (*shaker*);

15- Lavadas 1 vez por 5 minutos em solução de Tween 0,5% e 4XSSC (*shaker*).

Pré-tratamento com tampão de bloqueio, para posterior utilização de anticorpos fluorescentes

16- As lâminas foram incubadas em tampão de bloqueio 5% NFDM (*No Fat Drink Milk*) e 4XSSC por 15 minutos. Alíquotas deste tampão foram armazenadas para posterior diluição dos anticorpos fluorescentes;

17- Lavadas 2 vezes, por 5 minutos cada, em solução de Tween 0,5% e 4XSSC (*shaker*).

Detecção das sondas hibridadas

18- As lâminas foram incubadas com 100 µl de FITC-*Fluorescein isothiocyanate* (concentração final 0,01 ng em NFDM), durante 30 minutos em câmara úmida, a temperatura ambiente, quando a sonda estava marcada com dUTP – biotina; quando a sonda estava marcada com dUTP – digoxigenina, a detecção foi feita com anti-digoxigenina-rodamina em NFDM, durante 1 hora em câmara úmida, a temperatura ambiente. No caso do *double-fish* com sondas de rDNA 5S e 18S marcadas com dUTP-biotina e dUTP-digoxigenina os anticorpos foram acrescentados em conjunto ao NFDM;

19- Lavadas 3 vezes, por 5 minutos cada, em solução de Tween 0,5% e 4XSSC (*shaker*);

20- Desidratadas com série alcoólica gelada a 70, 85 e 100%, por 5 minutos em cada;

21- Após estarem secas, foram colocados 30 µl de *Antifading with DAPI* (Vectashield) sobre cada lâmina, e em seguida as mesmas foram cobertas com lamínula.

Preparação da solução (mix) de hibridação com estringência de 77%

Reagentes	Concentração final
Formamida	50%
Sulfato dextrano	10%
SSC	2XSSC
Sonda	400 ng (para quatro lâminas)*
Água ultra-pura	q.s.p. para o volume final, se necessário

* Quando foram utilizadas duas sondas, ou seja, o double-fish de rDNA 5S e 18S, foram utilizados aproximadamente 300 ng de cada sonda no preparo do mix de hibridação.

Preparo da solução de pepsina, da solução de formaldeído e do tampão PBS**Solução de pepsina**

- 99 mL de água destilada
- 1 mL de HCl 1M
- 50µl de pepsina 10%

Solução de formaldeído

- 10 mL de PBX 10X
- 5 mL de MgCl₂ 1M
- 1 mL de formaldeído
- 84 mL de água destilada

Solução tampão PBS (Phosphate Buffered Saline) 10X

- NaCl – concentração final 1,37M
- Na₂HPO₄ – concentração final 70mM
- NaH₂PO₄ – concentração final 30mM
- água destilada para q.s.p. 1000 mL, e autoclavar.

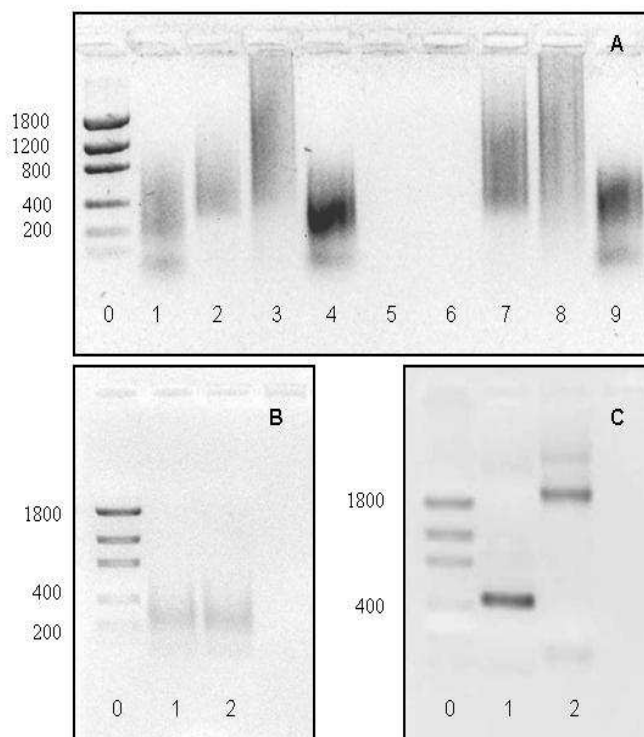


Figura 8- **A.** Gel de agarose 1% mostrando diversos testes realizados com *primers* para amplificação de DNA telomérico. A coluna da esquerda mostra em pares de base os tamanhos das bandas do *Low mass ladder*, o qual tem suas bandas observadas na coluna 0. Os produtos de PCR vistos nas colunas 1, 2, 3 e 4 seguiram o programa para amplificação da região telomérica descrito abaixo; aqueles observados nas colunas 7, 8 e 9 foram obtidos com o programa definido pelos autores IJDO et al (1991). As colunas 5 e 6, utilizadas como controle, mostram ausência de amplificação de DNA e conseqüentemente de contaminação nas demais PCR. Quanto às propriedades de cada PCR: a coluna 1 corresponde a uma PCR utilizando somente os primers Tel 1 e Tel 2; na coluna 2 é uma PCR usando o primer Tel 1 + DNA total e na coluna 3 é uma PCR usando o primer Tel 2 + DNA total (DNA total de *C. nagelii* como molde); na coluna 4 o produto é de uma PCR usando Tel 1 + Tel 2 + DNA total. Nas colunas 7, 8 e 9, as PCR foram realizadas conforme descrição das PCR das colunas 2, 3 e 4, respectivamente. **B.** Gel de agarose 1% mostrando o produto da PCR do cromossomo B microdissectado de *C. nagelii* (colunas 1 e 2). **C.** Produto de PCR visto em gel

de agarose 1%. Na coluna 1, está uma banda de 400 pb correspondente ao rDNA 5S; na coluna 2, uma banda de 1800 pb de rDNA18S.

4. Resultados

As análises das células metafásicas mitóticas de *C. nagelii*, *C. modestus* e de *S. insculpta* mostraram que o número diplóide de cromossomos para as três espécies é de $2n=54$, com cromossomos meta- e submetacêntricos; intraespecificamente não foram observados cromossomos heteromórficos entre os cariótipos de machos e fêmeas, os quais pudessem ser relacionados à presença de cromossomos sexuais diferenciados (Fig. 9). Os resultados somáticos obtidos para *C. nagelii*, *C. modestus* e *S. insculpta*, foram obtidos a partir da análise de 1816, 520 e 800 metáfases mitóticas, respectivamente. Em *C. nagelii*, foi observada a presença de cromossomos adicionais em alguns indivíduos, os quais foram os menores cromossomos metacêntricos do complemento. Esses cromossomos mostraram variação interindividual de 1 a 4 elementos (Figs. 10; 11; 15A); a variação intraindividual, obtida através da observação desses elementos na contagem das células analisadas de cada indivíduo, foi numericamente ínfima, conforme mostra a Tabela 2. Entre o total de indivíduos de *C. nagelii* estudados, 28 apresentaram cromossomo B. Destes espécimens, 19 (13 machos, 6 fêmeas) mostraram um cromossomo B na maioria das células analisadas; 7 (5 machos, 2 fêmeas) evidenciaram dois cromossomos B; 1 (macho) tinha três cromossomos B; e, 1 (macho) possuía quatro cromossomos B (Tabela 2). A frequência de indivíduos com um cromossomo B foi maior do que a frequência de indivíduos com dois B e, significativamente maior que a frequência de indivíduos com três ou quatro cromossomos Bs. Em *C. nagelii*, das 1816 células somáticas, 716 células pertenciam aos 28 indivíduos portadores de B (Tabela 2).

As frequências dos cromossomos B durante quatro períodos de tempo, em três anos de coleta, foram estatisticamente iguais (Tabela 3). O teste estatístico foi: (p) Kruskal-Wallis= 0,3687 (graus de liberdade= 3; H= 3,1522). A probabilidade $p=0,3687$ é maior que a probabilidade base do teste $p= 0,05$, assim, não há diferença estatística significativa entre as frequências dos cromossomos B, entre as diferentes coletas. As amostras não tinham quantidades suficientes de indivíduos fêmeas e machos, para que se pudesse testar as frequências dos elementos adicionais nos sexos separadamente

(teste estatístico realizado pelo Prof. Dr. José Silvio Govone – UNESP- Rio Claro).

As células meióticas testiculares de *C. nagelii*, de três indivíduos portadores de cromossomos B nas células somáticas, mostraram a fórmula meiótica $2n=27II$ nas metáfases I (Figs. 12A-C; 13A, C; 14A, C e E) e número haplóide $n=27$ nas metáfases II (Figs. 12D; 13E, G). Ao todo foram analisadas 4 metáfases espermatogoniais, 46 metáfases I e 10 metáfases II dos três indivíduos machos. Nas metáfases I foi possível observar até três bivalentes formando um quiasma intersticial (Fig. 14C) e até seis bivalentes com dois quiasmas terminais (Figs. 12B; 14A). Nas metáfases I de dois indivíduos portadores de 1 cromossomo B nas células somáticas, este elemento foi observado como univalente (Fig. 12A-B); nas metáfases I de um indivíduo portador de 2 cromossomos B nas células renais, estes elementos apareciam como dois univalentes (Figs. 12C; 13A, C). Em algumas células metafásicas I o cromossomo B univalente apresentou heteropicnose negativa em relação aos demais bivalentes regulares (Figs. 12A, C; 13C). Cromossomos B não puderam ser identificados nas células metafásicas II, talvez porque não fosse possível diferenciá-los dos demais cromossomos nessa fase, ou porque não estavam presentes nas células analisadas (Figs. 12D; 13E, G).

O estudo das células meióticas de uma fêmea de *C. nagelii* portadora de 1 cromossomo B nas células renais (Fig. 15A), mostrou a presença desse elemento nas fases de metáfase oogonial (Figs. 15B-C), paquíteno (Fig. 15D) e metáfase I (Figs. 16A-C); na única metáfase II obtida, não foi possível determinar o número haplóide, pois parte dos cromossomos apresentou cromátides irmãs em fase inicial de segregação e conseqüentemente, não foi possível diferenciar o cromossomo B dos autossomos (Fig. 16F). Este elemento também apresentou diferenciação quanto a coloração, sendo possível observá-lo heteropicnótico positivo (Fig. 16A, C) ou heteropicnótico negativo (Fig. 16B) nas metáfases I. Na figura 16D o cromossomo B pode ser facilmente individualizado, contudo, há uma dúvida quanto a fase de divisão celular em que essa célula se encontrava. Os cromossomos da figura 16D poderiam estar na fase de metáfase I ou representariam um conjunto parcial de uma metáfase oogonial. Devido a qualidade das células meióticas oogoniais, outras avaliações dessas células não foram viáveis, inclusive no que se refere

à identificação do cromossomo B nas figuras 16E-F, a qual não foi possível. Os resultados cromossômicos desta fêmea foram baseados em 3 metáfases oogoniais, 1 conjunto de elementos paquitênicos, 7 metáfases I e 1 metáfase II.

A comparação entre células espermatogoniais e oogonias de *C. nagelii*, na busca de diferenças, como por exemplo, de emparelhamento dos cromossomos regulares, que estivessem relacionadas a possíveis cromossomos sexuais, não foi conclusiva. Esta comparação não foi exequível, considerando as poucas células oogoniais obtidas e a qualidade destas células, principalmente com relação às várias sobreposições e à falta de definição morfológica dos bivalentes. É apropriado ressaltar que no presente trabalho as preparações cromossômicas de tecido gonadal foram obtidas somente de *C. nagelii*.

4.1.Regões heterocromáticas por bandamento C

Após a aplicação da técnica de bandamento C foi possível distinguir pequenas regiões mais fortemente marcadas nos cromossomos de *C. nagelii*, *C. modestus* e *S. insculpta*. Estas regiões foram então consideradas como correspondentes àquelas de heterocromatina constitutiva (Figs. 9B, D, F; 10B).

Em *C. nagelii*, a região pericentromérica de todos os cromossomos regulares do complemento mostrou ser banda C positiva; em algumas metáfases, bandas C teloméricas adicionais foram observadas e em ambos os braços dos cromossomos do par 6 (Fig. 9B) e em um dos braços dos cromossomos do par 1. Os cromossomos B de *C. nagelii*, após a técnica de bandamento C, mostraram-se heterocromáticos (Figs. 10B; 11B, D; F; H).

Heterocromatina constitutiva foi observada na região pericentromérica de todos os cromossomos de *C. modestus* e de *S. insculpta*. Além disso, bandas C adicionais foram observadas na região telomérica em um dos braços dos cromossomos do par 2 de *C. modestus* (Fig. 9D), e na região telomérica, também em um dos braços, dos cromossomos dos pares 7 e 16 de *S. insculpta* (Fig. 9F). As regiões heterocromáticas nas três espécies estudadas são relativamente pequenas; assim, em alguns cromossomos e em algumas

metáfases não foi possível visualizar tais regiões após a captura das imagens no fotomicroscópio.

Nas células meióticas espermatogoniais de *C. nagelii* submetidas à técnica de bandamento C foi possível destacar as regiões centroméricas dos cromossomos do complemento regular e regiões não centroméricas adicionais (Figs. 13B, D; 14B, D, F). Essas regiões heterocromáticas adicionais poderiam ser aquelas observadas nas metáfases mitóticas nos pares 1 e 6 (Figs. 14B, D, F). O bandamento C das células meióticas portadoras de cromossomos B mostraram estes elementos como sendo heterocromáticos, assim como nas metáfases mitóticas (Figs. 13B, D). Nas células em meiose II foi possível visualizar alguns blocos heterocromáticos na região centromérica dos cromossomos, sem que fosse possível distinguir o cromossomo B (Figs. 13F-H). Nas células meióticas de fêmea analisadas, não foram obtidos resultados relacionados a heterocromatina.

4.2. Região Organizadora de Nucléolo (RON) por impregnação pela prata

A impregnação por nitrato de prata mostrou marcação correspondente a região de rDNA 45S nas três espécies analisadas. Em *C. nagelii*, a marcação pela prata ocorreu na porção telomérica de um dos braços dos cromossomos metacêntricos do par 6 (Figs. 9A; 10); em *C. modestus* na porção telomérica de um dos braços dos cromossomos metacêntricos do par 2 (Fig. 9C); em *S. insculpta*, na região telomérica de um dos braços dos cromossomos metacêntricos do par 7 (Fig. 9E). Os núcleos interfásicos mostraram de 1 a 2 nucléolos nas três espécies estudadas. Este resultado já era esperado, considerando que já se sabe que estas regiões podem aparecer dissociadas. O nitrato de prata também impregnou regiões marcadas com o bandamento C, também para as três espécies analisadas. A impregnação pelo íon da prata não evidenciou RON nos cromossomos meióticos. Os cromossomos B de *C. nagelii* não foram impregnados pela prata.

4.3. Regiões ricas em bases AT ou CG por fluorocromos base-específicos

Em *C. nagelii*, *C. modestus* e *S. insculpta*, o fluorocromo AT específico DAPI não evidenciou região cromossômica específica (Figs. 17A, C, E). Em contrapartida, o fluorocromo GC específico CMA₃ evidenciou as regiões teloméricas que provavelmente coincidem com aquelas de AgRON, nas três espécies analisadas (Figs. 17B, D, F). Em algumas metáfases, essas regiões, nas três espécies, mostraram-se DAPI negativas. Assim, as regiões de rDNA 45S respondem positivamente a CMA₃ e negativamente ao DAPI. Os cromossomos B de *C. nagelii* não foram marcados diferencialmente pelo DAPI ou CMA₃ (Figs. 17A-B). Nas metáfases I de *C. nagelii* submetidas à coloração com esses fluorocromos não foi possível destacar nenhuma região específica dos bivalentes (Fig. 18A-B). O uso dos fluorocromos nas células espermatogonias de *C. nagelii* tinha o objetivo de identificar possíveis particularidades do cromossomo B no tecido gonadal. Infelizmente as preparações cromossômicas continham poucas células susceptíveis à análise, e nestas poucas células o cromossomo B não foi localizado.

4.4. Sítios de rDNA 5S e 18S

A hibridação *in situ* fluorescente com sondas de rDNA 5S mostrou dois pares cromossômicos portadores dessas seqüências em *C. nagelii* e em *C. modestus* (Figs. 19A-B; 20B, D) ; em contrapartida, somente um par de cromossomos é portador de rDNA 5S em *S. insculpta* (Figs. 19C; 20C). Em *C. nagelii* e em *C. modestus*, os sítios de rDNA 5S estão localizados na região proximal de um dos braços cromossômicos dos pares 3 e 20 (Figs. 19A-B). Em *S. insculpta* somente o par 3 mostrou sinal de hibridação com rDNA 5S (Fig. 19C) também na região proximal de um dos braços cromossômicos e o sinal, na maioria das metáfases, parece ser maior do que aquele observado em *C. nagelii* ou em *C. modestus* (Fig. 20)

A seqüência de rDNA 18S , após hibridação *in situ* fluorescente, mostrou homologia com apenas um par de cromossomos nas três espécies analisadas. Essas regiões foram coincidentes com aquelas marcadas pelo íon prata e pela

cromomicina , ou seja, região telomérica dos cromossomos dos pares 6, 2 e 7 de *C. nagelii*, *C. modestus* e *S. insculpta*, respectivamente (Fig. 19)

A utilização simultânea de sondas de rDNA 5S e 18S aplicadas com a técnica de *double-fish*, mostrou que essas seqüências não estão em sintonia nas três espécies analisadas. Células meióticas não foram submetidas a hibridação *in situ* fluorescente com sondas de DNA ribossômico.

Os cromossomos B de *C. nagelii* não mostraram homologia com as sondas de rDNA 5S ou 18S. Na figura 21 foram dispostos os pares cromossômicos portadores de sítios de rDNA 18S e com regiões positivas para bandamento C, AgRON e cromomicina, das três espécies estudadas no presente trabalho. Aparentemente os sítios de rDNA 18S coincidem exatamente com as regiões destacadas com as outras técnicas.

4.5. Microdissecção do cromossomo B de *Cyphocharax nagelii*

A hibridação *in situ* fluorescente, utilizando o cromossomo B microdissectado da fêmea de *C. nagelii* como sonda, foi realizada nas células metafásicas da própria doadora e em indivíduos com dois (18624 macho), três (17941 macho) e quatro (17913 macho) cromossomos B por célula, respectivamente (Tabela 2). Nas metáfases dos quatro espécimens os cromossomos B foram hibridados (Fig. 22). Porém, nenhum outro cromossomo do complemento A mostrou sinal positivo de hibridação.

A busca por seqüências homólogas do cromossomo B de *C. nagelii* em *C. modestus* (Fig. 23B) e em *S. insculpta* (Fig. 23D) não forneceu resultado positivo, pois nenhum sinal de hibridação foi observado. Neste caso, para validar o experimento, as hibridações foram feitas simultaneamente nas três espécies do presente estudo e a marcação ocorreu somente no cromossomo B de *C. nagelii* (Fig. 23A, C).

4.6. Hibridação *in situ* com sonda de DNA telomérico em *Cyphocharax nagelii*

A utilização de sondas de DNA telomérico em indivíduos de *C. nagelii*, portadores de um cromossomo B por célula metafásica, permitiu identificar marcações teloméricas em todos os cromossomos regulares do complemento; além disso, os cromossomos B também apresentaram marcações teloméricas (Fig. 24). Em algumas metáfases houve marcação telomérica somente em um dos braços dos cromossomos regulares; assim também ocorreu com os cromossomos B, que em algumas metáfases apresentaram claramente os dois braços com telômeros marcados (Fig. 24B) e em outras, apenas uma região telomérica mostrou sinal de hibridação (Fig. 24D). Sinais de hibridação também foram observados próximos a região centromérica dos cromossomos do par 1 e de pelo menos outro par de autossomos (Fig. 24B, D, F). O resultado da hibridação *in situ* fluorescente utilizando os dois tipos de sondas produzidas, ou seja, produzidas somente com os primers Tel 1 e Tel 2 ou com Tel 1 e molde de DNA, foi idêntico. Dessa maneira, seria necessária a aquisição de somente um dos primers para a obtenção das sondas teloméricas.

Indivíduos analisados	Número de cromossomos Bs					Total de células
	0	1	2	3	4	
16859 (m)	1	43				44
16890 (m)	7	120				127
16915 (m)	2	13				15
16929 (m)	4	28				32
16952 (m)		24	2			26
16998 (f)		17	1			18
17024 (m)	1	14				15
17582 (m)		6				6
17588 (f)	3	15	2			20
17808 (f)		14				14
17903 (m)	5	38				43
18576 (f)	3	20	3			26
18577 (f)	5	16				21
18589 (m)	2	12				14
18590 (m)		6				6
18623 (m)	1	19				20
18638 (m)	2	8				10
18641 (m)	4	18				22
18642 (f)		17	1			18
16864 (m)		5	35			40
16922 (m)		3	10			13
16975 (f)		1	13			14
18583 (m)			3			3
18610 (f)	6	2	19			27
18624 (m)	1	4	23			28
18626 (m)		1	4			5
17941 (m)			6	41		47
17913 (m)			2		40	42
Total geral de células analisadas	--	--	--	--	--	716

Tabela 2- Frequência intraindividual de células portadoras de cromossomos B em espécimens de *Cyphocharax nagelii*. f=fêmea; m=macho.

Período de coleta	0B		1B		2B		3B		4B		Total	Frequência de cromossomos B
	f	m	f	m	f	M	f	m	f	m		
Jan/2006	6	9	1	6	1	2	-	-	-	-	25	0,52
Nov/2006	4	9	1	1	-	-	-	-	-	-	15	0,13
Mar/2007	2	7	1	1	-	-	-	1	-	1	13	0,69
Mar/2008	9	9	3	5	1	3	-	-	-	-	30	0,53
Total em cada classe	21	34	6	13	2	5	-	1	-	1	83	0,48

Tabela 3- Frequências de cromossomos B na população de *Cyphocharax nagelii* em quatro períodos de tempo, em três anos. f=fêmea; m=macho.

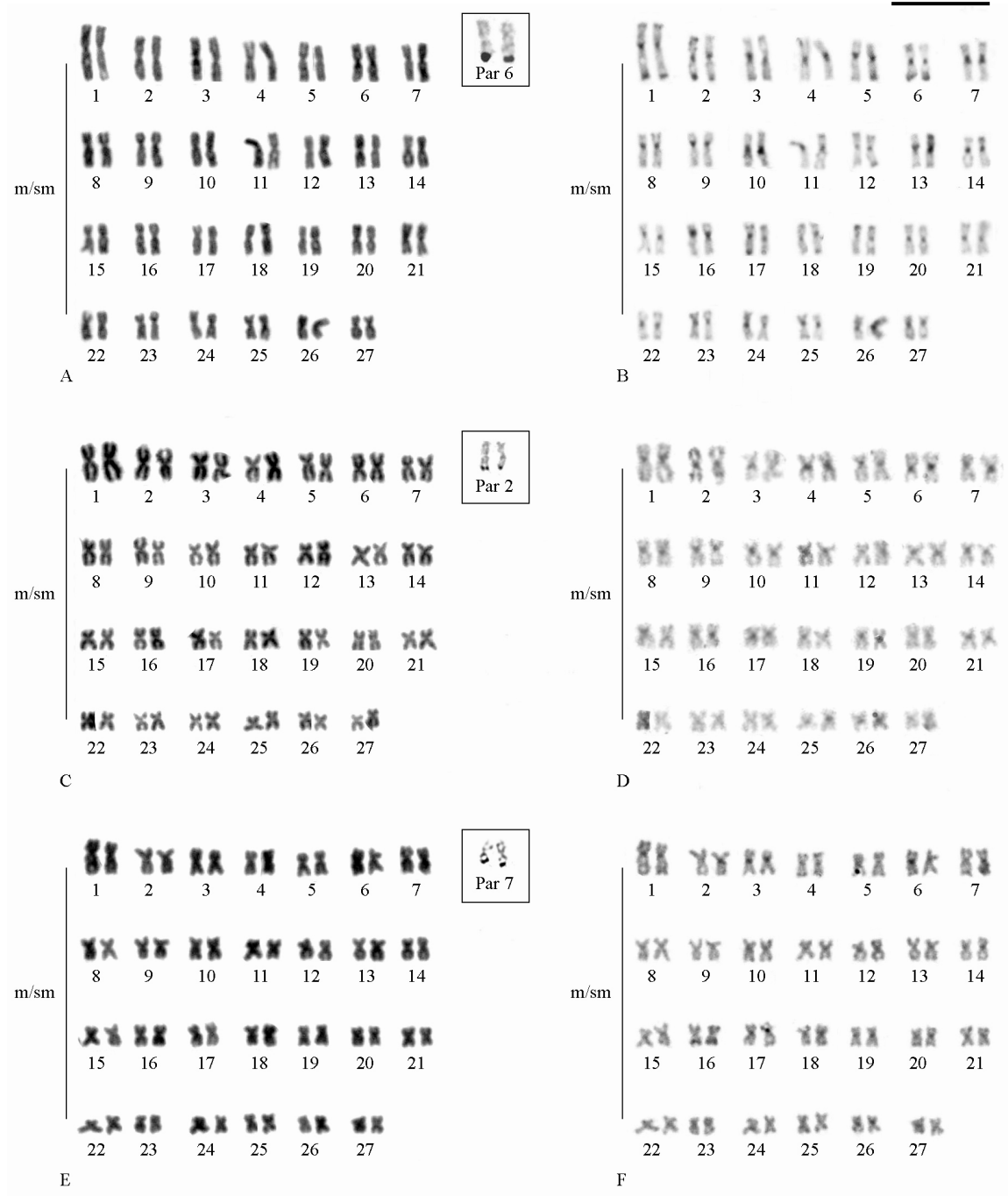


Figura 9- Cariótipos com $2n=54$ cromossomos meta- e submetacêntricos (m/sm), em coloração seqüencial Giemsa-bandamento C. **A e B.** *Cyphocharax nagelii*. **C e D.** *Cyphocharax modestus*. **E e F.** *Steindachnerina insculpta*. Os pares em destaque são aqueles portadores de AgRON. Barra = 5µm.

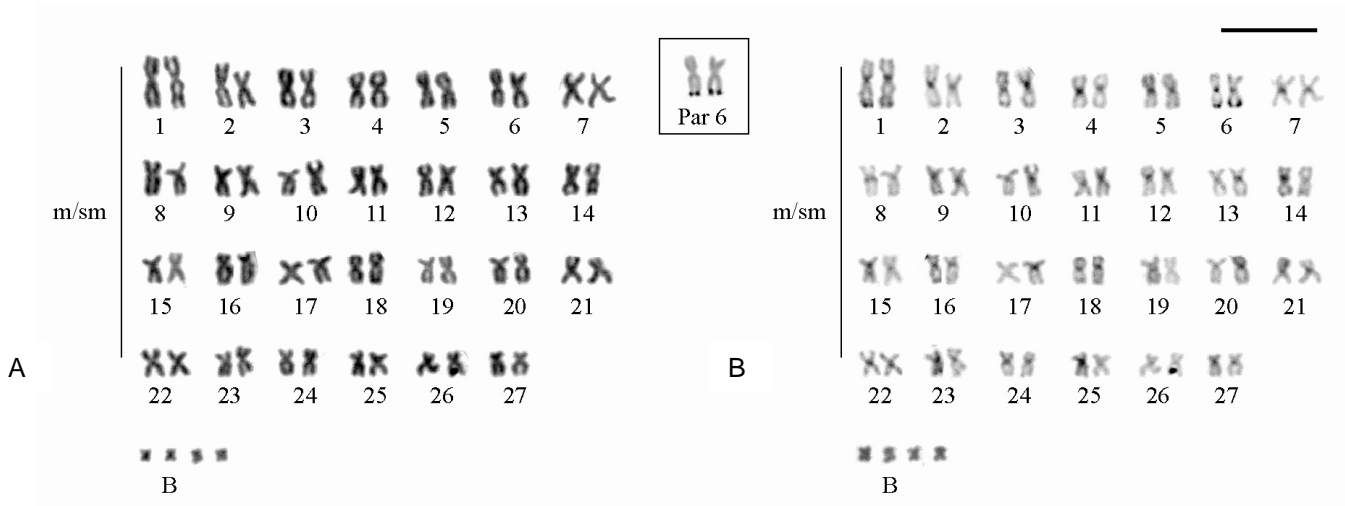


Figura 10- Cariótipo de *Cyphocharax nagelii* com $2n=54 + 4$ cromossomos B, meta- submetacêntricos (m/sm). **A.** Cromossomos corados com Giemsa. **B.** A mesma metafase vista em A, submetida a bandamento C. Em destaque o par portador de AgRON. Barra = $5\mu\text{m}$.

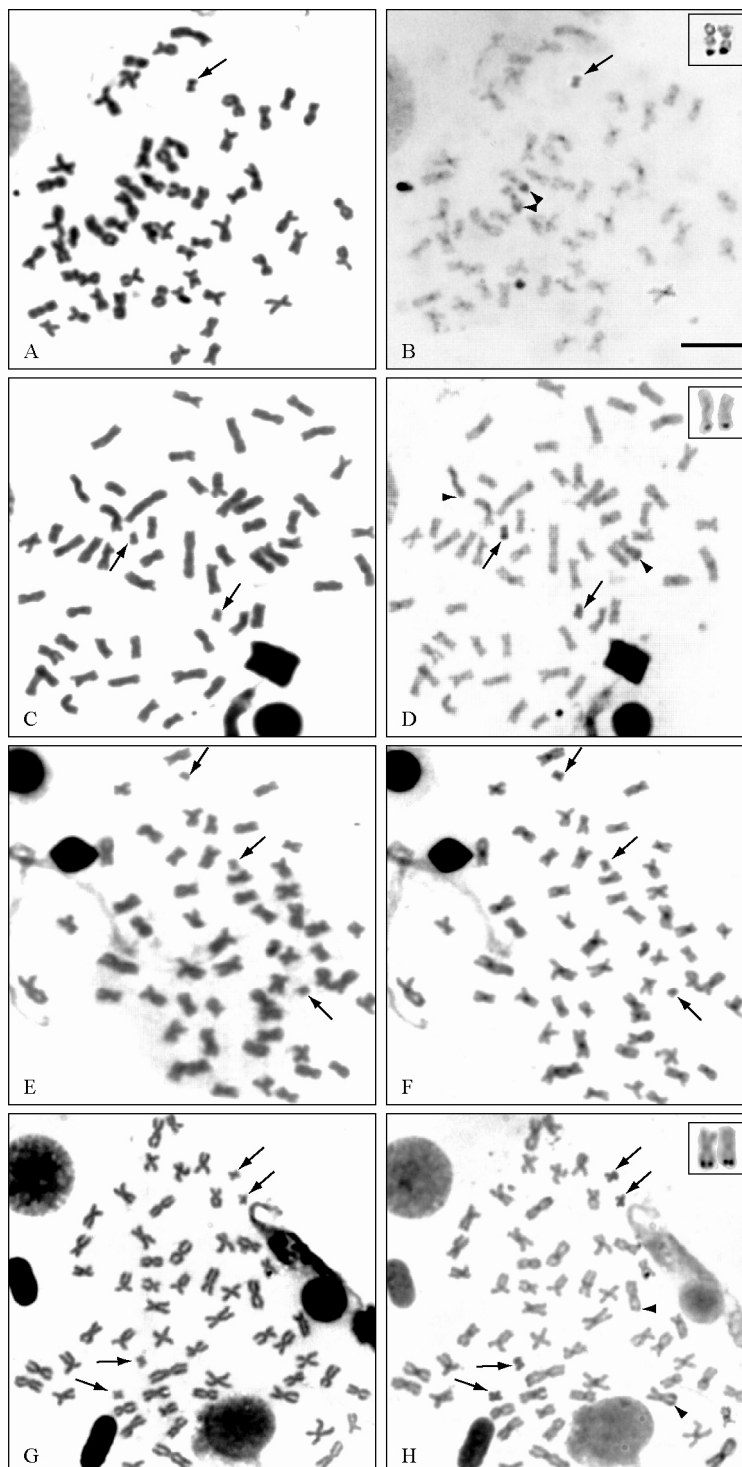


Figura 11- Metáfases mitóticas de quatro espécimens de *Cyphocharax nagelii*, em coloração sequencial Giemsa-bandamento C-AgRON, portadoras de cromossomos B heterocromáticos. **A e B.** Indivíduo fêmea com $2n=54+1B$. **C e D.** Especimen fêmea com $2n=54+2B$. **E e F.** Indivíduo macho com $2n=54+3B$. **G e H.** Especimen macho com $2n=54+4B$. Em destaque cromossomos do par 6 portadores de AgRON. As setas indicam os cromossomos B e as cabeças de seta apontam os cromossomos portadores de AgRON. Barra = $5\mu\text{m}$.

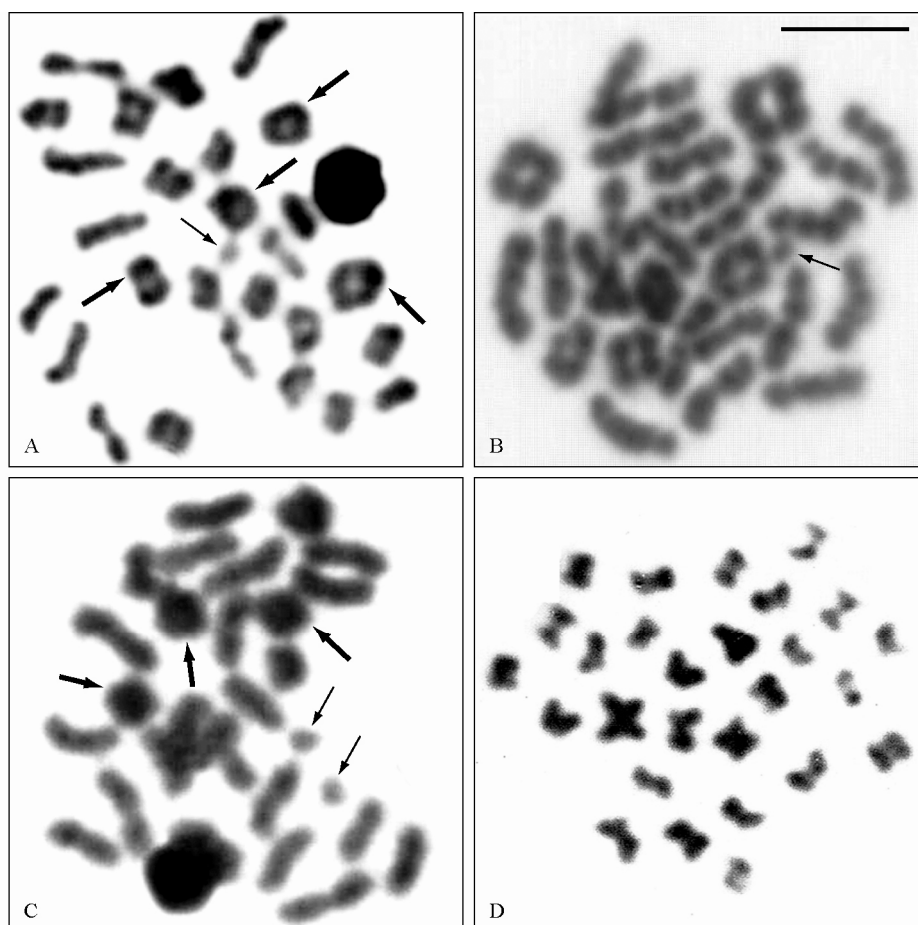


Figura 12- Células meióticas de macho de *Cyphocharax nagelii* portador de cromossomo B (seta estreita), coradas com Giemsa. **A, B e C.** Metáfases I com 27II + 1B (A e B) e com 27II + 2B (C). **D.** Metáfase II com 27 cromossomos, sem a presença do cromossomo B. Setas largas indicam bivalentes com quiasmas terminais. Barra = 5 μ m.

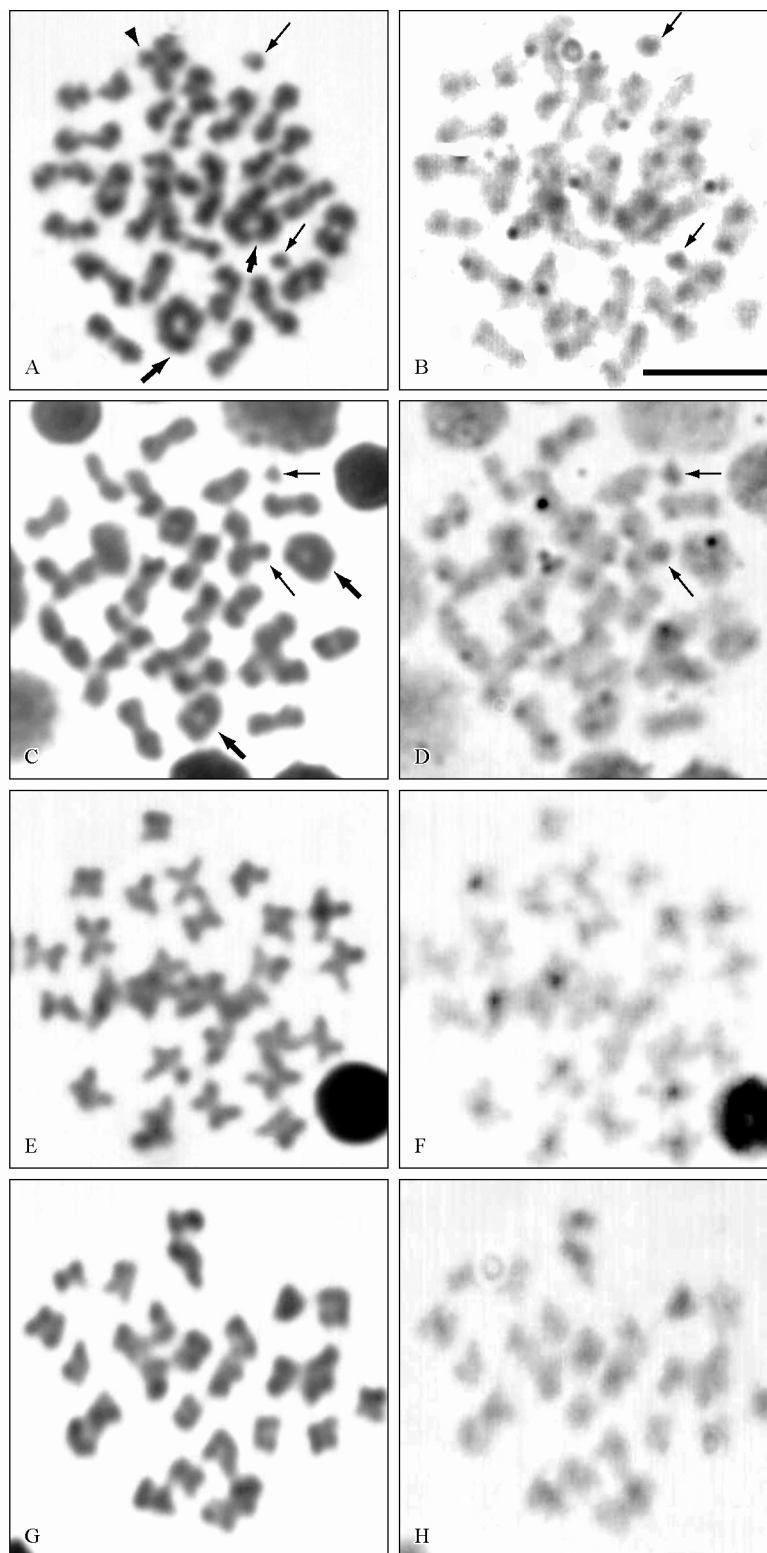


Figura 13- Coloração sequencial Giemsa-bandamento C em células meióticas de macho de *Cyphocharax nagelii*, portador de cromossomos B. **A e C.** Metáfases I com 27II + 2B (seta estreita), coradas com Giemsa. **B e D.** As mesmas metáfases vistas em A e C após bandamento C, mostrando os cromossomos B heterocromáticos. **E e G.** Metáfases II em coloração Giemsa, com 27 cromossomos. **F e H.** As mesmas metáfases vistas em E e G, após bandamento C, sem nenhuma evidência do cromossomo B. Setas largas mostram bivalentes com quiasmas terminais, e cabeça de seta bivalente com quiasma intersticial. Barra = 5µm.

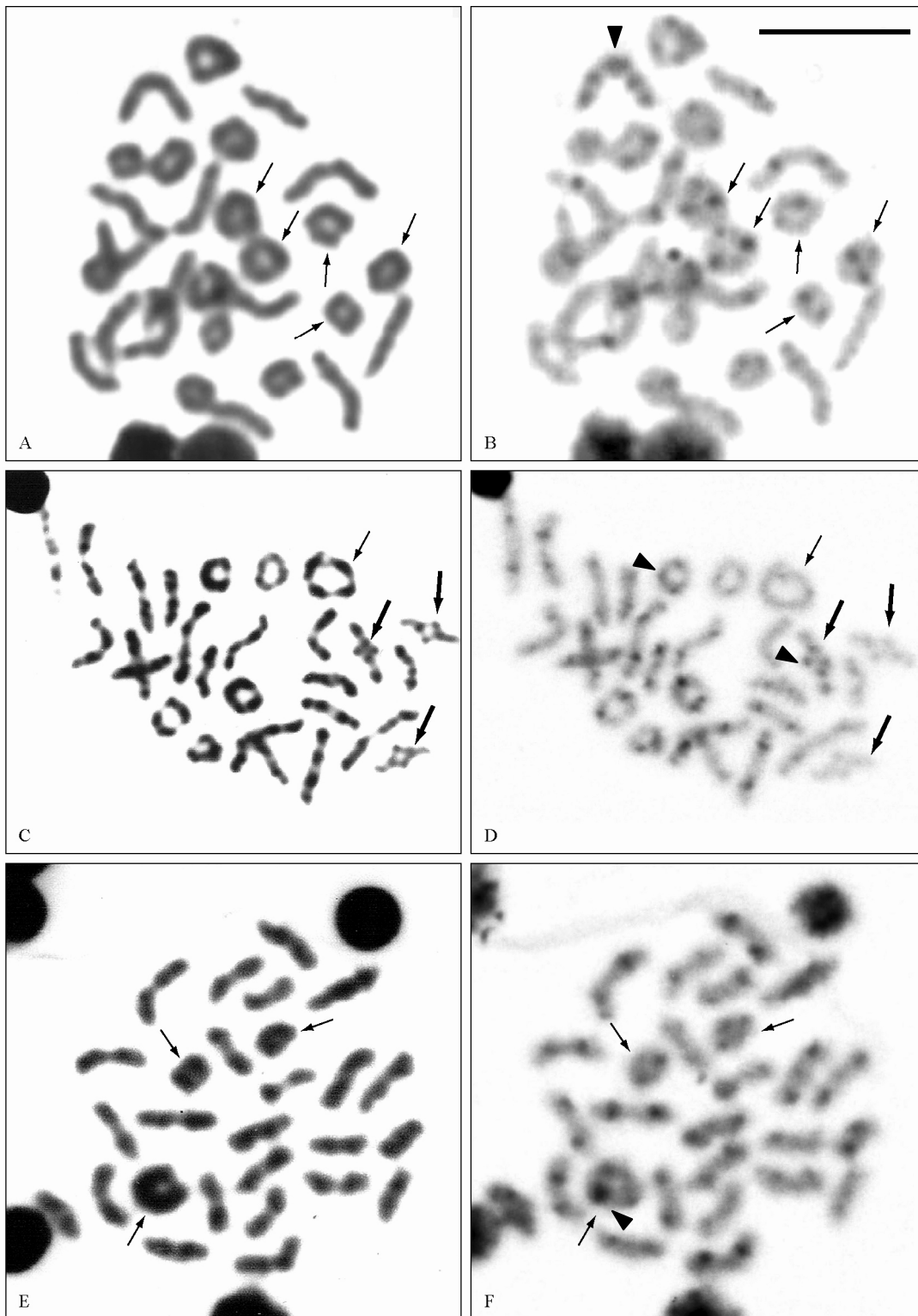


Figura 14- Metáfases I com 27 bivalentes de *Cyphocharax nagelii* macho portador de cromossomos B, sem evidência desses elementos. **A, C e E.** Coloração convencional Giemsa. **B, D e F.** As mesmas metáfases vistas em A, C e E, após bandamento C. Setas largas indicam bivalentes com quiasma intersticial, setas estreitas mostram bivalentes com quiasmas terminais e cabeças de seta indicam bandas C adicionais. Barra = 5 μ m.

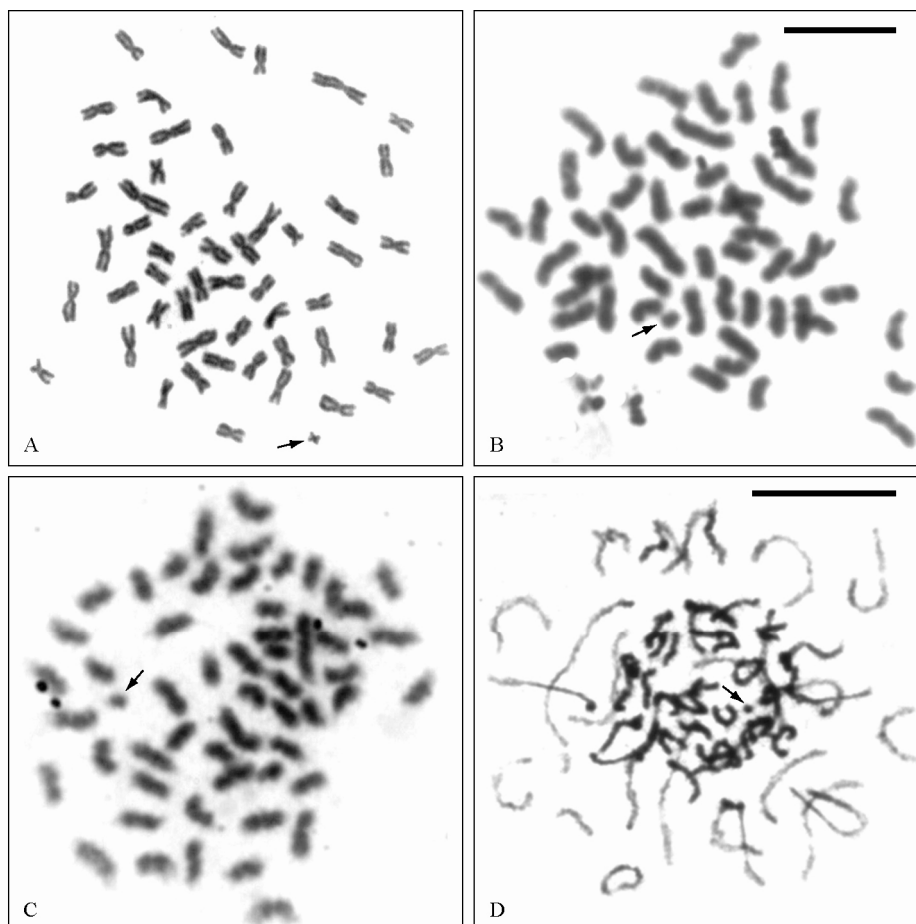


Figura 15- Células de um exemplar fêmea de *Cyphocharax nagelii* portadora de 1 cromossomo B, coradas com Giemsa. **A.** Metáfases somática com $2n=54 + 1B$ (seta). **B e C.** Metáfases oogoniais com $2n=54 + 1B$ (seta). **D.** Elementos paquítenicos mostrando um cromossomo B (seta). Barra = $5\mu\text{m}$.

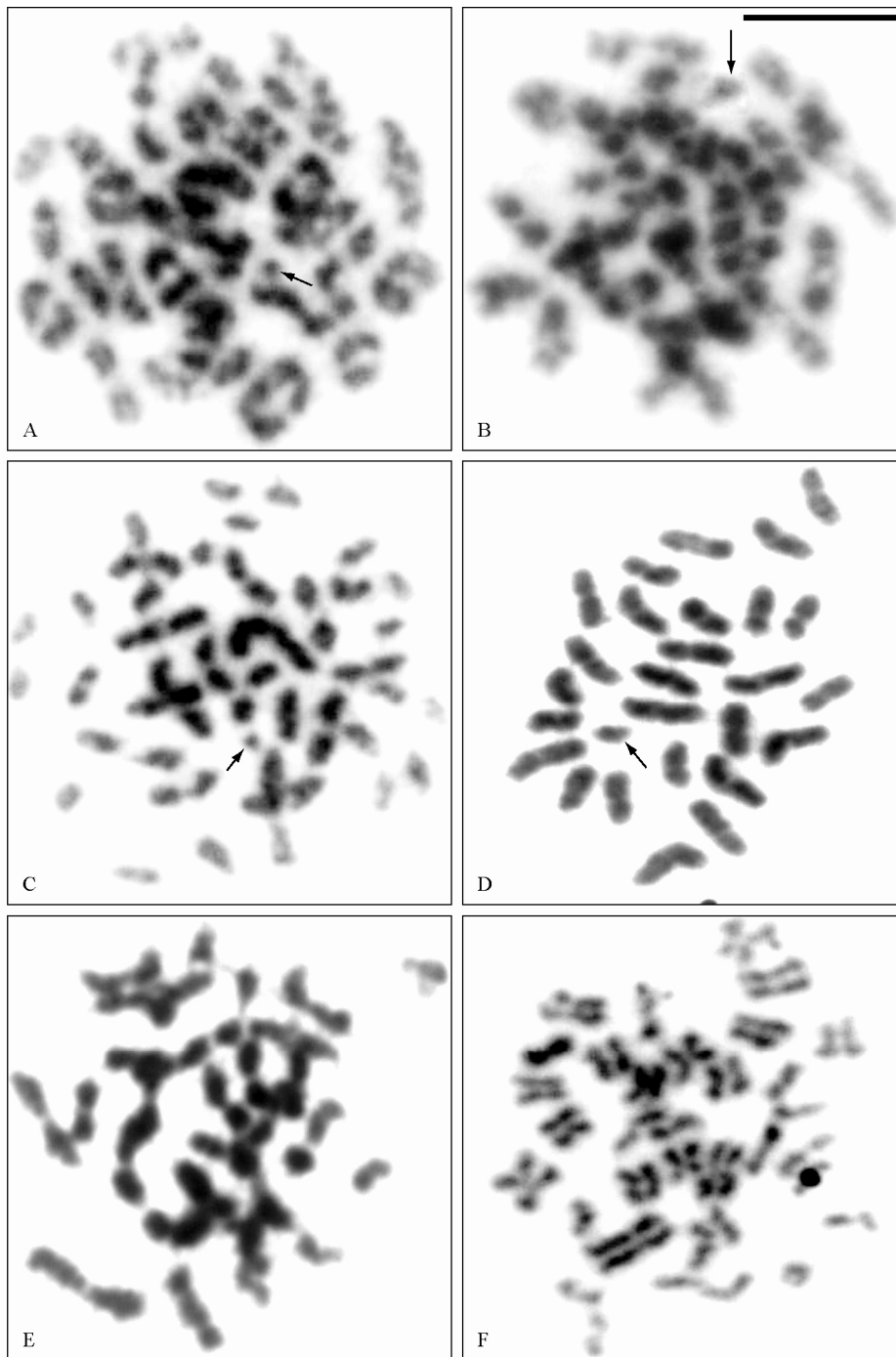


Figura 16- Cromossomos meióticos de um exemplar fêmea de *Cyphocharax nagelii* portador de 1 cromossomo B, corados com Giemsa. **A, B, C e D.** Metáfases I com um cromossomo B (seta). **E e F.** Metáfases I e II, respectivamente, sem cromossomo B identificável. Barra = 5µm.

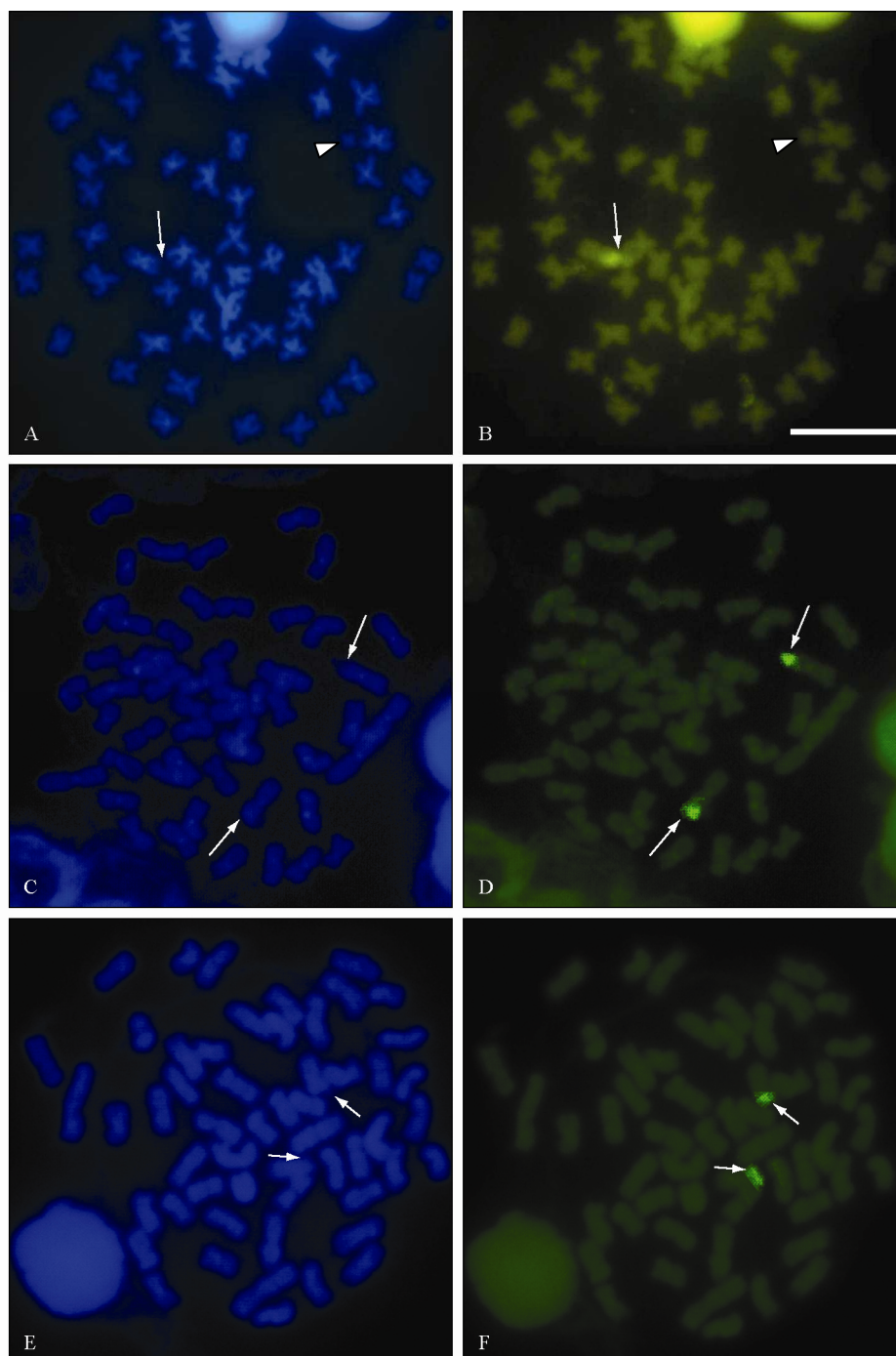


Figura 17- Metáfases mitóticas submetidas a coloração DAPI (A, C e E) e CMA₃ (B, D e F). A e B. *Cyphocharax nagelii* com 2n=54 + 1B. C e D. *Cyphocharax modestus* com 2n=54. E e F. *Steindachnerina insculpta* com 2n=54. As setas indicam as regiões CMA₃ positivas e as cabeças de seta, o cromossomo B. Barra = 5µm.

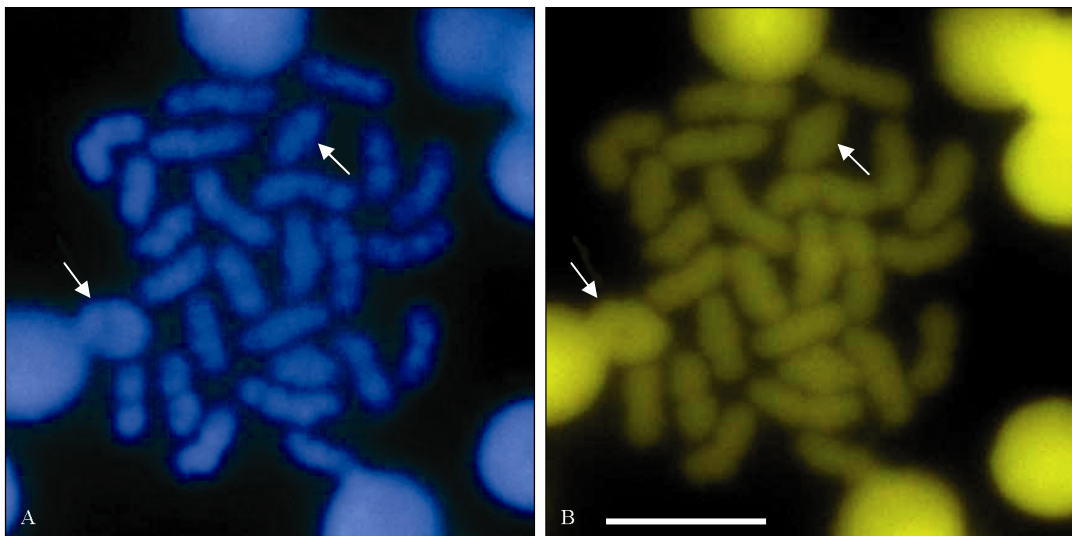


Figura 18- Espermatócitos I de *Cyphocharax nagelii* macho com $2n=27II$, submetidos a coloração DAPI (A) e CMA3 (B). Bivalentes com quiasmas estão indicados pelas setas. Barra = $5\mu m$.

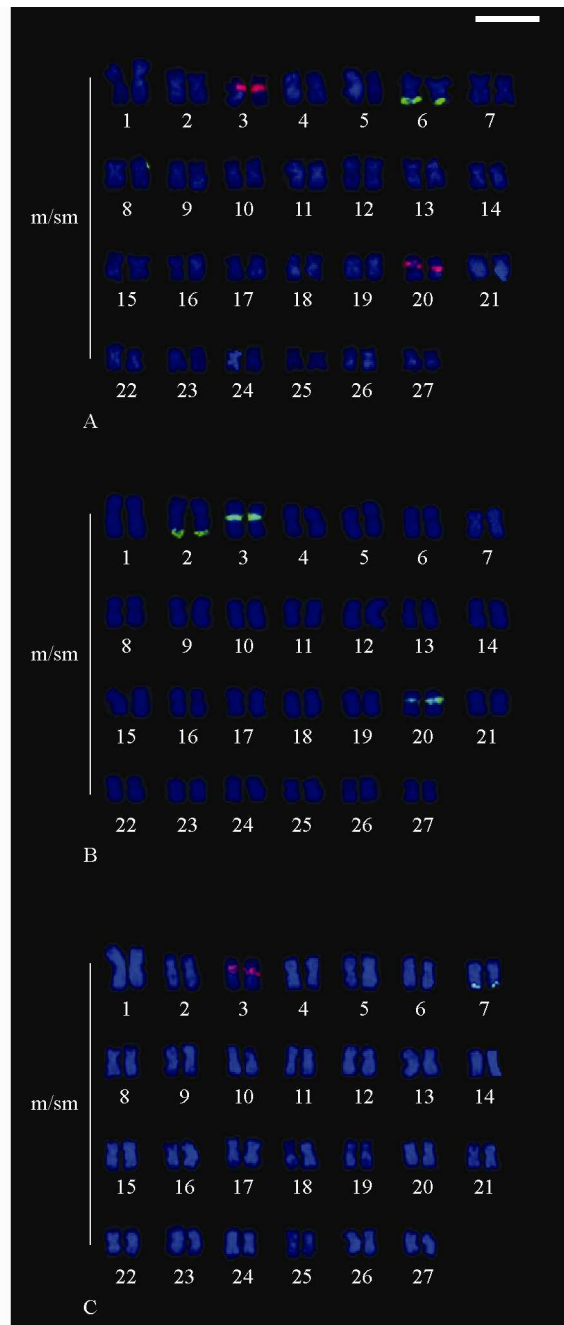


Figura 19- Cariótipos com $2n=54$ cromossomos corados com DAPI, submetidos a hibridação *in situ* fluorescente com sondas de rDNA 18S e 5S. **A.** *Cyphocharax nagelii*: o par 6 contém rDNA 18S (verde) e os pares 3 e 20 rDNA 5S (rosa). **B.** *Cyphocharax modestus*: par 2 possui rDNA 18S (verde) e os pares 3 e 20 o rDNA 5S (verde). **C.** *Steindachnerina insculpta*: par 7 com rDNA 18S (verde) e o par 3 com rDNA5S (rosa). verde=FITC; rosa=rodamina. Barra = 5 μ m.

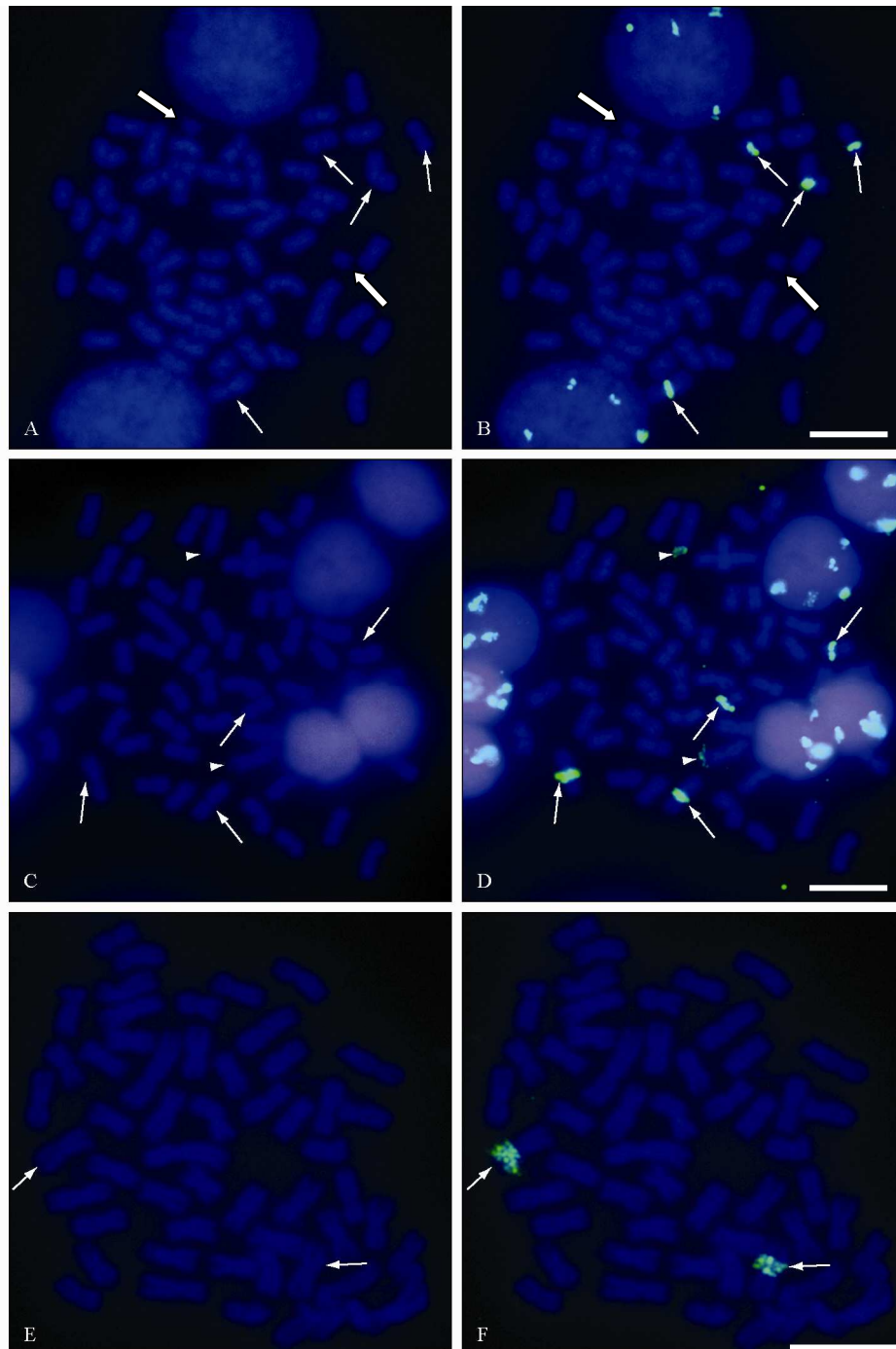


Figura 20- Metáfases mitóticas com $2n=54$ cromossomos, coradas com DAPI e submetidas a hibridação *in situ* fluorescente com sondas de rDNA 5S. **A e B.** *Cyphocharax nagelii*. **C e D.** *Cyphocharax modestus*. **E e F.** *Steindachnerina insculpta*. Setas indicam rDNA 5S, cabeças de seta mostram rDNA 18S e setas largas indicam os cromossomos B. Barra = 5 μ m.

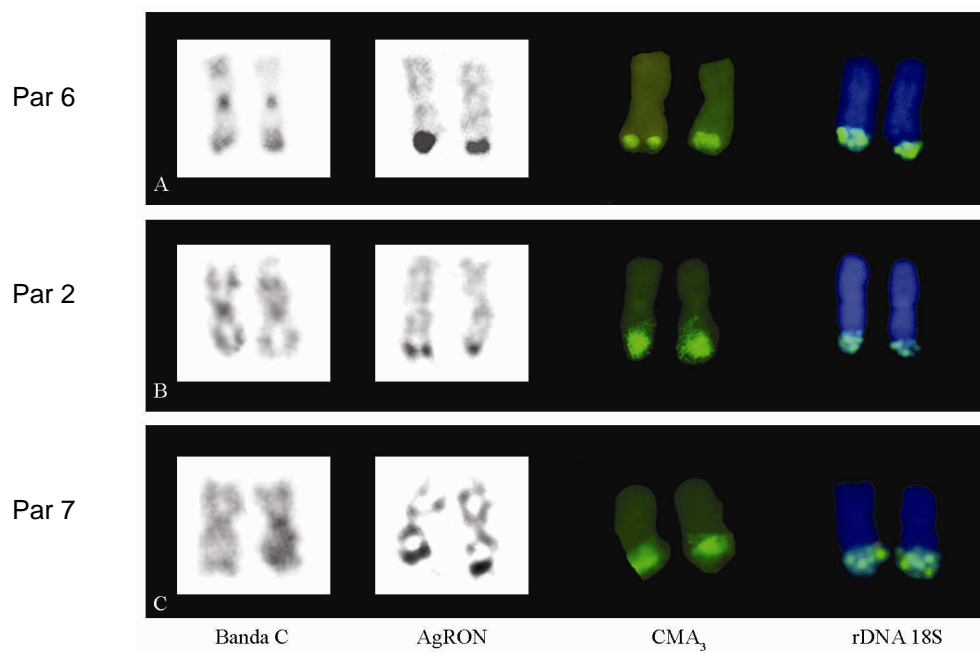


Figura 21- Pares cromossômicos mostrando as regiões de rDNA 45S, as quais são coincidentes com heterocromatina. **A.** *Cyphocharax nagelii*. **B.** *Cyphocharax modestus*. **C.** *Steindachnerina insculpta*.

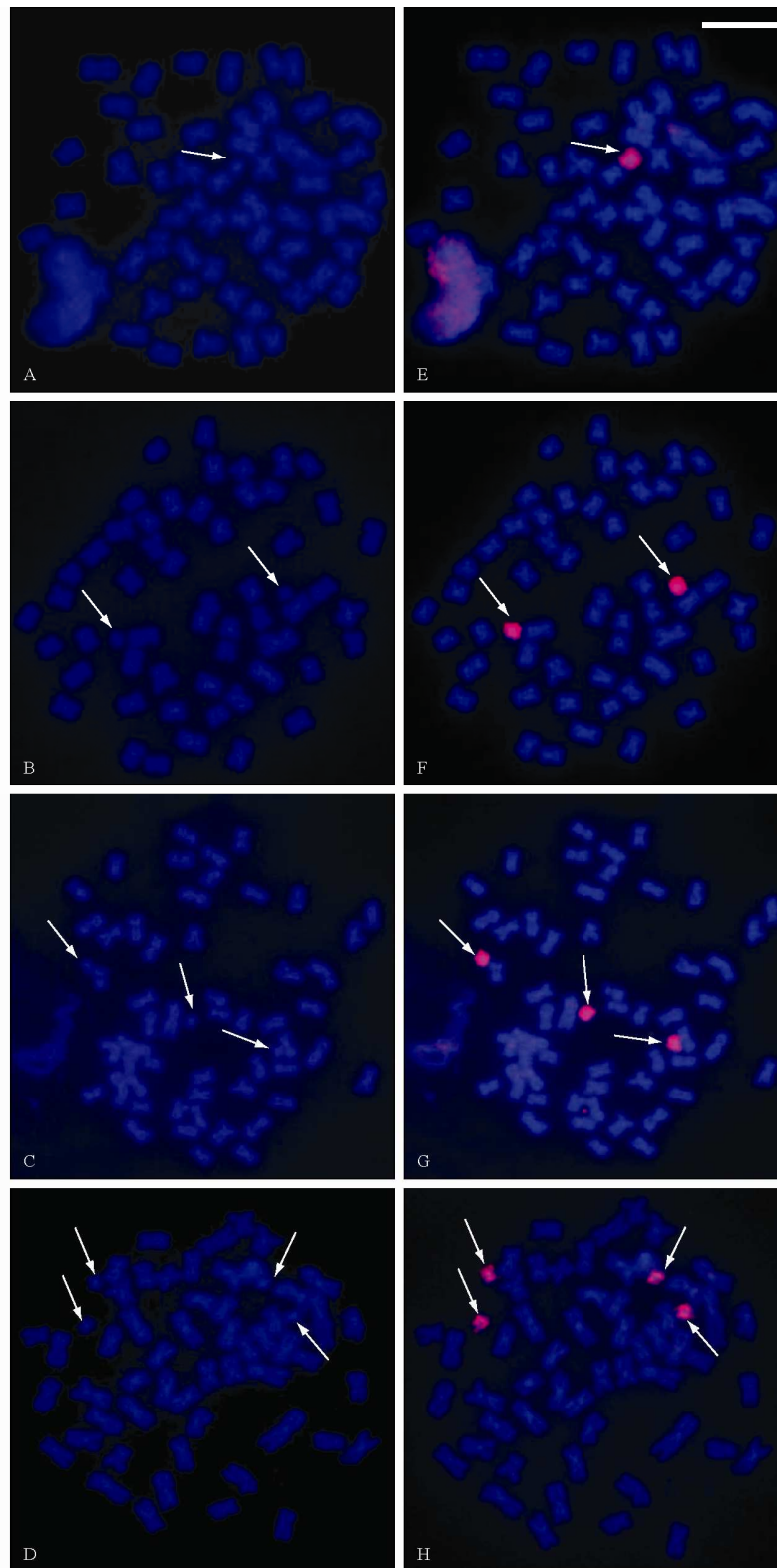


Figura 22- Metáfases mitóticas de quatro indivíduos de *Cyphocharax nagelii*, submetidas à pintura cromossômica. **A, B, C** e **D**. Células coradas com DAPI, mostrando $2n=54+1B$, $2n=54+2B$, $2n=54+3B$ e $2n=54+4B$, respectivamente. **E, F, G** e **H**. As mesmas células vistas em A, B, C e D mostrando o sinal da hibridação *in situ* fluorescente com a sonda do cromossomo B microdissectado de metáfases do indivíduo mostrado em A. **A**. Fêmea. **B, C** e **D**. Machos. Note que os cromossomos B são igualmente hibridados. As setas indicam os cromossomos B. Barra = 5 μ m.

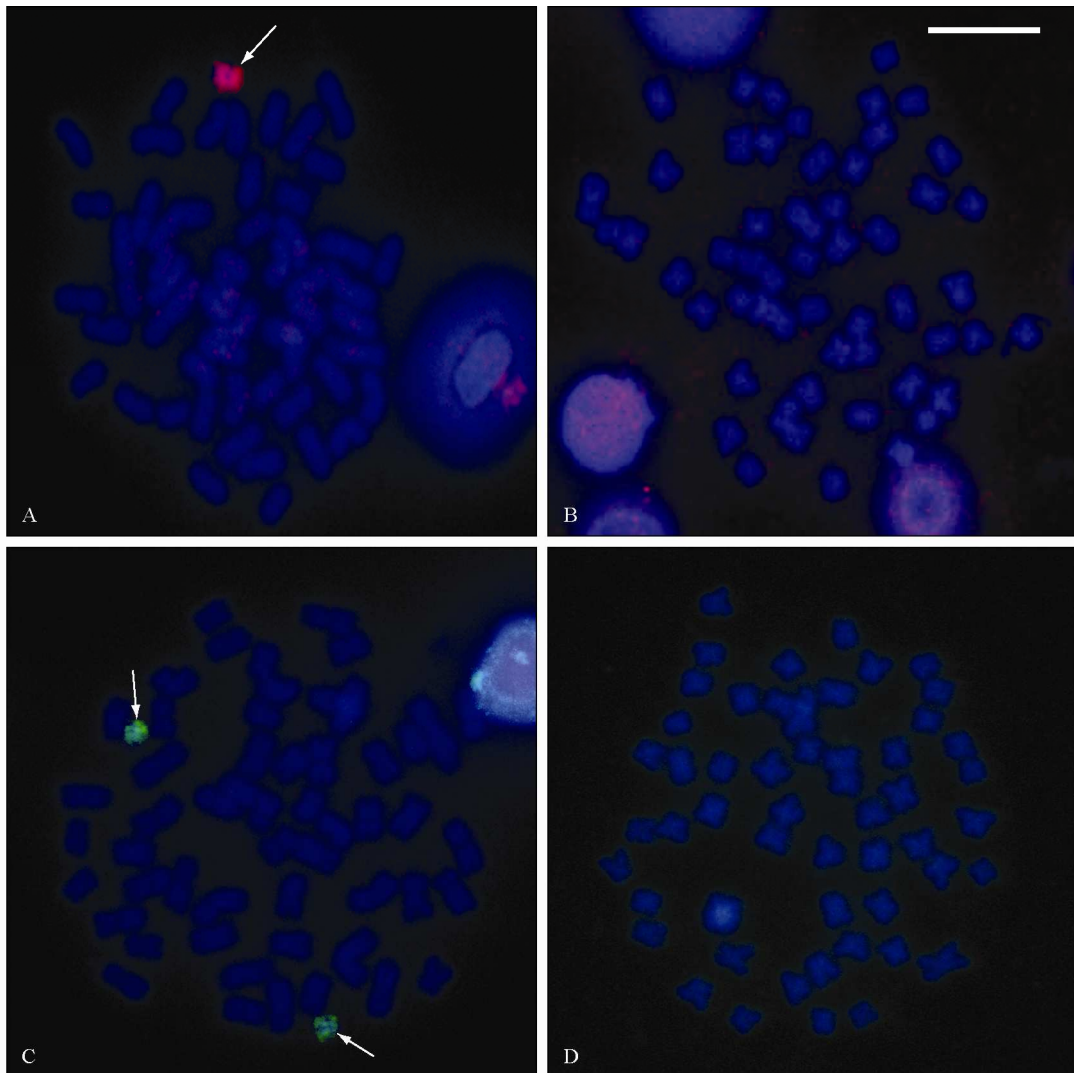


Figura 23- Cromossomos mitóticos corados com DAPI e submetidos a hibridação *in situ* com sonda do cromossomo B. **A** e **C**. Metáfases mitóticas de *Cyphocharax nagelii*, mostrando os cromossomos B hibridados com a sonda obtida por microdissecção desse mesmo elemento (setas). **B** e **D**. Metáfases mitóticas de *Cyphocharax modestus* e *Steindachnerina insculpta*, respectivamente, sem sinal de marcação pela sonda do cromossomo B. sinal verde=FITC, sinal rosa=rodamina. Barra = 5 μ m.

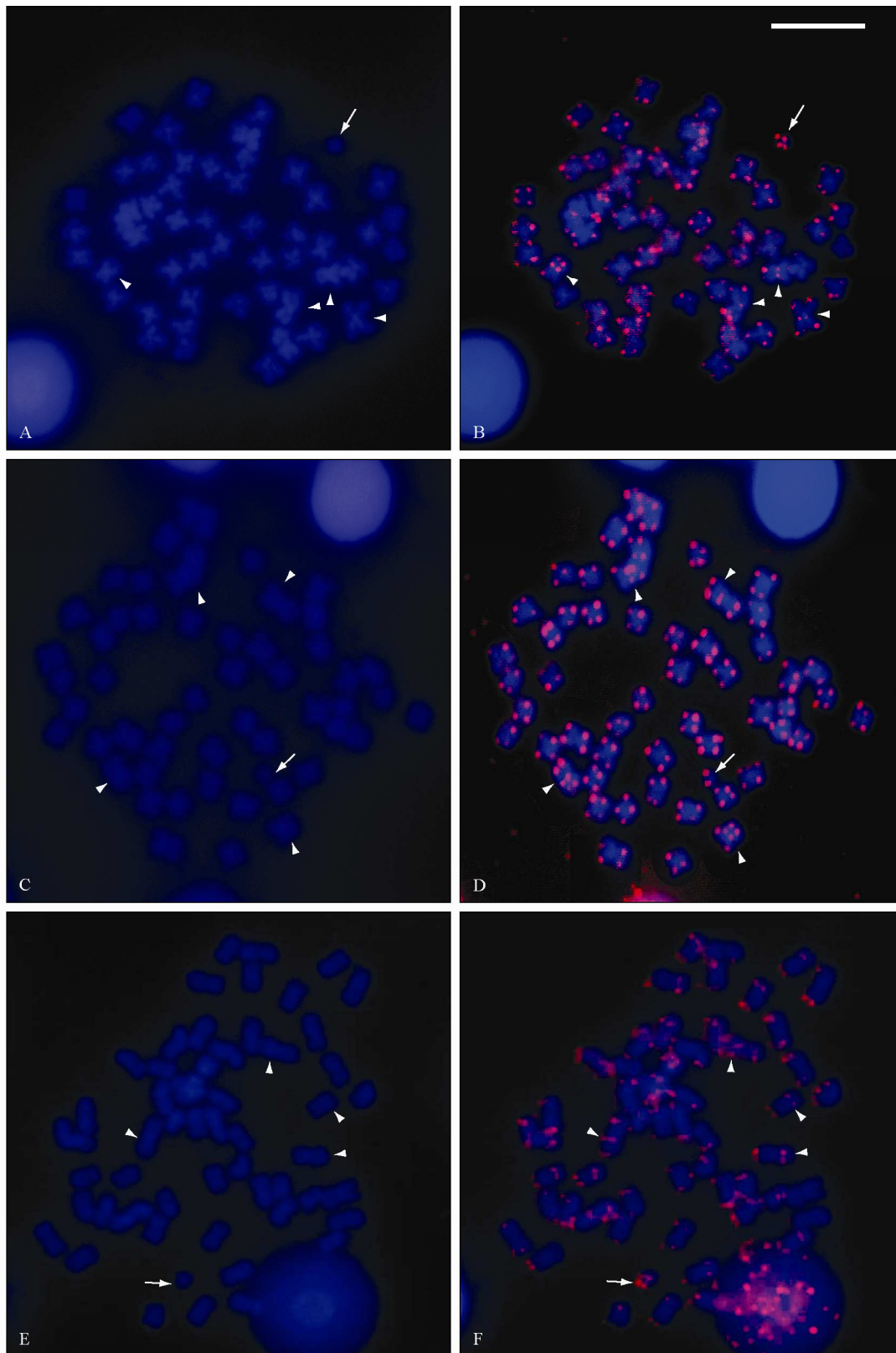


Figura 24- Metáfases mitóticas de *Cyphocharax nagelii*. **A, C e E.** Coradas com DAPI. **B, D e F.** As mesmas células vistas em A, C e E mostrando as marcações da hibridação *in situ* fluorescente com seqüências teloméricas (TTAGGG)_n. As setas indicam os cromossomos B e cabeças de seta sinalizam autossomos com seqüências teloméricas intersticiais. Barra = 5µm.

5. Discussão

5.1. A citogenética de *Cyphocharax nagelii*, *Cyphocharax modestus* e *Steindachnerina insculpta*

A história da Terra esta registrada nas camadas da crosta; a historia de todos os organismos está entalhada nos cromossomos (provérbio de Hitoshi Kihara-1946). A história cromossômica da família Curimatidae começou a ser contada oficialmente em VENERE and GALETTI (1985), e a discussão no presente trabalho tem a pretensão de acrescentar mais um capítulo a esta narrativa que está só no começo.

Para a família Curimatidae foi possível averiguar que 17 estudos cromossômicos foram realizados (Tabela 1). Estes estudos mostraram que o número diplóide $2n=54$ cromossomos foi predominante. Os cariótipos também foram substancialmente marcados pela presença de cromossomos meta- e submetacêntricos. Exceções podem ser observadas em: *Curimatella ocellata* – $2n=56$ (FELDBERG et al., 1992); *Cyphocharax platanus* – $2n=58$, com cromossomos subtelocêntricos (BRASSESCO et al., 2004; VENERE et al., 2008); *Potamorhina altamazonica* – $2n=102$, com cromossomos acrocêntricos (FELDBERG et al., 1993); *Potamorhina latior* – $2n=56$, presença de cromossomos subtelocêntricos (FELDBERG et al., 1993); *Potamorhina squamoralevis* – $2n=102$, com cromossomos acrocêntricos (BRASSESCO et al., 2004).

No presente trabalho, *Cyphocharax nagelii*, *Cyphocharax modestus* e *Steindachnerina insculpta*, apresentaram $2n=54$ cromossomos meta- e submetacêntricos, concordando com a maioria das espécies de Curimatidae e com prévias análises realizadas em outras populações das mesmas espécies (VENERE and GALETTI, 1989, 1995; OLIVEIRA and FORESTI, 1993; MARTINS et al, 1996; VENERE et al., 1999; De ROSA et al., 2006, 2007, 2008; GRAVENA et al., 2007; TERIBELE et al., 2008; VENERE et al., 2008).

O conservadorismo cromossômico macroestrutural da família Curimatidae se estende às famílias Anostomidae, Chilodontidae e Prochilodontidae. Esta observação já foi considerada por muitos autores como uma sinapomorfia entre essas famílias (VENERE and GALETTI, 1989;

FELDBERG et al., 1992; BRASSESCO et al., 2004; VENERE et al., 2008). Existem exemplos que contrastam com a homogeneidade observada neste grupo monofilético, evidenciando que outras estratégias evolutivas podem promover a diferenciação dos cariótipos de peixes. Heterogeneidade, pelo menos macroestrutural, pode ser observada no gênero gymnotiforme *Eigenmannia* (SILVA et al., 2009), nos erythrinídeos *Hoplias malabaricus* e *Hoplerythrinus unitaeniatus* (BERTOLLO et al., 1997; DINIZ and BERTOLLO, 2006), e no symbranchiforme *Synbranchus marmoratus* (SANCHEZ and FENOCCHIO, 1996), entre outros.

É sugerido que o conservadorismo cariotípico nos teleósteos marinhos seria produto de condições biológicas que favoreceriam o fluxo gênico de populações. Outras hipóteses consideram o modo de vida de espécies de teleósteos generalistas, ou seja, aquelas que colonizam muitos habitats durante o ciclo de vida, como responsável pela baixa variabilidade cariotípica; por outro lado, os organismos especialistas, teriam maior variabilidade genética (SENA and MOLINA, 2007; CIPRIANO et al., 2008).

Analisando um cladograma proposto por VARI (1989) para alguns gêneros de curimatídeos, o qual foi baseado em caracteres morfológicos, (Fig. 25, logo abaixo), é possível perceber que $2n=54$ está presente em quase todos os gêneros. Exceção feita a *Curimatopsis*, contudo só existe registro cromossômico para uma espécie deste gênero; e a *Pseudocurimata*, com nenhuma espécie caracterizada citogeneticamente. A presença de $2n=54$ em gêneros basais tais como *Potamorhina*, e em gêneros mais derivados como em *Cyphocharax*, com espécies distribuídas nas mais diferentes bacias hidrográficas brasileira sugere que a irradiação evolucionária na família Curimatidae parece não ser acompanhada de mudanças cariotípicas. Parece que para os curimatídeos a combinação $2n=54$ com cromossomos meta-submetacêntricos, represente um caráter adaptativo.

KOEHLER et al. (1997) referem-se à alta similaridade cariotípica macroestrutural no gênero *Leporinus* (Anostomidae) como resultado de um processo evolutivo conservado e geneticamente estável. Os autores ainda justificam a constância cariotípica dizendo que poderia ser uma questão de homeostase celular, conseqüência do equilíbrio entre forças seletivas de diversidade genômica e forças de pressão para a constância celular. Esta

suposição seria válida para Anostomidae, Curimatidae, Chilodontidae e Prochilodontidae (KOEHLER et al., 1997). Nos cromossomos dos dípteros do gênero *Pseudacteon*, foram encontradas irrelevantes diferenças quanto ao tamanho e morfologia desses elementos, sinalizando que durante a irradiação adaptativa desse gênero, não houve concomitante alteração cariotípica macroestrutural (CHIRINO et al., 2009).

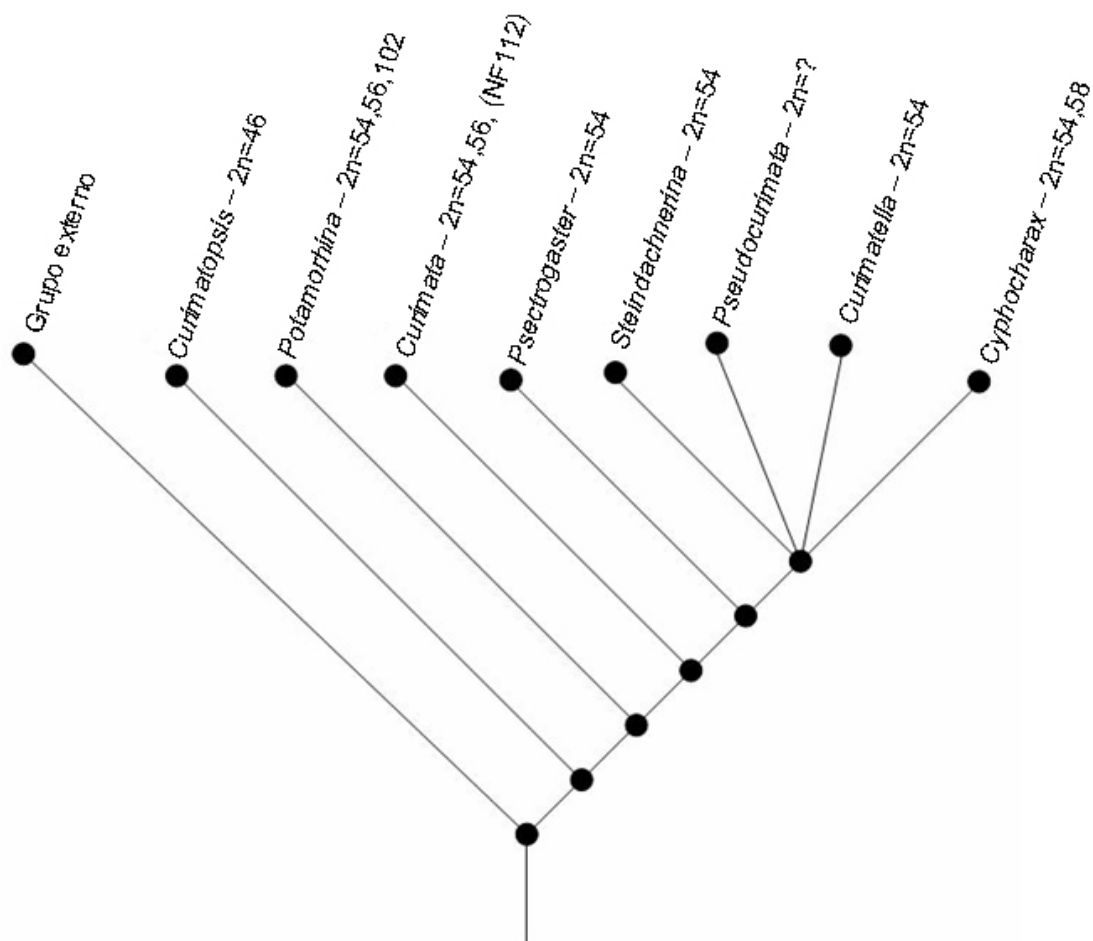


Figura 25- Adaptação do cladograma proposto para os gêneros da família Curimatidae, com base em sinapomorfias morfológicas (VARI, 1989).

Existe a possibilidade de que a estrutura $2n=54$ com cromossomos meta- e submetacêntricos nos Characiformes, seja uma característica com ancestralidade mais basal do que já tem sido sugerido (VENERE et al., 2008). Além das famílias pertencentes à unidade monofilética da qual Curimatidae faz parte, outras famílias de Characiformes também apresentam espécies com $2n=54$ (meta- e submetacêntricos), como exemplo: Parodontidae (MOREIRA-

FILHO et al., 1985), Hemiodontidae (PORTO et al., 1993) e Characidae-Serrasalminae (ALMEIDA-TOLEDO et al., 1987; VENERE et al., 2008).

A diferenciação cariotípica na família Curimatidae parece envolver rearranjos estruturais do tipo inversão pericêntrica, aneuploidia ou fissão cêntrica. *Curimata Kneri* possui $2n=54$ (FELDBERG et al., 1992); contudo, essa se diferencia do padrão por apresentar 1 par de cromossomos subtelo-cêntricos; *Curimata ocellata*, $2n=56$ (FELDBERG et al., 1992), com número fundamental 112; *Cyphocharax platanus* – $2n=58$, com cromossomos subtelo-cêntricos (BRASSESCO et al., 2004; VENERE et al., 2008); *Potamorhina altamazonica* – $2n=102$, com cromossomos acrocêntricos (FELDBERG et al., 1993); *Potamorhina latior* – $2n=56$, presença de cromossomos subtelo-cêntricos (FELDBERG et al., 1993); *Potamorhina squamoralevis* – $2n=102$, com cromossomos acrocêntricos (BRASSESCO et al., 2004).

VENERE et al. (2008) utilizando a técnica de bandamento C, compara o par 2 dos gêneros *Cyphocharax* e de *Steindachnerina* com os pares 28 e 29 de *Cyphocharax platanus* ($2n=58$), e estes pares parecem ter surgido por fissão cêntrica. Os autores correlacionam as variações cromossômicas observadas nas espécies amazônicas *P. altamazonica*, *P. latior* e *C. ocellata*, com a particular condição proposta por VARI (1988), de que esta região teria discretos padrões de endemismo.

O conteúdo e a distribuição da heterocromatina nos cromossomos variam entre diferentes organismos. Considera-se que a heterocromatina tem uma participação importante na diferenciação cariotípica de muitos grupos taxonômicos (ROCHA and POMPOLO, 1998). A atuação da heterocromatina sobre o genoma justifica a idéia de que diferentes padrões cromossômicos desta cromatina seriam como características espécie-específicas. A capacidade de silenciar genes, de recuperar a estabilidade da região telomérica após eventos de fissão (ROCHA and POMPOLO, 1998; DILLON, 2004), de acomodar genes, ou melhor, de ter genes intercalados ou circundados por regiões heterocromáticas, de estar envolvida em diversos rearranjos estruturais (IMAI, 1991), faz com que a heterocromatina seja visivelmente uma das protagonistas responsáveis pela diferenciação cariotípica em muitos grupos de organismos.

Citologicamente a heterocromatina pode variar em quantidade, posição e tipo (CARVALHO et al., 2001). Atualmente a heterocromatina pode ser identificada pela técnica de bandamento C (SUMNER, 1972), por fluorocromos base-específicos (ARTONI and BERTOLLO, 1999), por hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com sondas de DNA satélite (MARTINS et al., 2004) e até mesmo por impregnação pela prata (MURRAY, 1994).

Para a identificação de regiões heterocromáticas em *C. nagelii*, *C. modestus* e *S. insculpta* foi empregada a técnica de bandamento C (SUMNER, 1972), os fluorocromos DAPI e CMA₃ também foram utilizados. O padrão geral obtido para as três espécies foi semelhante, ou seja, a maior parte da heterocromatina estava concentrada na região pericentromérica. As diferenças interespecíficas encontradas se limitavam a pequenas regiões teloméricas em alguns pares, por exemplo: pares 1, 2, 6, de *C. nagelii*; par 2 de *C. modestus*; pares 7 e 16 de *S. insculpta*.

As bandas C obtidas por VENERE et al. (2008) para outras populações de *C. nagelii*, de *C. modestus* e de *S. insculpta* foram muito discrepantes daquelas conseguidas no presente trabalho. No trabalho em questão, a localização e a quantidade de heterocromatina parecem ser muito maiores do que aquelas que estão sendo apresentadas no presente trabalho; e são discordantes até mesmo do padrão apresentado em outros trabalhos (OLIVEIRA and FORESTI, 1993; GRAVENA et al., 2006; De ROSA et al., 2008), os quais mostram semelhanças aos aqui apresentados. A divergência entre o padrão heterocromático apresentado e aquele de VENERE et al. (2008), pode ter relação com a forma de aplicação da técnica, e não com diferenças populacionais. No presente trabalho foi feita a técnica seqüencial de coloração com Giemsa-bandamento C, e este modo de aplicação pode ter alterado o DNA, provocando a diferença de resultado. Esta hipótese precisará ser testada, assim novos experimentos de bandamento C devem ser realizados nas três espécies para se confirmar o padrão. No entanto, a possibilidade de existir diferenças na quantidade e localização da heterocromatina constitutiva entre indivíduos da mesma espécie pertencentes a diferentes populações não pode ser descartada, pois existem vários registros dessa variabilidade em diversos organismos.

Evidências de cromossomos sexuais incipientes que estariam associados a diferenças no padrão de bandamento C, não foram observadas nas três espécies analisadas. Este tipo de diferenciação já foi evidenciada entre machos e fêmeas de *Dicentrarchus labrax* (Perciformes). Nesta espécie, o par 24 parece conter diferenças heterocromáticas que estariam ligadas à formação de cromossomos sexuais heteromórficos (CANO et al., 1996). Na unidade monofilética da qual Curimatidae participa, a família Anostomidae apresenta sistema ZZ/ZW no gênero *Leporinus*, com os cromossomos sexuais evolutivamente bastante diferenciados em termos de tamanho e quantidade de heterocromatina (GALETTI et al., 1981; GALETTI and FORESTI, 1986); pequenas diferenças de tamanho em um par de cromossomos, observadas entre machos e fêmeas da espécie *Semaprochilodus taeniurus*, Prochilodontidae, foram associadas a cromossomos sexuais (FELDBERG et al., 1987). Até o presente, nenhuma espécie de Curimatidae mostrou cromossomos sexuais diferenciados.

Na análise dos cromossomos meióticos de *C. nagelii*, também não foram encontradas evidências de heterogametia masculina. No anostomídeo *Leporinus lacustris* a análise da meiose também não possibilitou a confirmação da presença de cromossomos sexuais XY (MESTRINER et al., 1995), cuja ocorrência já havia sido reportada por GALETTI et al. (1981). *Leporinus lacustris*, apresentou um par de cromossomos heteromórficos nas metáfases mitóticas de indivíduos machos (GALETTI et al., 1981); entretanto, na meiose com a aplicação da técnica para identificação do complexo sinaptonêmico, região assináptica que pudesse estar relacionada a presença de cromossomos sexuais XY não foi observada (MESTRINER et al. 1995). As teorias sobre evolução de cromossomos sexuais, concentram-se basicamente no fato de que cromossomos homomórficos devem ter seu processo de recombinação meiótico restringido para se tornarem elementos relacionados ao sexo (SINGH et al., 1980). Esta restrição afetaria o emparelhamento dos cromossomos envolvidos, motivo pelo qual se esperaria configurações diferenciais durante a meiose de espécies portadoras de cromossomos sexuais heteromórficos.

O estudo de espermatócios I de *C. nagelii* permitiu a visualização de até 12 figuras quiasmáticas, as quais envolviam quiamas intersticiais e terminais. É apropriado lembrar que a recombinação genômica ocorre durante a prófase I,

e, de maneira geral, pode ser visualizada através dos nódulos de recombinação durante o paquíteno. Nas fases subseqüentes, ou seja, diplóteno, diacinese e metáfase I, as regiões envolvidas em recombinação ou *crossing over* podem ser inferidas pela presença de quiasmas (SUMNER, 2003). A presença de muitos bivalentes com quiasmas em *C. nagelii* seria um critério para se inferir que o genoma desta espécie experimenta uma intensa atividade de recombinação, caso a correlação entre *crossing* e quiasma seja sempre positiva.

A aplicação do bandamento C em algumas metáfases I de macho de *C. nagelii* (Figs. 15B, D, F), mostrou que sítios heterocromáticos participam da configuração de alguns quiasmas. No contexto da formação de quiasmas são atribuídas algumas hipóteses sobre a participação da heterocromatina. A perda ou ganho de heterocromatina pode atuar na redistribuição de quiasmas no par cromossômico que sofreu a alteração (NAVAS-CASTILHO et al., 1985). A frequência e a terminalização de quiasmas também podem ser afetadas pela presença de heterocromatina. Quanto à terminalização, existe a sugestão de que quiasmas ocorridos na eucromatina seriam “movid” durante a divisão celular, para regiões heterocromáticas. Neste caso, a heterocromatina formaria uma barreira contra a terminalização dos quiasmas (TORREZAN and POGLIARINI, 1995).

Em *Allactaga tetradactyla*, *Jaculus jaculus* e *Jaculus orientalis* (Rodentia) os quiasmas intersticiais não sofrem terminalização durante as diacineses e metáfases I, assim, a heterocromatina não interfere nesta condição. O padrão de heterocromatina encontrado nestas três espécies é semelhante tanto na mitose, quanto na meiose (ATA and SHAHIN, 2006). Esta comparação é apropriada também para *C. nagelii*, considerando os resultados aqui obtidos referentes a mitose e meiose. *Cyphocharax nagelii* mostra blocos heterocromáticos melhor definidos na meiose do que na mitose. Na comparação entre o padrão mitótico do presente trabalho e aquele obtido por VENERE et al. (2008), a quantidade de heterocromatina neste último parece ser maior; contudo, o padrão meiótico conseguido neste estudo está condizente com o padrão mitótico de VENERE et al. (2008), no que concerne a quantidade de heterocromatina. As diferenças entre os dois estudos em *C.*

nagelii, pode ser realmente uma consequência da aplicação da técnica de bandamento C nos cromossomos mitóticos.

O uso dos antibióticos fluorescentes base-específicos DAPI e cromomicina (CMA₃), não mostrou sinal coincidente com as regiões banda C positivas. Esta ausência de marcação indica que a heterocromatina de *C. nagelii*, *C. modestus* e *S. insculpta* não possui regiões com grandes concentrações de bases AT ou CG. A mesma homogeneidade heterocromática foi observada em *Cyphocharax modestus* (MARTINS et al. 1996; De ROSA et al., 2007; TERIBELE et al., 2008) e *Steindachnerina insculpta* (De ROSA et al., 2007; TERIBELE et al., 2008). Heterocromatina rica em bases GC foi encontrada em *Leporinus desmotes* (MARGARIDO and GALETTI, 2000), *Leporinus elongatus* e *Liposarcus anisitsi* (ARTONI et al., 1999).

A região organizadora de nucléolo (RON) é um bom marcador cromossômico para alguns grupos de organismos e pode ser identificada por nitrato de prata, hibridação *in situ* fluorescente, e por fluorocromos GC-específicos. (PHILLIPS and REED, 1996). Na família Curimatidae, se os estudos utilizando técnicas para identificar RON forem separados por gênero, alguns desses terão espécies diferentes com AgRON em pares cromossômicos correspondentes, nesses casos esta região não pode ser considerada como um bom marcador cromossômico. Como exemplo, no gênero *Cyphocharax* as espécies *C. nagelii* (VENERE and GALETTI, 1995; VENERE et al., 2008; presente trabalho), *C. platanus* (BRASSESCO et al., 2004; VENERE et al., 2008) *C. vanderi* (VENERE and GALETTI, 1989) e *C. voga* (VENERE and GALETTI, 1989; BRASSESCO et al., 2004) apresentam o par 6 como portador da região organizadora de nucléolo. Em contrapartida, no gênero *Psectrogaster* (FELDBERG et al., 1992; NAVARRETE and JULIO, 1997; BRASSESCO et al., 2004; VENERE et al., 2008), diferenças interespecíficas nos pares portadores de AgRON fazem com esta região seja um bom marcador cromossômico para o gênero (Tabela 1).

Para o gênero *Curimata* existem 13 espécies descritas sistematicamente, e em apenas 5 delas foram determinadas as RON (Tabela 1). Este gênero parece ser um candidato a ter as RON como bons marcadores espécie-específicos. Em duas populações de *Curimata cyprinoides*, as RON foram encontradas em pares cromossômicos diferentes (FELDBERG et al.,

1992; VENERE et al., 2008). Assim, para este gênero o rDNA 45S pode ser usado como marcador populacional.

A variabilidade interespecífica das RON indica que a especiação dos curimatídeos foi acompanhada por alterações nessas regiões. Como já citado, as RON podem servir como marcadores espécie-específicos e até mesmo como marcadores populacionais intraespecíficos. *Oligosarcus hepsetus* que habita diferentes tributários do Rio Paraíba do Sul, mostra diferenças interpopulacionais quanto aos cistrons de rDNA 45S; uma população tem os pares cromossômicos 17 e 20 AgRON positivos, enquanto outra população tem os pares 5 e 17 impregnados pela prata (CENTOFANTE et al., 2006).

Voltando ao quadro, um aspecto que se destaca é a presença de RON múltiplas nos gêneros *Curimata*, *Cyphocharax* e *Steindachnerina* (VENERE et al., 2008). As regiões de rDNA 45S, nas espécies desses três gêneros, são relativamente grandes, coincidentes com heterocromatina e terminais. A combinação desses fatores pode levar estes sítios a se dispersarem de acordo com o modelo de Rabl (SCHWEIZER and LOIDL, 1987; IÑIGO et al., 1996), ou por eventos de transposição (CENTOFANTE et al., 2006; FERNANDES and MARTINS-SANTOS, 2006). No modelo de Rabl parece existir uma correlação entre localização de regiões centroméricas/teloméricas no núcleo interfásico, com a maior facilidade de transferência de seqüências localizadas nestas regiões (SCHWEIZER and LOIDL, 1987; IÑIGO et al., 1996). Considerando as características das RON de *Curimata*, *Cyphocharax* e de *Steindachnerina*, tais mecanismos poderiam explicar a presença de sítios múltiplos nestes três gêneros.

A coincidência destas RON com regiões heterocromáticas pode produzir uma outra explicação para a multiplicidade desses sítios. Os *clusters* adicionais de rDNA 45S identificados com nitrato de prata podem representar, na verdade, heterocromatina, a qual em alguns organismos tem afinidade pela prata (MAYR et al., 1988; SUMNER, 1990; ARTONI and BERTOLLO, 2002). Esta teoria parece bastante plausível quando analisando a Tabela 1 e o quadro acima, é possível perceber que nos curimatídeos existe predominantemente apenas 1 par de AgRON.

A utilização de hibridação *in situ* com sondas de rDNA 18S, uma técnica precisa para a identificação do *cluster* de rDNA 45S, ainda é muito restrita;

mas, os poucos resultados existentes corroboram a presença de somente um par de cromossomos portadores de RON (De ROSA et al., 2007; TERIBELE et al., 2008; presente trabalho). Uma população de *C. nagelii* caracterizada cromossomicamente por VENERE and GALETTI (1989) mostrou o par 25 como portador da RON; outra população, no estudo realizado em 2008 por VENERE et al. mostrou RON múltiplas, nos pares 1,2,6,11,21. Os autores acreditam que esta diferença seria a expressão da separação entre as populações.

Nas espécies aqui analisadas *C. nagelii*, *C. modestus* e *S. insculpta*, os *clusters* de rDNA 45S foram identificados com nitrato de prata, hibridação com sonda de rDNA 18S e CMA₃. As RON foram localizadas na porção distal dos cromossomos dos pares 6, 2 e 7, respectivamente. Adicionalmente, estas regiões foram banda C positivas. Em outras descrições de outra população de *C. nagelii* houve um registro de RON no par 25 e RON múltiplas nos pares 1,2,6,11 e 21, a discussão sobre essa multiplicidade está no parágrafo anterior; em *C. modestus*, em diferentes populações, a localização das RON no par 2 é unânime; diferentes populações de *S. insculpta* mostraram RON nos pares 7, 22 e 25.

O resultado do mapeamento das RON, obtido no presente trabalho, não é discrepante daquilo que já foi encontrado. As diferenças populacionais observadas podem ser resultado de uma significativa separação entre as espécies (VENERE et al., 2008). Esta proposta torna-se expressiva principalmente para o gênero *Steindachnerina*, o qual possui a mais ampla distribuição dentre os curimatídeos e é o segundo em quantidade de espécie da família, ou seja, 22 espécies descritas. (REIS et al., 2003; LUCINDA and VARI, 2009).

A coincidente localização de rDNA 18S, marcação CMA₃, AgRON, e heterocromatina em *C. nagelii*, *C. modestus* e *S. insculpta*, parece ser uma característica comum para os curimatídeos e para outras espécies de peixes (MARTINS et al., 2004; PHILLIPS and REED, 1996). A impregnação pela prata mostra atividade na intérfase precedente; a marcação com CMA₃ indica uma região rica em bases GC. A presença de heterocromatina nesta região provoca uma dúvida sobre quem realmente possui seqüências ricas em GC: seria a heterocromatina que estaria intercalando os *clusters* de rDNA 45S (PENDÁS et

al., 1993) ou o próprio gene de rRNA 45S (MILLER, 1981, ARTONI et al., 1999), ou ainda os espaçadores internos dos clusters 45S (SCHMID, 1982)? Assim, para determinar com certeza se a cromomicina está indicando RON, outras técnicas citogenéticas devem ser utilizadas.

A heterocromatina associada ao rDNA 45S pode estar envolvida no acúmulo destas regiões, através de *crossing-over* desigual ou troca entre cromátides irmãs (PENDÁS et al., 1993). Entretanto, a heterocromatina pode não ter nenhuma relação com o acúmulo de regiões de rDNA 45S. Em JOHN (1990) a heterocromatina é vista, com raras exceções, como não participante de *crossing-over*, e capaz de causar efeitos negativos no emparelhamento dos cromossomos. Analisando sob este aspecto, a heterocromatina poderia até ser considerada como uma protetora das RON. Dessa forma, alguns polimorfismos intraespecíficos envolvendo RON, poderiam ser explicados por eventos como duplicações ou deleções, que são por si só capazes de promover tais variações (VICARI et al., 2006). *Cyphocharax nagelii*, *C. modestus* e *S. insculpta* não mostraram diferenças substanciais em relação aos cluster 45S, sugerindo que a heterocromatina presente nestas regiões talvez desempenhe o papel de protetora.

Na família Curimatidae, outras populações de *C. modestus* e *S. insculpta*, também apresentaram RON coincidentes com cromomicina ou mitramicina (MARTINS et al., 1996; VENERE et al., 1999; De ROSA et al., 2007; TERIBELE et al., 2008). *Prochilodus lineatus* (VICARI et al., 2006), *Liposarcus anisitsi* (ARTONI et al., 1999) e *Triportheus nematurus* (DINIZ et al., 2008) são algumas espécies de peixes que apresentaram RON identificadas com fluorocromos GC-específicos. Existem outras peculiaridades que envolvem a relação RON com fluorocromos GC-específicos. Na *Tilapia rendalli*, RON ativas, ou seja, aquelas marcadas com prata e confirmadas com hibridação *in situ* com sondas 18S, apresentaram-se heterocromáticas e CMA₃ positivas. Entretanto, RON identificadas com hibridação *in situ*, mas não detectadas com prata, foram heterocromáticas e CMA₃ negativas (KAKAGAWA et al., 2007).

Nas espécies de ciprinídeos *Squalius alburnoides* e *Squalius pyrenaicus*, a utilização seqüencial de CMA₃, AgRON e hibridação *in situ* com sondas de rDNA 28S, mostraram que em alguns cromossomos não há correspondência

entre RON e cromomicina (GROMICHO et al., 2005). Interessantemente no peixe africano *Polypterus senegalus* (Polypteridae), CMA₃ marca sítios de rDNA 18S e 5S, fato que acontece raramente (MORESCALCHI et al., 2008).

Nos curimatídeos, as RON são conservadas na posição terminal dos cromossomos; somente em *Curimata ocellata*, as RON foram descritas como cistrons intersticiais (FELDBERG et al., 1992). *Curimata inornata*, nas análises cromossômicas realizadas por FELDBERG et al. (1992), mostrou RON intersticial no par 21; no entanto, em VENERE et al. (2008) as RON nesta espécie foram encontradas na posição terminal do par 22 e em um cromossomo do par 3. Nos estudos apresentados até o presente, a combinação RON, heterocromatina, posição terminal e sinal positivo com CMA₃/MM⁺, demonstrando riqueza de bases GC, parece ser mais uma característica conservada para os curimatídeos. Um detalhe ainda não mencionado, mas que fica subentendido nas observações sobre marcação positiva com CMA₃/MM⁺, é que estas mesmas regiões são DAPI negativas, ou seja, com pouca quantidade de bases AT.

A outra classe de DNA ribossômico é o 5S. Em *C. nagelii* e *C. modestus* foram observados 2 pares cromossômicos portadores de cistrons de rRNA 5S; em *S. insculpta* somente um par é portador desta região. A técnica de *double-fish*, usando sondas de rDNA 18S e 5S, identificou estes sítios em cromossomos diferentes, não sintênicos (presente trabalho). Somente no trabalho realizado por De ROSA et al. (2006), sondas nucleotídicas 5S foram empregadas. Os autores mapearam os cromossomos de outra população de *C. modestus* e de *S. insculpta*, e obtiveram sinal intersticial 5S em 4 e 2 cromossomos, respectivamente.

Os cistrons 5S nos curimatídeos localizam-se na porção intersticial dos cromossomos. Esta localização parece ser bastante conservada em muitos grupos de peixes. Nos Characiformes, a posição intersticial é predominante (MARTINS and WASKO, 2004). Localização terminal de cistrons 5S pode ser vista no perciforme *Chromis insolata* (MOLINA and GALETTI, 2002). A posição intersticial do rDNA 5S também é observada em outros grupos de vertebrados, assim, esta localização parece conferir alguma vantagem relativa à organização deste gene nos genomas (MARTINS and WASKO, 2004; MARTINS et al., 2004).

A organização genômica do sítios de rDNA 45S e 5S em cromossomos diferentes, pode ser a condição recorrente em alguns gêneros de peixes, tais como: *Brycon*, *Leporinus*, *Schizodon*. Outros gêneros podem conter espécies com essas regiões em sintonia e espécies que não apresentam esta condição, por exemplo: *Astyanax* e *Parodon* (ALMEIDA-TOLEDO, 2002; VICENTE et al., 2001; BELLAFRONTI et al., 2005; FERNANDES and MARTINS-SANTOS, 2006). De forma geral, a distribuição dessas duas classes de DNA ribossômico em cromossomos diferentes, facilitaria a evolução e o funcionamento dessas seqüências, e ainda evitaria que rearranjos entre essas duas classes pudessem ocorrer (MARTINS and GALETTI et al., 1999).

De ROSA et al. (2006) realizou o mapeamento físico de rDNA 5S e o sequenciamento do gene 5S e da região NTS (*Non-Transcribed Spacer Sequence*) de *C. modestus* e *S. insculpta*. Os genes 5S tinham 98,5% de similaridade entre as duas espécies; a região NTS, mostrou 93% de similaridade. Quando as seqüências dos genes eram comparadas com outros vertebrados, incluindo peixes, também eram muito similares; o mesmo não ocorreu com as seqüências NTS, as quais não foram semelhantes a qualquer outra já registrada. Para a família Curimatidae, o polimorfismo da região NTS parece ser suficiente para se distinguir espécies relacionadas (De ROSA et al., 2006).

Cyphocharax nagelii e *C. modestus* mostraram um *cluster* maior no par 3 e outro menor no par 20; *S. insculpta* mostrou um *cluster* grande somente no par 3 (presente trabalho). Foram obtidos dois *clusters* de rDNA 5S, um com monômeros de 180pb e outro com monômeros de 1600 pb, em *C. modestus* e *S. insculpta* (De ROSA et al., 2006). A presença destes dois *clusters* talvez explique a diferença cromossômica no tamanho dos sítios de rDNA 5S, evidenciada com hibridação *in situ* (De ROSA et al., 2006; presente trabalho).

De ROSA et al. (2006) argumentam que a presença de um cistron 5S maior e outro menor, ocupando diferentes cromossomos, também já foi observada nas famílias Anostomidae (MARTINS and GALETTI, 1999; AGUILAR and GALETTI, 2008) e Prochilodontidae (HATANAKA and GALETTI, 2004); diante disso, os autores sugerem que esta seria mais uma característica que corroboraria a monofilia proposta para Anostomidae, Curimatidae, Chilodontidae e Prochilodontidae (De ROSA et al., 2006). Por outro lado, na

tilapia *Oreochromis niloticus* (Perciformes) foi observada a mesma situação, ou seja, duas classes distintas do gene de rRNA 5S distribuídas em cromossomos distintos. O compartilhamento desta condição entre Characiformes e Perciformes, por exemplo, aponta para uma evolução independente desta característica (MARTINS et al., 2004).

Até o presente, o mapeamento físico do gene 5S talvez seja viável para separar gêneros nas espécies estudadas no presente trabalho. Contudo, com apenas dois registros sobre a localização física deste gene, qualquer inferência sobre a sua atuação como um bom marcador citogenético para os curimatídeos, seria muito precoce. A utilização recorrente desse marcador pode revelar algumas peculiaridades citogenéticas, assim como ocorreu com *Leporellus vittatus* (Anostomidae). Nesta espécie de anostomídeo, duas populações apresentaram diferenças quanto a localização e quantidade dos *clusters* de rDNA 5S. Os autores questionam se estas diferenças estariam relacionadas à ocorrência de um complexo de espécies para *Leporellus vittatus* (AGUILAR and GALETTI, 2008).

Os resultados cromossômicos obtidos na família Curimatidae permitem a sugestão de que rearranjos cromossômicos do tipo fissão cêntrica, inversão pericêntrica, translocação, transposição (FELDBERG et al., 1992; VENERE and GALETTI, 1989), e outros eventos que envolvam alterações de seqüências de DNA repetitivo, causando as diferenças no padrão de heterocromatina suscitada por VENERE et al. (2008), sejam responsáveis pela evolução cariotípica dos curimatídeos. No presente trabalho, o uso de sondas teloméricas (TTAGGG)_n em *C. nagelii*, corrobora a hipótese de que rearranjos do tipo fissão/fusão cêntrica seriam viáveis nos curimatídeos.

Em *C. nagelii* foram observadas marcações intersticiais em pelo menos dois pares cromossômicos, sendo um deles o par 1. De maneira geral, a localização intersticial de seqüências teloméricas viabilizaria rearranjos do tipo fissão cêntrica e corroboraria eventos de fusão cêntrica. Para MEYNE et al. (1990), a presença de sítios teloméricos intersticiais seria uma reserva de telômeros, que aumentaria a flexibilidade dos cariótipos. O uso de sonda telomérica em peixes, mostrou que as seqüências (TTAGGG)_n estão primariamente localizadas na região telomérica dos cromossomos (MEYNE et

al., 1989; PHILLIPS and REED, 1996; MOLINA and GALETTI, 2002, SILVA et al., 2009).

Contudo, espécies com DNA telomérico intersticial já foram descritas (PHILLIPS and REED, 1996). Na tilapia *Oreochromis niloticus*, os elementos do par 1 apresentaram marcação intersticial (CHEW et al., 2002); na raia *Torpedo ocellata*, os pares 1, 2 e 4 contêm sítios intersticiais de seqüências teloméricas (TTAGGG)_n (ROCCO et al., 2001). A condição intersticial de seqüências teloméricas foi obtida em outros grupos de organismos, tais como: no gênero de roedor *Akodon* (VENTURA et al., 2006) e no gênero de planta *Phaseolus* (GUERRA and KENTON, 1996), sendo a seqüência (TTTAGGG)_n usada na planta muito semelhante àquela usada para a grande maioria dos vertebrados.

Em todos os trabalhos citados, a presença de sítios intersticiais foi correlacionada a eventos de rearranjos cromossômicos durante a evolução cariotípica das espécies (GUERRA and KENTON, 1996; ROCCO et al., 2001; CHEW et al., 2002; VENTURA et al., 2006). Assim, estas seqüências teloméricas intersticiais também poderiam participar de quebras cromossômicas aberrantes, as quais evidenciariam estas seqüências como sítios frágeis (ROCCO et al., 2001; BOUFFLER et al., 1993).

Em *C. nagelii*, parece que o outro par portador de DNA telomérico corresponderia ao par 2. Se esta situação for validada com futuras hibridações *in situ*, a proposta de VENERE et al. (2008) de que o par dois de *Cyphocharax* teria dado origem aos cromossomos subtelocêntricos de *Cyphocharax platanus*, seria novamente confirmada. O comportamento de sondas teloméricas em *C. platanus* também deve ser averiguado, para que se possa, ter mais subsídios para o entendimento da evolução cariotípica desta espécie.

Em *C. nagelii*, os *clusters* de DNA ribossômico 18S estão localizados na posição terminal do par 6. Dessa forma, é coerente supor que DNA ribossômico e telomérico estão muito próximos nesta espécie. Como não foram realizados experimentos com os dois tipos de DNA simultaneamente, não foi possível determinar como é o arranjo dessas seqüências em *C. nagelii*. Exemplo de dupla hibridação com sonda de rDNA 5,8S e seqüências teloméricas pode ser visto na planta *Crepis capillaris*. O resultado deste experimento foi a perfeita visualização da adjacência entre esses dois tipos de seqüência nucleotídicas (LEACH et al., 2005).

O salmonídeo *Salvelinus namaycush*, tem três sítios de RON flanqueados com DNA telomérico (PHILLIPS and REED, 1996); na truta *Oncorhynchus mykiss* as seqüências teloméricas são coincidentes com as RON (ABUÍN et al., 1996); no gastrópode *Melarhaphe neritoides*, rDNA 18S está adjacente a seqüências (TTAGGG)_n (COLOMBA et al., 2002).

CHEW et al. (2002) encontrou na tilapia *Oreochromis niloticus*, seqüências de DNA medianamente repetitivas associadas ao telômero. Os autores sugerem que estas regiões seriam mais favoráveis à presença de DNA satélite ou ribossômico. Esta proposta parece verossímil quando, KILBURN et al. (2001) expõe em seu trabalho um pequeno resumo sobre a influência que sítios teloméricos poderiam provocar no genoma. DNA telomérico poderia afetar a expressão de alguns genes, a replicação e a recombinação durante as divisões celulares (KILBURN et al., 2001). A família Curimatidae seria um ótimo modelo para se estudar a relação entre DNA telomérico, rDNA 45S e heterocromatina. A presença desta tríade em algumas espécies de curimatídeos qualifica a família como um modelo investigativo.

Existe mais um detalhe que envolve sondas teloméricas e hibridação *in situ*. Os resultados com a utilização de seqüências teloméricas tem uma íntima relação com estringência da sonda, estringência de lavagem da técnica de hibridação, tamanho dos fragmentos da sonda e quantidade de cópias em um cluster. Assim, as hibridações com sondas teloméricas mostram variação no sinal, podendo apresentar cromossomos sem telômeros marcados; e, em alguns casos, afetar a visualização de sinais não teloméricos (ROCCO et al., 2001; CHEW et al., 2002; MOLINA and GALETTI, 2002; SILVA et al., 2009; presente trabalho).

Um exemplo desta complexidade técnica foi observada na tilapia *O. niloticus*, na qual sondas teloméricas com 150 pb (pares de base) mostravam sinais terminais em todos os cromossomos; em contrapartida, sondas com 400 pb reconheciam a região intersticial do par 1; a combinação dos dois tamanhos de fragmentos produzia sinal terminal e intersticial (CHEW et al., 2002).

SILVA et al. (2009) supõe que a ausência de sinais não teloméricos no peixe *Eigenmannia virescens* também pode ser conseqüência da modificação ou perda dessas seqüências após eventos de fusão cromossômica, ou ainda, ser resultado de rearranjos que não incluam regiões teloméricas.

No presente trabalho, a combinação de sonda telomérica com fragmentos de 100 a 800 pb, estringência de 77% ou 52% do mix de hibridação e estrigência de lavagem de 15% (Formamida) produziram marcações teloméricas e intersticiais em *C. nagelii*.

5.2. Cromossomos B de *Cyphocharax nagelii*

As análises sobre os cromossomos B de *C. nagelii* evidenciaram uma constância numérica intraindividual desse elemento. Essa constância sugere estabilidade mitótica dos cromossomos Bs. Na família Curimatidae cromossomos B também foram encontrados em *Cyphocharax modestus* (De ROSA et al., 2008; GRAVENA et al., 2007; MARTINS et al., 1996; VENERE and GALETTI, 1985), *Cyphocharax spilotus* (BRASSESCO et al., 2004), *Cyphocharax gouldingi* (VENERE et al., 2008) e em *Steindachnerina insculpta* (GRAVENA et al., 2007; OLIVEIRA and FORESTI, 1993). A presença de cromossomos B no gênero *Cyphocharax* e *Steindachnerina* parece confirmar a proximidade filogenética (Fig. 26) proposta para estes dois gêneros (VARI, 1989).

Os registros de frequência do cromossomo B em células somáticas de *C. modestus* descritos por De ROSA et al. (2008) e em uma população do estudo feito por GRAVENA et al. (2007), mostraram pouca variação intraindividual. Dessa maneira, a presença e a estabilidade mitótica do elemento adicional talvez seja uma característica compartilhada pelo gênero *Cyphocharax*. Cromossomos Bs mitoticamente estáveis também foram encontrados no peixe *Prochilodus lineatus* (VOLTOLIN et al., 2009), no coleóptero *Galerucella nymphaeae* (NOKKALA and NOKKALA, 1989), no homóptero *Rhinocola aceris* (NOKKALA et al., 2000) e na rã *Leiopelma hochstetteri* (SHARBEL et al., 1998).

C. nagelii apresentou poucas células variáveis intraindividualmente, as quais podem ter resultado de perdas ou ganhos durante as preparações cromossômicas e não por instabilidade mitótica causada, por exemplo, por não-disjunção (CAMACHO et al., 2000). No opilião *Metagagrella tenuipes* (atualmente *Psathyropus tenuipes*), GORLOV and TSURUSAKI (2000) explicam a variação intercelular no número de Bs por possíveis perdas ou

ganhos aleatórios durante as preparações cromossômicas. Apesar do trabalho com *M. tenuipes* ter sido considerado substancialmente controverso por CAMACHO (2004), a quantidade total de células analisadas em *C. nagelii*, valida a sugestão de que as poucas variações somáticas intraindividuais encontradas seriam decorrentes de perdas ou ganhos aleatórios.

A estabilidade mitótica pode ter como reflexo a estabilidade da frequência de B na população (quantidade de B/quantidade de indivíduos). As análises da frequência de cromossomos B em *Prochilodus lineatus*, no período de 1990 (CAVALLARO et al., 2000) a 2007, mostraram que não existe mudança significativa nesta frequência (VOLTOLIN et al., 2009). Estes autores sugerem que a constância numérica de cromossomos B em *P. lineatus* é consequência da estabilidade mitótica destes elementos, a qual teria causado sua neutralização. No presente estudo, a frequência dos cromossomos B foi estatisticamente igual entre diferentes coletas (Tabela 3). Assim, existe a possibilidade de que o cromossomo B da população de *C. nagelii* estudada no presente trabalho, tenha sido neutralizado pela sua estabilidade mitótica. Situação diferente desta pode ser encontrada nas análises do gafanhoto *Locusta migratoria* (PARDO et al., 1995). Neste estudo, os cromossomos B durante a mitose são instáveis devido a não-disjunção, evidenciando que nesta espécie existe um mecanismo de acúmulo (“drive”) de cromossomos B.

Através do estudo preliminar das células meióticas de *C. nagelii* foi possível constatar que o indivíduo (macho ou fêmea) com um cromossomo B nas metáfases mitóticas, tinha um supranumerário nas metáfases espermatogoniais e metáfases I; o indivíduo (macho) com dois B nas metáfases somáticas, tinha dois B em células metafásicas I. Dessa forma, o cromossomo B de *C. nagelii* poderia ser considerado estável pelo menos até a fase de metáfase I. Nestas análises também foram observadas metáfases I sem cromossomo B, o que poderia ser explicado por perdas ou sobreposição desses elementos considerando seu pequeno tamanho, e não por uma instabilidade meiótica desse elemento. A união dos dados sobre mitose, meiose e frequências dos cromossomos B de *C. nagelii*, indica ausência de mecanismo de acúmulo (drive) deste elemento, nesta espécie/população.

O estudo da meiose, mesmo sendo preliminar, confirma que o supranumerário de *C. nagelii*, está presente no tecido somático (renal) e

gonadal de machos e fêmeas. Condição diferente apresentou o ciclídeo *Gymnogeophagus balzanii*, o qual mostrou ter supranumerários somente no tecido gonadal de indivíduos machos (FELDBERG et al., 1984). A redução de cromossomos B no tecido somático foi correlacionada ao processo de diferenciação dos tecidos na planta *Xanthisma texanum* (BERGER et al., 1955). Em *Allium schoenoprasum*, cromossomos B parecem conferir vantagem seletiva durante os estágios iniciais de desenvolvimento desta espécie, sendo posteriormente eliminados dos tecidos somáticos (PLOWMAN and BOURGOURD, 1994). A atuação diferencial de genes, como ocorre em milho (GONZÁLEZ-SÁNCHEZ et al., 2003), talvez explique a variação entre diferentes tecidos quanto a presença ou ausência de cromossomos B.

Nos espermátocitos II de *C. nagelii* não foi possível distinguir os cromossomos B, talvez porque eles estivessem muito condensados e pequenos; dessa forma, também poderiam não ser visualizados devido às sobreposições ou perdas. Mesmo em MII submetidas a bandamento C não foi possível identificar o cromossomo B. A aplicação do bandamento C em espermátocitos I, corroborou a natureza heterocromática do cromossomo B de *C. nagelii*.

Quanto à sinapse, o cromossomo B nas metáfases I de macho e de fêmea, se comportavam como univalentes, mesmo quando existiam dois B. Algumas hipóteses poderiam ser suscitadas frente a este comportamento, por exemplo: a natureza heterocromática do cromossomo poderia ser sugerida como impedimento para seu emparelhamento (SUMNER, 2003).

Conseqüências dessa univalência também poderiam ser abordadas, tais como: cromossomos univalentes podem ter segregação irregular durante a meiose I. De maneira geral, estes podem migrar precocemente ou tardiamente para os pólos durante a anáfase I; segregação tardia pode levar a perda pela formação de micronúcleo na telófase I (JONES and REES, 1982; BAPTISTA-GIACOMELLI et al., 2000; GONZÁLEZ-SÁNCHEZ et al., 2003; RICCI et al., 2007). Esta argumentação poderia ter como conclusão a idéia de instabilidade meiótica do cromossomo B de *C. nagelii*. Contudo, um aumento na quantidade de indivíduos analisados, o acompanhamento desse elemento ao longo de todas as fases da meiose, o uso de diferentes técnicas, tais como de complexo

sinaptonêmico, são imprescindíveis para que possa determinar com maior precisão o comportamento meiótico do cromossomo B de *C. nagelii*.

Estas sugestões, deparam-se com os resultados sobre microdissecção do cromossomo B em *C. nagelii*, a qual mostrou que estes elementos compartilham muitas seqüências nucleotídicas entre si. Assim, estes elementos teriam homologia suficiente para formar sinapse. Entretanto, apesar de ser um dos pré-requisitos, somente a similaridade na seqüência de bases não estabelece o reconhecimento (PAWLOWSKI et al., 2003), alinhamento e sinapse entre seqüências homólogas dos cromossomos (SCHWARZACHER, 2003). Novamente a questão amostral deixará dúvidas sobre os reais motivos de não serem encontrados bivalentes nas metáfases I de *C. nagelii*. Seria por falha nas proteínas, pela condição heterocromática ou seria por uma questão de quantidade de células observadas?

Nos meiócitos I de *C. nagelii* foram vistos até seis bivalentes com configuração quiasmática. Em JONES and REES (1982), existem exemplos que correlacionam a presença de cromossomos B com alterações na freqüência e posição de quiasmas nos cromossomos regulares. No presente trabalho, não foram realizados estudos meióticos em indivíduos não portadores de B. Assim, nada pode ser inferido sobre esta possível atuação dos cromossomos B.

A análise do comportamento meiótico do cromossomo B de *P. lineatus*, mostrou que eles podem se comportar como univalentes ou multivalentes; além disso, que eles estão presentes em todas as fases da meiose em proporções mendelianas (PAULS and BERTOLLO, 1983; DIAS et al., 1998). Reunindo as informações sobre mitose (VOLTOLIN et al., 2009) e meiose do cromossomo B de *P. lineatus* parece inevitável concluir que esse elemento seria estável mitótica- e meioticamente. Diante disso, surge uma pergunta: Qual será o próximo passo evolutivo do cromossomo B de *P. lineatus*? A resposta poderia ser a integração desse elemento ao complemento regular, assim como sugerido para a vespa *Trypoxylon albitarse* (ARAÚJO et al., 2002). Os resultados sobre cromossomos B mostrados no presente trabalho para *C. nagelii*, parece que serão similares àqueles encontrados em *P. lineatus*.

Cyphocharax nagelii e *P. lineatus*, pertencem a famílias que são filogeneticamente consideradas como irmãs. De maneira geral, compartilham o

mesmo número diplóide de cromossomos, padrão de bandamento C semelhante, ausência de cromossomos sexuais diferenciados, um par de AgRON, entre outras características. Dessa forma, o aumento das análises quantitativas e qualitativas dos cromossomos B de *C. nagelii* poderia mostrar que existem semelhanças comportamentais e estruturais relacionadas a estes elementos adicionais, entre as duas espécies. Essas informações poderiam fornecer subsídios para uma hipótese de origem desse elemento através de um ancestral comum a estas espécies.

Os cromossomos B poderiam surgir, por exemplo, a partir de cromossomos regulares do complemento (JONES and REES, 1982; CAMACHO et al., 2000; JONES, 1995). Em *C. nagelii*, a sonda microdissectada do cromossomo B não mostrou sinal de hibridação nos autossomos. A falta de homologia entre o B e os autossomos de *C. nagelii* não exclui a possibilidade de que a sua origem tenha ocorrido a partir desses cromossomos regulares, considerando que o B pode ter passado por transformações drásticas ao longo da evolução, as quais estariam de acordo com a hipótese da catraca de Muller (GREEN, 1990).

Em *Nyctereutes procyonoides viverrinus*, sinais de hibridação entre os autossomos e os cromossomos B microdissectados dessa espécie não foram obtidos (TRIFONOV et al., 2002). Esses autores atribuíram a falta de homologia à origem *de novo* das seqüências nucleotídicas no B ou a um baixo número de cópias da seqüência genômica original, as quais não seriam detectadas pela FISH. As hipóteses sugeridas por TRIFONOV et al. (2002) também poderiam ser aplicadas a *C. nagelii*. Por outro lado, os supranumerários também podem ter sido originados por hibridização cariotípica interespecífica (JONES and REES, 1982). Contudo, homologia entre as seqüências do B de *C. nagelii* e os cromossomos do complemento A de *C. modestus* e de *S. insculpta* não foi observada. Assim, não existem indícios da origem desse elemento por hibridização.

No presente trabalho, foi realizada a técnica de hibridação *in situ* fluorescente utilizando sonda de DNA telomérico, buscando averiguar a capacidade de amplificação proporcionada pela técnica de microdissecção cromossômica. Considerando o aspecto funcional e conservado das seqüências teloméricas, o óbvio ocorreu, ou seja, as regiões teloméricas do

cromossomo B e dos cromossomos do complemento A de *C. nagelii* foram hibridadas. Sendo assim, além de serem pequenas as quantidades de DNA microdissectado (TRIFONOV et al., 2002), a técnica pode não ser capaz de amplificar todas as seqüências do cromossomo B.

No caso do DNA telomérico, a falta de amplificação também pode ter relação com a sua conformação diferencial em forma de *loop*, ou ainda pela falta de homologia dos *primers* de DOP com as seqüências (TTAGGG)_n dos telômeros. Apesar dos *primers* serem degenerados, as chances de se obter na região degenerada as seqüências teloméricas é muito baixa, e talvez seja insuficiente para amplificar essas regiões.

A hibridação com a sonda do B em *C. nagelii* sugere que eles estejam inteiramente hibridados. Contudo, duas situações podem favorecer esta visualização: a primeira seria o pequeno tamanho destes elementos; a segunda seria a estringência de lavagem da hibridação *in situ*. Considerando todos esses aspectos, a sugestão de que os cromossomos B compartilham seqüências com o complemento regular de *C. nagelii* ou até mesmo com *C. modestus* e *S. insculpta*, não pode ser, de maneira alguma, descartada. A solução para tal impasse seria a realização do dispendioso e árduo trabalho de produção e manutenção de uma biblioteca (TERUEL et al., 2009) com fragmentos do cromossomo B de *C. nagelii*. Não se pode esquecer que trabalhos de hibridação *in situ*, igualmente caros, devem ser realizados com os fragmentos da biblioteca.

O aspecto interessante da microdissecção em *C. nagelii* é o compartilhamento de muitas seqüências entre os cromossomos B, fato que nem o aumento na estringência na lavagem da hibridação *in situ* poderia alterar drasticamente. Esta impossibilidade tem relação com o uso de 77% de estringência da sonda, aliada ao fato de que os cromossomos B microdissectados pertenciam a um indivíduo com um cromossomo B por célula.

O compartilhamento de seqüências entre os B de *C. nagelii* sugere uma constante e particular organização genética entre estes elementos. Segundo JONES (1995), esta peculiaridade poderia assegurar que os B fossem transmitidos sem necessariamente terem função adaptativa. O autor ainda sugere que essa constância cromossômica pode ultrapassar o limite de diferenciação de espécie. Nas espécies de planta *Secale cereale* e *Secale*

afghanicum, os cromossomos B são morfológicamente muito parecidos. Esta situação é então explicada através da “seleção” da particular organização genética do cromossomo B, a qual garantiria sua transmissão. Seria interessante testar esta possibilidade de transcendência envolvendo os cromossomos B de *C. nagelii* e de *C. modestus*, os quais são morfológicamente muito parecidos.

De maneira geral, em peixes existem espécies que possuem cromossomos B macroestruturalmente muito semelhantes, como em *Moenkhausia sanctaefilomenae* (FORESTI et al., 1989) e espécies com supranumerários diferentes em sua macroestrutura, como em *Astyanax scabripinnis* (MAISTRO et al., 1994, 2001).

Seqüências repetitivas de DNA ou DNA satélite também podem ser isoladas pelo uso de enzimas de restrição, pela técnica de AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), ou ainda diretamente através de PCR com primers específicos para regiões repetitivas (NIJMAN et al., 2003; PALOMEQUE and LORITE, 2008). Assim como a microdissecação, essas técnicas também foram empregadas para o estudo da estrutura nucleotídica de cromossomos supranumerários.

Em *Astyanax scabripinnis*, com o uso de enzima de restrição foi isolada uma seqüência de DNA satélite, com a qual foi possível, após hibridação *in situ* fluorescente, sugerir que o macro-cromossomo B dessa espécie teria sido um isocromossomo (MESTRINER et al., 2000). Utilizando a mesma estratégia, JESUS et al. (2003) isolou duas seqüências de DNA satélite da espécie *Prochilodus lineatus*. A hibridação *in situ* com essas duas seqüências mostrou sinal nos cromossomos B e nos cromossomos A, indicando que os cromossomos B em *P. lineatus* teriam origem a partir do complemento cromossômico regular. No macrocromossomo B de *Alburnus alburnus*, com o uso da técnica de AFLP foi possível determinar que este elemento está constituído de seqüências de retrotransposon; além disso, a FISH utilizando estas seqüências não evidenciou nenhuma marcação nos cromossomos A. Os autores ZIEGLER et al. (2003) sugerem que o B de *A. alburnus* teria evoluído de forma independente, pela própria dinâmica que envolve elementos transponíveis.

No presente trabalho, enzimas de restrição também foram empregadas para se tentar isolar seqüências do cromossomo B de *C. nagelii*. Foram testadas as enzimas: Alu I, Eco RI, Eco RV, Rsa I, BamH, Hae III, Dra I, Hinf I, Not I, Kpn I, Msp I, Xba I e Nhe I. Somente a enzima Alu I, a qual é considerada de corte freqüente, produziu bandas em gel de agarose a 3%. Essas bandas são consideradas evidências de DNA satélite. As bandas obtidas parecem não ser exclusivas do cromossomo B de *C. nagelii*, pois o padrão obtido foi semelhante para o DNA de indivíduos com B e para indivíduos sem B (dados não mostrados).

Nas análises citogenéticas feitas em *C. modestus* (De ROSA et al., 2008) e em *C. nagelii* um número maior de machos portadores de supranumerários foi observado. No estudo cromossômico de *C. modestus* (De ROSA et al., 2008) foram analisados mais indivíduos fêmeas, e apesar disso, foram encontrados mais machos portadores de cromossomos B. No presente trabalho, a amostragem total de indivíduos machos analisados foi maior do que de fêmeas, e a maior quantidade de indivíduos portadores de cromossomos B também foi de machos (Tabela 2).

No estudo citogenético realizado por BORIN and MARTINS-SANTOS (2004) no gênero *Pimelodus* (Pimelodidae), machos com cromossomos B predominaram na amostragem. A sugestão de que as fêmeas seriam mais intolerantes ao cromossomo adicional foi utilizada para explicar a predominância de B no sexo masculino (BORIN and MARTINS-SANTOS, 2004). A hipótese de que fêmeas seriam mais intolerantes foi igualmente utilizada por SANTOS et al. (2008) para justificar a predominância de machos portadores de B em *C. modestus*.

A predominância de machos de *C. nagelii* (presente trabalho) com cromossomos B poderia estar correlacionada a maior quantidade de machos estudados. Entretanto, a hipótese de que as fêmeas de *C. nagelii* seriam mais susceptíveis aos cromossomos B não pode ser totalmente descartada. O fato de que três ou quatro cromossomos B foram encontrados somente em espécimens machos, tanto em *C. nagelii* quanto em *C. modestus* (De ROSA et al., 2008), corrobora a hipótese do possível efeito deletério desses elementos em fêmeas do gênero *Cyphocharax*. O número máximo de quatro cromossomos B foi somente encontrado em espécimens machos de

Cyphocharax (De ROSA et al., 2008; presente trabalho). Assim, a presença de muitos cromossomos B em machos também seria desvantajosa, provavelmente pelo efeito deletério que o acúmulo desses elementos poderia provocar na célula, como sugerido por JONES and REES (1982), CAMACHO et al. (2000), JONES and HOUBEN (2003), De ROSA et al. (2008).

Analisando os resultados sobre cromossomos B de *C. nagelii*, com relação a sua estabilidade mitótica, a sua similaridade estrutural e até mesmo utilizando os resultados preliminares da meiose, não existe nenhum indício de que exista um mecanismo de acúmulo desse elemento. Os dados parecem sinalizar uma possível neutralidade desse elemento. Assim, a presença de um maior número de machos portadores de cromossomos B talvez seja na verdade, apenas um efeito da aleatoriedade das coletas, e o número máximo de quatro B seja uma limitação da própria fisiologia celular.

Os intensos sinais de hibridação *in situ* em cromossomos B de *Locusta migratória* (Orthoptera) e de *Apodemus peninsulae* (Rodentia), cujas sondas foram obtidas por microdissecção, indicaram a natureza repetitiva das seqüências nucleotídicas desse elemento (KARAMYSHEVA et al., 2002; TERUEL et al., 2009). Em *C. nagelii*, os sinais de hibridação foram igualmente intensos, revelando uma correlação positiva entre sinal e saturação de seqüências de DNA repetitivo. O padrão de bandamento C mostrou o cromossomo B de *C. nagelii* heterocromático, confirmando a natureza do DNA que constitui este elemento.

A utilização de sonda telomérica, forneceu sinais de hibridação com tamanhos semelhantes entre os cromossomos B e aqueles do complemento A. Segundo HOUBEN et al. (1997), um padrão no tamanho do sinal telomérico poderia indicar que os B e os cromossomos regulares teriam quantidades de repetições (TTAGGG) semelhantes.

A coloração com fluorocromos base-específicos DAPI e CMA₃ indicou que as seqüências repetitivas do cromossomo B de *C. nagelii* não concentram regiões ricas em bases AT ou GC (SCHWEIZER, 1980). Por outro lado, a coloração com CMA₃ mostrou ser positiva na região autossômica correspondente ao sítio de rDNA 18S e de AgRON positiva. Estes resultados confirmam que os cromossomos B realmente não possuem seqüências de bases de DNA ribossômico e não tem concentrações de bases GC e/ou AT.

O cromossomo B do peixe *Rhamdia hilarii* também não contém regiões ricas em GC, pois foi CMA₃ negativo (MAISTRO et al., 2002). Marcação CMA₃ positiva foi obtida no macro-cromossomo B de *Astyanax scabripinnis*, adicionalmente, somente as regiões de rDNA foram marcadas. O cromossomo B de *A. scabripinnis* é totalmente heterocromático, assim a coloração com CMA₃ sugere que existem diferenças entre a heterocromatina do B e aquela dos cromossomos do complemento A (MAISTRO et al., 2001). Região CMA₃ positiva no cromossomo B foi igualmente obtida em *Leporinus* sp. (VENERE et al., 1999).

Em *C. modestus* também não foram encontrados sítios de rDNA 5S ou 18S, e nem marcação nucleolar nos cromossomos B desta espécie (De ROSA et al., 2006, 2007). Regiões de rDNA são compostas por seqüências altamente repetitivas e suscetíveis a constantes quebras, que podem resultar na formação de cromossomos B (CAMACHO et al., 2000). *Clusters* de rDNA 18S já foram observados no cromossomo B do peixe *Moenkhausia sanctaefilomenae*-Characidae (SOBRINHO-SCUDELER et al., 2009), do roedor *Apodemus peninsulae* (MATSUBARA et al., 2004) e na planta *Crepis capillaris* (LEACH et al., 2005). A presença de seqüências de DNA ribossômico nos supranumerários pode confirmar a origem desses elementos a partir do complemento A (MATSUBARA et al., 2008); ou então, a sua vantagem seletiva, no caso destes sítios serem funcionais. Em *M. sanctaefilominae* o cromossomo B também é impregnado pela prata, sugerindo a sua atividade; em *C. capillaris* experimentos demonstraram que o rDNA do cromossomo B é transcricionalmente ativo (LEACH et al., 2005; SOBRINHO-SCUDELER et al., 2009).

6. Conclusões

Os resultados apresentados no presente trabalho, obtidos das espécies *Cyphocharax nagelii*, *Cyphocharax modestus* e *Steindachnerina insculpta* permitiram algumas conclusões, tais como:

- Conservação macroestrutural dos cromossomos na família Curimatidae como consequência de uma organização genética favorável para este grupo;
- A meiose de *C. nagelii* sugere que esta espécie experimenta muitos eventos de recombinação, caso a presença de quiasmas nesta espécie esteja sempre correlacionada à permuta entre os cromossomos;
- Ausência de cromossomos sexuais diferenciados, tanto nas análises mitóticas das três espécies, quanto naquelas realizadas na meiose de *C. nagelii*;
- *Clusters* de rDNA 45S e 5S não organizados em sintenia, nas três espécies, talvez seja um aspecto favorável;
- A variação interespecífica dos genes ribossômicos, juntamente com variações no padrão de bandamento C, mostra que a evolução cariotípica nos curimatídeos foi acompanhada de mudanças microestruturais;
- A heterocromatina presente nos *clusters* de rRNA 18S parece exercer função protetora destas região;
- Utilização de sondas teloméricas (TTAGGG)_n na espécie *C. nagelii*, permitiu a visualização dos telômeros dos cromossomos do complemento A e do cromossomo supranumerário, mostrando que apesar da técnica de microdissecção não evidenciar tal acontecimento, os dois tipos de cromossomos compartilham seqüências de DNA. Além disso, seqüências teloméricas intersticiais nos autossomos foram observadas, confirmando a hipótese de que rearranjos do tipo fissão/fusão cêntricas podem ser responsáveis pela evolução cariotípica dos curimatídeos;
- A natureza repetitiva do DNA que compõe o cromossomo B de *C. nagelii*, sendo inferida através de bandamento C, o qual mostrou este elemento heterocromático, e do sinal obtido na hibridação *in situ* com o produto da microdissecção de um B;
- O comportamento do cromossomo B nas células somáticas de *C. nagelii*, sugere que este elemento seja mitoticamente estável e neutro.
- Frequências dos cromossomos B estáveis na população de *C. nagelii*, corroborando sua neutralidade e estabilidade;
- O fato dos cromossomos B de *C. nagelii* compartilharem muitas seqüências entre si, talvez seja resultado da seleção de uma organização nucleotídica favorável a sua transmissão sem mecanismo de acúmulo;

-A constatação de que os supranumerários de *C. nagelii* têm uma heterocromatina sequencialmente complexa, pois são DAPI e CMA₃ negativos, e não possuem sítios de DNA ribossômico 5S ou 18S.

7. Perspectivas

Na família Curimatidae das 98 espécies descritas taxonomicamente, em 36 espécies foram realizadas análises citogenéticas; em alguns casos mais de uma população da mesma espécie foi caracterizada cromossomicamente. As principais técnicas citogenéticas utilizadas foram: coloração convencional Giemsa, impregnação pela prata e bandamento C. Para um grupo de peixes que apresenta tantas similaridades macroestruturais e até mesmo microestruturais, talvez seja interessante o investimento em técnicas de citogenética molecular em futuros estudos. Apesar de existirem aspectos negativos quanto ao uso dessas técnicas, principalmente quanto ao tempo empregado para a obtenção dos resultados e quanto aos custos dos reagentes e equipamentos. O uso da impregnação pela prata foi eficiente para mostrar a variabilidade intra- e interespecífica das RON existente na família Curimatidae. No entanto, existem aspectos muito interessantes que envolvem estas regiões, tais como a coexistência de banda C positiva e de coloração com CMA₃. Seria o gene de rRNA 45S rico em bases GC ou seria a heterocromatina presente nesta região? Além disso, como seria a organização entre heterocromatina, RON e seqüências teloméricas? São algumas perguntas que necessitam de investimento molecular para serem respondidas. Diferenças obtidas no padrão de bandamento C entre as espécies do presente trabalho e em outras análises, com o padrão obtido por VENERE et al. (2008) seriam conseqüências da técnica? O conhecimento de seqüências de DNA repetitivo, como exemplo, de DNA satélite, e o mapeamento físico dessas seqüências nos curimatídeos talvez pudesse responder satisfatoriamente esta dúvida. É evidente que a citogenética clássica ainda é importante e imprescindível, pois as primeiras análises de novas populações/espécies necessitam, *a priori*, de informações sobre o número diplóide e morfologia cromossômica; ademais, alguns rearranjos ou heteromorfismos cromossômicos são visíveis somente com o uso

de coloração convencional Giemsa. Um outro exemplo que necessita a princípio somente da citogenética clássica é a determinação do comportamento meiótico do cromossomo B de *C. nagelii*, em todas as fases da gametogênese. O problema da análise cromossômica da gametogênese de *C. nagelii* talvez seja o longo período reprodutivo desta espécie, a qual apresenta desova parcelada. Dessa forma, conseguir ovários que não estejam desenvolvidos e testículos que não estejam repletos de espermatozoides, é uma tarefa complicada. Quando estas estruturas estão em período reprodutivo fica difícil conseguir boas preparações cromossômicas. Finalmente, a família Curimatidae a princípio parece pouco interessante sob o ponto de vista citogenético, considerando alguns aspectos conservados. Entretanto, as propriedades cromossômicas microestruturais mostram que existe um universo de possibilidades a serem exploradas nos estudos citogenéticos dos curimatídeos. Os resultados do presente trabalho envolvendo microdissecção cromossômica, sondas de DNA ribossômico 18S e 5S, seqüências teloméricas, bandamento C e fluorocromos base-específicos, corroboram a idéia de infinitas possibilidades de estudos citogenéticos na família Curimatidae.

8. Referências Bibliográficas

- ABUÍN, M.; MARTÍNEZ, P.; SÁNCHEZ, L. Localization of the repetitive telomeric sequence (TTAGGG)_n in four salmonid species. **Genome**, v. 39, p. 1035-1038, 1996.
- AGUILAR, C.T.; GALETTI, P.M. Chromosome mapping of 5S rRNA genes differentiates Brazilian populations of *Leporellus vittatus* (Anostomidae, Characiformes). **Genetic and Molecular Biology**, v. 31, p. 188-194, 2008.
- ALFENITO, M.R.; BIRCHLER, J.A. Molecular characterization of a maize B-chromosome centric sequence. **Genetics**, v. 135, p. 589-597, 1993.
- ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; FORESTI, F.; TOLEDO-FILHO, S.A.; BERNARDINO, G.; FERRARI, W.; ALCANTARA, R.C.G. Cytogenetics studies in *Colossoma mitrei*, *Colossoma macropomum* and their interspecific hybrids. **Selection, Hybridization and Genetic Engineering in Aquaculture**, v. 1, p. 190-195, 1987.
- ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; OZOUF-COSTAZ, C.; FORESTI, F.; BONILHO, C.; PORTO-FORESTI, F.; DANIEL-SILVA, M.F.Z. Conservation of the 5S bearing chromosome pair and co-localization with major rDNA clusters in five species of *Astyanax* (Pisces, Characidae). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 97, p. 229-233, 2002.
- ALVARENGA, E.R.; BAZZOLI, N.; GILMAR, B.S.; RIZZO, E. Reproductive biology and feeding of *Curimatella lepidura* (Eigenmann & Eigenmann) (Pisces, Curimatidae) in Juramento reservoir, Minas Gerais, Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 23, p. 314-322, 2006.
- ARAÚJO, S.M.S.R.; POMPOLO, S.G.; PERFECTTI, F.; CAMACHO, J.P.M. Integration of a B chromosome into the A genome of a wasp, revisited. **Proceedings of the Royal Society of London B**, v. 269, p. 1475-1478, 2002.
- ARTONI, R.F.; WAGNER, F.M.; BERTOLLO, L.A.C.; GALETTI, P.M. Heterochromatin analysis in the fish species *Liposarcus anisitsi* (Siluriformes) and *Leporinus elongates* (Characiformes). **Genetics and Molecular Biology** (on line), v. 22, n. 1, 1999.

- ARTONI, R.F.; BERTOLLO, L.A.C. Nature and distribution of constitutive heterochromatin in fishes, genus *Hypostomus* (Loricariidae). **Genetica**, v. 106, p. 209-214, 1999.
- ARTONI, R.F.; BERTOLLO, L.A.C. Evolutionary aspects of the ZZ/ZW sex chromosome system in the Characidae fish, genus *Triportheus*. A monophyletic state and NOR location on the W chromosome. **Heredity**, v. 89, p. 15-19, 2002.
- ATA, A.T.M.; SHAHIN, A.A.B. C-heterochromatin and chiasma terminalization in the jerboas *Allactaga* and *Jaculus* (Rodentia: Dipodidae). **Belgian Journal of Zoology**, v. 136, p. 59-67, 2006.
- BAPTISTA-GIACOMELLI, F.R.; PAGLIARINI, M.S.; ALMEIDA, J.L. Elimination of micronuclei from microspores in Brazilian oat (*Avena sativa* L.) variety. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, p. 681-684, 2000.
- BELLAFRONTE, E.; MARGARIDO, V.P.; MOREIRA-FILHO, O. Cytotaxonomy of *Parodon nasus* and *Parodon tortuosus* (Pisces, Characiformes). A case of synonymy confirmed by cytogenetic analyses. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, p. 710-716, 2005.
- BERGER, C.A.; McMAHON, R.M.; WITKUS, E.R. The cytology of *Xanthisma texanum* D.C. III. Differential somatic reduction. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, v. 82, p. 377-382, 1955.
- BERTOLLO, L.A.C.; TAKAHASHI, C.S.; MOREIRA-FILHO, O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Revista Brasileira de Genética**, v. 1, p. 103-120, 1978.
- BERTOLLO, L.A.C.; MOREIRA-FILHO, O.; FONTES, M.S. Karyotypic diversity and distribution in *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae): Cytotypes with 2n=40 chromosomes. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 20, p. 237-242, 1997.
- BORIN, L.A.; MARTINS-SANTOS, I.C. Study on karyotype and occurrence of B chromosomes in two endemic species of the genus *Pimelodus* (Siluriformes, Pimelodidae) from the river Iguaçu. **Hereditas**, v. 140, p. 201-209, 2004.
- BOUFFLER, S.; SILVER, A.; PAPWORTH, D.; COATES, J.; COX, R. Murine radiation myeloid leukaemogenesis: relationship between interstitial telomere-like sequences and chromosome-2 fragile sites. **Genes, Chromosomes and Cancer**, v. 6, p. 98-106, 1993.

- BOUGOURD, S.M.; JONES, R.N. B chromosomes: a physiological enigma. **New Phytologist**, v. 137, p. 43-54, 1997.
- BRASSESCO, M.S.; PASTORI, M.C.; RONCATI, H.A.; FENOCCHIO, A.S. Comparative cytogenetic studies of Curimatidae (Pisces, Characiformes) from the middle Paraná River (Argentina). **Genetics and Molecular Research**, v. 3, p. 293-301, 2004.
- BUCKUP, P.A. The monophyly of Characidiinae, a neotropical group of Characiformes fishes (Teleostei, Ostariophysi). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 108, p. 225-245, 1993.
- BUCKUP, P.A. Relationships of the Characidiinae and phylogeny of characiform fishes (Teleostei: Ostariophysi). In: Phylogeny and classification of neotropical fishes (Malabarba, L.R.; Reis, R. E.; Vari, R. P.; Lucena, Z. M. & Lucena C. A. S., ed.),. Porto Alegre: **Edipurcs**, p. 123-144, 1998.
- CAMACHO, J.P.M.; SHARBEL, T.F.; BEUKEBOOM, L.W. B-chromosome evolution. **Philosophical Transactions of the Royal Society London**, v. 355, p.163-178, 2000.
- CAMACHO, J.P.M. The evolution of the genome. **Academic Press**, 2004.
- CANO, J.; PRETEL, A.; MELENDEZ, S.; GARCIA, F.; CAPUTO, V.; FENOCCHIO, A.S.; BERTOLLO, L.A.C. Determination of early stages of sex chromosome differentiation in the sea bass *Dicentrarchus labrax* L. (Pisces:Perciformes). **Cytobios**, v. 87, p. 45-49, 1996.
- CARVALHO, C.; PEREIRA, H.M.; FERREIRA, J.; PINA, C.; MENDONÇA, D.; ROSA, A.C.; CARMO-FONSECA, M. Chromosomal G-dark bands determine the spatial organization of centromeric heterochromatin in the nucleus. **Molecular Biology of the Cell**, v. 12, p. 3563-3572, 2001.
- CARVALHO, L.M.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Cytogenetic analysis of three species of the families Characidae and Curimatidae (Teleostei, Characiformes) from the Acre River. **Chromosome Science**, v. 5, p. 91-96, 2001.
- CARVALHO, R.A.; MARTINS-SANTOS, I.C.; DIAS, A.L. B chromosomes: an update about their occurrence in freshwater Neotropical fishes (Teleostei). **Journal of Fish Biology**, v. 72, p. 1907-1932, 2008.

- CAVALLARO, Z.I.; BERTOLLO, L.A.C.; PERFECTTI, F.; CAMACHO, J.P.M. Frequency increase and mitotic stabilization of a B chromosome in the fish *Prochilodus lineatus*. **Chromosome Research**, v. 8, p. 627-634, 2000.
- CENTOFANTE, L.; BERTOLLO, L.A.C.; MOREIRA-FILHO, O. Chromosomal differentiation between populations of *Oligosarcus hepsetus* (Teleostei, Characidae) from small tributaries at opposite margins of the Paraíba do Sul River (Brazil). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 6, p. 981-987, 2006.
- CHENG, Y-M.; LIN, B-Y. Cloning and characterization of maize B chromosome sequences derived from microdissection. **Genetics**, v. 164, p. 299-310, 2003.
- CHEW, J.S.K.; OLIVEIRA, C.; WRIGHT J.M.; DOBSON, M.J. Molecular and cytogenetic analysis of the telomeric (TTAGGG)_n repetitive sequences in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae). **Chromosoma**, v. 111, p. 45-52, 2002.
- CHIRINO, M.G.; FOLGARAIT, P.J.; GILBERT L.E.; LANZAVECCHIA S.; PAPESCHI A.G. Cytogenetic analysis of three species of *Pseudacteon* (Diptera, Phoridae) parasitoids of the fire ants using standard and molecular techniques. **Genetics and Molecular Biology**, v. 32, n.4, p. 740-747, 2009.
- CIPRIANO, R.R.; FENOCCHIO, A.S.; ARTONI, R.F.; MOLINA, W.; NOLETO, R.B.; KANTEK, D.L.Z.; CESTARI, M.M. Chromosomal studies of five species of the marine fishes from the Paranaguá Bay and the karyotypic diversity in the marine Teleostei of Brazilian Coast. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, p. 303-314, 2008.
- COLOMBA, M.S.; VITTURI, R.; CASTRIOTA, L.; BERTONI, R.; LIBERTINI, A.; FISH mapping of 18S-28S and 5S ribosomal DNA, (GATA)_n and (TTAGGG)_n telomeric repeats in the periwinkle *Melarhaphé neritoides* (Prosobranchia, Gastropoda, Caenogastropoda). **Heredity**, v. 88, p. 381-384, 2002.
- De ROSA, L.V.S.; FORESTI, F.; WASKO, A.P.; OLIVEIRA, C.; MARTINS, C. Nucleotide sequence, genomic organization and chromosome localization of 5S rDNA in two species of Curimatidae (Teleostei, Characiformes). **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, p. 251-256, 2006.
- De ROSA, L.V.S.; FORESTI, F.; MARTINS, C.; OLIVEIRA, C.; SOBRINHO, P.E.; WASKO, A.P. Cytogenetic analyses of two Curimatidae species

- (Pisces; Characiformes) from the Paranapanema and Tietê Rivers. **Brazilian Journal of Biology**, v. 67, p. 333-338, 2007.
- De ROSA, L.V.S.; FORESTI, F.; MARTINS, C.; OLIVEIRA, C.; WASKO, A.P. Identification and description of distinct B chromosomes in *Cyphocharax modestus* (Characiformes, Curimatidae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, p. 265-269, 2008.
- DIAS, A.L.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Synapsis in supernumerary chromosomes of *Prochilodus lineatus* (Teleostei: Prochilodontidae). **Caryologia**, v. 51, n. 2, p. 105-113, 1998.
- DILLON, N. Heterochromatin structure and function. **Biology of the Cell**, v. 96, p. 631-637, 2004.
- DINIZ, D.; BERTOLLO, L.A.C. Intra- and inter-individual chromosome variation in *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Pisces, Erythrinidae). A population from the Brazilian São Francisco river basin. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, p. 453-458, 2006.
- DINIZ, D.; LAUDICINA, A.; CIOFFI, M.B.; BERTOLLO, L.A.C. Microdissection and whole chromosome painting. Improving sex chromosome analysis in *Triportheus* (Teleostei, Characiformes). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 122, p. 163-168, 2008.
- DUKE UNIVERSITY. 2009. Disponível em www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm. Acesso em 12 de Dezembro de 2009.
- FELDBERG, E.; BERTOLLO, L.A.C. Discordance in chromosome number among somatic and gonadal tissue cells of *Gymnogeophagus balzanii* (Pisces:Cichlidae). **Revista Brasileira de Genética**, v. 7, p. 639-645, 1984.
- FELDBERG, E.; BERTOLLO, L.A.C.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; FORESTI, F.; MOREIRA-FILHO, O.; SANTOS, A.F. Biological aspects of Amazonian fishes. IX. Cytogenetic studies in two species of the genus *Semaprochilodus* (Pisces, Prochilodontidae). **Genome**, v. 29, p. 1-4, 1987.
- FELDBERG, E.; PORTO, J.I.R.; BERTOLLO, L.A.C. Karyotype evolution in Curimatidae (Teleostei, Characiformes) of the Amazon region. I. Studies on the genera *Curimata*, *Psectrogaster*, *Steindachnerina* and *Curimatella*. **Revista Brasileira de Genética**, v. 15, p. 369-383, 1992.
- FELDBERG, E.; PORTO, J.I.R.; NAKAYAMA, C.M.; BERTOLLO, L.A.C. Karyotype evolution in Curimatidae (Teleostei, Characiformes) from the

- Amazon region. II. Centric fissions in the genus *Potamorhina*. **Genome**, v. 36, p. 372-376, 1993.
- FELDBERG, E.; PORTO, J.I.R.; ALVES-BRINN, M.N.; MENDONÇA, M.N.C.; BENZAQUEM, D.C. B chromosomes in Amazonian cichlid species. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 106, p. 195-198, 2004.
- FERNANES, C.A.; MARTINS-SANTOS, I.C. Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Teleostei, Characidae) from the upper Paraná river basin, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, p. 464-468, 2006.
- FORESTI, F.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; TOLEDO, S.A. Supernumerary chromosome system, C-banding pattern characterization and multiple nucleolus organizer regions in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Pisces, Characidae). **Genetica**, v. 79, p. 107-114, 1989.
- GALETTI, P.M.; FORESTI, F.; BERTOLLO, L.A.C.; MOREIRA-FILHO, O. Heteromorphic sex chromosomes in three species of the genus *Leporinus* (Pisces, Anostomidae). **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 29, p. 138-142, 1981.
- GALETTI, P.M.; FORESTI, F. Evolution of the ZZ/ZW system in *Leporinus* (Pisces, Anostomidae). Role of constitutive heterochromatin. **Cytogenetic and Cell Genetics**, v. 43, p. 43-46, 1986.
- GALETTI, P.M.; MARTINS, C. Contribuição da hibridização in situ para o conhecimento dos cromossomos de peixes. Fish – Conceitos e Aplicações na Citogenética -**Sociedade Brasileira de Genética**, p. 61-88, 2004.
- GAUDANT, J. *Eurocharax tourainei* nov. gen., nov. sp. (Poisson, teleosteen, Ostariophysi): nouveau Characidae fossile des “calcaires a Bythines” du Var. **Géobios**, v. 13, p. 683-703, 1980.
- GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, M.; GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, E.; MOLINA, F.; CHIAVARINO, A.M.; ROSATO, M.; PUETAS, M.J. One gene determines maize B chromosome accumulation by preferential fertilization: another gene (s) determines their meiotic loss. **Heredity**, v. 90, p. 122-129, 2003.
- GORAB, E. Evolução dos genes nucleares de RNA ribossômico. In: *Biologia Molecular e Evolução*, **Ed. Holos**, p. 64-69, 2001.
- GORLOV, I.P.; TSURUSAKI, N. Morphology and meiotic/mitotic behavior of B chromosomes in a Japanese harvestman, *Metagagrella tenuipes*

- (Arachnida:Opiliones): no evidence for B accumulation mechanisms. **Zoological Science**, v. 17, p. 349-355, 2000.
- GRAVENA, W.; TERIBELE, R.; GIULIANO-CAETANO, L.; DIAS, A.L. Occurrence of B chromosomes in *Cyphocharax modestus* (Fernández-Yépez, 1948) and *Steindachnerina insculpta* (Fernández-Yépez, 1948) (Characiformes, Curimatidae) from the Tibagi River basin (Paraná State, Brazil). **Brazilian Journal of Biology**, v. 67, p. 905-908, 2007.
- GREEN, D.M. Muller's ratchet and the evolution of supernumerary chromosomes. **Genome**, v. 33, p. 818-824, 1990.
- GREEN, D.M.; ZEYL, C.W.; SHARBEL, T.F. The evolution of hypervariable sex and supernumerary (B) chromosomes in the relict New Zealand frog, *Leiopelma hochstetteri*. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 6, p. 417-441, 1993.
- GREIDER, C.W. Telomeres do D-loop-T-loop. **Cell**, v. 97, p. 419-422, 1999.
- GROMICHO, M.; OZOUF-COSTAZ, C.; COLLARES-PEREIRA, M.J. Lack of correspondence between CMA₃- Ag-positive signals and 28S rDNA loci in two Iberian minnows (Teleostei, Cyprinidae) evidenced by sequential banding. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 109, p. 507-511, 2005.
- GUERRA, M.; KENTON, A. Distribution of telomere DNA in mitotic and polytene nuclei of the anther tapetum of a tetraploid hybrid bean, *Phaseolus vulgaris* X *P. acutifolius*. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 19, n. 2, p. 313-318, 1996.
- HADJIOLOV, A.A. The nucleolus and ribosome biogenesis. **Springer-Verlag**, New York, 1985.
- HATANAKA, T.E.; GALETTI, P.M. Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). **Genética**, v. 122, p. 239-244, 2004.
- HENNING, F.; TRIFONOV, V.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F. Use of chromosome microdissection in fish molecular cytogenetics. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, p. 279-283, 2008.
- HOUBEN, A.; LEACH, C.R.; VERLIN, D.; ROFE, R.; TIMMIS, J.N. A repetitive DNA sequence common to the different B chromosomes of the genus *Brachycome*. **Chromosoma**, v. 106, p. 513-519, 1997.

- HOWELL, W.M.; BLACK, D.A. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer. **Experientia**, v. 36, p. 1014-1015, 1980.
- IJDO, J.W.; WELLS, R.A.; BALDINI, A.; REEDERS, S.T. Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)_n generated by PCR. **Nucleic Acids Reserch**, v. 19, p. 4780, 1991.
- IHLASEH, S.M.; OLIVEIRA, M.L.C.S.; SILVA, G.N.; FRANCHI, C.A.S.; CAMARGO, J.L.V. Microdissecção e captura a laser na investigação do gene TP53 em tecidos incluídos em parafina. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 1, p. 61-67, 2007.
- IMAI, H.T. Mutability of constitutive heterochromatin (C-bands) during eukaryotic chromosomal evolution and their cytological meaning. **The Japanese Journal of Genetics**, v. 66, p. 635-661, 1991.
- IÑIGO, E.R.; FERNÁNDEZ-CALVÍN, B.; CAPEL, J.; VEJA, C.G. Equilocality and heterogeneity of constitutive heterochromatin: *in situ* localization of two families of highly repetitive DNA in *Dociostaurus genei* (Orthoptera). **Heredity**, v. 76, p. 70-76, 1996.
- IWABUCHI, S.; MORI, T.; OGAWA, K.; SATO, K.; SAITO, M.; MORITA, Y.; USHIKI, T.; TAMIYA, E. Atomic force microscope-based dissection of human metaphase chromosomes and high resolutional imaging by carbon nanotube tip. **Archives of Histology and Cytology**, v. 65, n. 5, p. 473-479, 2002.
- JESUS, C.M.; GALETTI, P.M.; VALENTINI, S.R.; MOREIRA-FILHO, O. Molecular characterization and chromosomal localization of two families of satellite DNA in *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae), a species with B chromosomes. **Genetica**, v. 118, p. 25-32, 2003.
- JOHN, B. Meiosis. **Cambridge Univ. Press**, Cambridge, 1990.
- JONES, R.N. B chromosomes in plants. **New Phytologist**, v. 131, p. 411-434, 1995.
- JONES, R.N.; REES, H. B Chromosomes. **Academic Press**, New York, 1982.
- JONES, N.; HOUBEN, A. B chromosomes in plants: escapees from the A chromosome genome? **Trends in Plant Science**, v. 8, p. 417-423, 2003.
- KAKAGAWA, S.M.H.; PORTELA-CASTRO, M.A.L.B.; MARTINS-SANTOS, I.C.S. A study of nucleolus organizing regions by Ag-staining, *in situ*

- hybridization and chromomycin A₃ techniques in *Tilapia rendalli* (Cichlidae, Perciformes) of the River Iguazu Basin, Paraná, Brazil. **Cytologia**, v. 72, n. 3, p. 373-378, 2007.
- KARAMYSHEVA, T.V.; ANDREENKOVA, O.V.; BOCHKAEREV, M.N.; BORISSOV, Y.M.; BOGDANCHIKOVA, N.; BORODIN, P.M.; RUBTSOV, N.B. B chromosome of Korean field mouse *Apodemus peninsulae* (Rodentia, Murinae) analysed by microdissection and FISH. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 96, p. 154-160, 2002.
- KILBURN, A.E.; SHEA, M.J.; SARGENT, R.G.; WILSON, J.H. Insertion of a telomere repeat sequence into a mammalian gene causes chromosome instability. **Molecular and Cellular Biology**, p. 126-135, 2001.
- KOEHLER, M.R.; DEHM, D.; GUTTENBACH, M.; NANDA, I.; HAAF, T.; MOLINA, W.F.; GALETTI, P.M.; SCHMID, M. Cytogenetics of the genus *Leporinus* (Pisces, Anostomidae). 1. Karyotype analysis, heterochromatin distribution and sex chromosomes. **Chromosome Research**, v. 5, p. 12-22, 1997.
- KOMIYA, H.; TAKEMURA, S. Nucleotide sequence of 5S ribosomal RNA from rainbow trout (*Salmo gairdnerii*) liver. **The Journal of Biochemistry**, v. 86, p. 1067-1080, 1979.
- LANGANI, F.; CASTRO, R.M.C.; OYAKAWA, O.T.; SHIBATA, O.A.; PAVANELLI L.C. Diversidade da ictiofauna do Alto Rio Paraná: composição atual e perspectivas futuras. **Bioto Neotropica**, v. 7, n. 3, p. 181-197, 2007.
- LEACH, C.R.; HOUBEN, A.; FIELD, B.; PISTRICK, K.; DEMIDOV, D.; TIMMIS, J.N. Molecular evidence for transcription of genes on a B chromosomes in *Crepis capillaries*. **Genetics Society of America**, v. 171, p. 269-278, 2005.
- LÓPEZ-LEÓN, M.D.; CABRERO, J.; CAMACHO, J.P.M. Changes in DNA methylation during development in the B chromosomes NOR of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. **Heredity**, v. 74, p. 296-302, 1995.
- LUCINDA, P.H.F.; VARI, R.P. New *Steindachnerina* species (Teleostei: Characiformes:Curimatidae) from the Rio Tocantins drainage. **Copeia**, v. 1, p. 142-147, 2009.
- MAISTRO, E.L.; DIAS, A.L.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; MOREIRA-FILHO, O. Natural triploidy in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) and

- simultaneous occurrence of macro B-chromosomes. **Caryologia**, v. 47, p. 233-239, 1994.
- MAISTRO, E.L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Cytogenetic characterization of a supernumerary chromosome segment and of B-chromosomes in *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae). **Genetica**, v. 110, p. 177-183, 2001.
- MAISTRO, E.L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Cytogenetic analysis of A- and B-chromosomes of *Rhamdia hilarii* (Teleostei, Pimelodidae): C-banding, Silver nitrate and CMA₃ staining and Restriction Endonuclease Banding. **The Japan Mendel Society**, v. 67, p. 25-31, 2002.
- MARGARIDO, V.P.; GALETTI, P.M. Amplification of a GC-rich heterochromatin in the freshwater fish *Leporinus desmotes* (Characiformes, Anostomidae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, p. 569-573, 2000.
- MARTINS, C.; GIULIANO-CAETANO, L.; DIAS, A.L. Occurrence of a B chromosome in *Cyphocharax modesta* (Pisces, Curimatidae). **Cytobios**, v. 85, p. 247-253, 1996.
- MARTINS, C.; GALETTI, P.M. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). **Chromosome Research**, v. 7, p. 363-367, 1999.
- MARTINS, C.; VENERE, P.C.; MESTRINER, C.A.; CESTARI, M.M.; FERREIRA, R.; GALETTI, P.M. Chromosome relationships between Anostomidae and Chilodontidae fish (Characiformes). **Cytologia**, v. 65, p. 153-160, 2000.
- MARTINS, C.; WASKO, A.P.; OLIVEIRA, C.; PORTO-FORESTI, F.; PARISE-MALTEMPI, P.P.; WRIGHT, J.M.; FORESTI, F. Dynamics of 5S rDNA in the tilapia (*Oreochromis niloticus*) genome: repeat units, inverted sequences, pseudogenes and chromosome loci. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 98, p. 78-85, 2002.
- MARTINS, C.; WASKO, A.P. Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish genome. In: Focus on Genome Research. Ed. Clyde R. Williams. **Nova Science Publishers**, pp. 335-363, 2004.
- MARTINS, C.; OLIVEIRA, C.; WASKO, A.P.; WRIGHT, J.M. Physical mapping of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) genome by fluorescent in situ hybridization of repetitive DNAs to metaphase chromosomes – a review. **Aquaculture**, v. 231, p. 37-49, 2004.

- MATSUBARA, K.; NISHIDA-UMEHARA, C.; TSUCHIYA, K.; NUKAYA, D.; MATSUDA, Y. Karyotypic evolution inferred from comparative FISH analyses in *Apodemus* (Muridae, Rodentia). **Chromosome Research**, v. 12, p. 383-395, 2004.
- MATSUBARA, K.; YAMADA, K.; UMEMOTO, S.; TSUCHIYA, K.; IKEDA, N.; NISHIDA, C.; CHIJIWA, T.; MORIWAKI, K.; MATSUDA, Y. Molecular cloning and characterization of the repetitive DNA sequences that comprise the constitutive heterochromatin of the A and B chromosomes of the Korean field mouse (*Apodemus peninsulae*, Muridae, Rodentia). **Chromosome Research**, v. 16, p. 1013-1026 (2008).
- MAYR, B.; KALAT, M.; RAB, P. Heterochromatins and band karyotypes in three species of salmonids. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 76, p. 45-53, 1988.
- MESTRINER, C.A.; BERTOLLO, L.A.C.; GALETTI, P.M. Chromosome banding and synaptonemal complexes in *Leporinus lacustris* (Pisces, Anostomidae): analysis of a sex system. **Chromosome Research**, v. 3, p. 440-443, 1995.
- MESTRINER, C.A.; GALETTI, P.M.; VALENTINI, S.R.; RUIZ, I.R.G.; ABEL, L.D.S.; MOREIRA-FILHO, O.; CAMACHO, J.P.M. Structural and functional evidence that a B chromosome in the characid fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome. **Heredity**, v. 85, p. 1-9, 2000.
- MEYNE, J.; RATLIFF, R.L.; MOYZIS, R.K. Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)_n among vertebrates. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, p. 7049-7053, 1989.
- MILLER, O.L. The nucleolus, chromosomes, and visualization of genetic activity. **The Journal of Cell Biology**, v. 91, n. 3, p. 15-27, 1981.
- MOLINA, W.F.; GALETTI, P.M. 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, 2002.
- MÓRAN, P.; MARTÍNEZ, J.L.; GARCIA-VÁSQUEZ, E.; PENDÁS, A.M. Sex linkage of 5S rDNA in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Cytogenetic and Cell Genetics**, v. 75, p. 145-150, 1996.

- MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L.A.C.; GALETTI, PM. Karyotypic study of some species of the family Parodontidae (Pisces, Cypriniformes). **Caryologia**, v. 38, p. 47-55, 1985.
- MORESCALCHI, M.A.; LIGUORI, I.; ROCCO, L.; ARCHIMANDRITIS, A.; STINGO, V. Karyotypic characterization and genomic organization of the 5S rDNA in *Polypterus senegalus* (Osteichthyes, Polypteridae). **Genetica**, v. 132, p.179-186, 2008.
- MURRAY, B.G. Heterochromatin and silver banding of rye (*Secale cereale*, Gramineae) chromosomes. **Plant Systematics and Evolution**, v. 193. p. 243-248, 1994.
- NAVARRETE, M.C.; JÚLIO, H.F. Cytogenetic analysis of four curimatids from the Paraguay Basin, Brazil (Pisces: Characiformes: Curimatidae). **Cytologia**, v. 62, p. 241-247, 1997.
- NAVAS-CASTILHO, J.; CABRERO, J.; CAMACHO, J.P.M. Chiasma redistribution in bivalents carrying supernumerary chromosome segments in grasshoppers. **Heredity**, v. 55, p. 245-248, 1985.
- NELSON, J.S.; Fishes of the world. 3 ed., **John Wiley & Sons**, New York, pp. 600, 1994.
- NEVES, N.; BARAÕ, A.; CASTILHO, A.; SILVA, M.; MORAIS, L.; CARVALHO, V.; VIEGAS, W.; JONES, R.N. Influence of DNA methylation on rye B-chromosome nondisjunction. **Genome**, v. 35, p. 650-652, 1992.
- NIJMAN, I.J.; OTSEN, M.; VERKAAR, E.L.C.; RUIJTER, C.; HANEKAMP, E.; OCHIENG, J.W.; SHAMSHAD, S.; REGE, J.E.O.; HANOTTE, O.; BARWEGEN, M.W.; SULAWATI, T.; LENSTRA, J.A. Hybridization of banteng (*Bos javanicus*) and zebu (*Bos indicus*) revealed by mitochondrial DNA, satellite DNA, AFLP and microsatellites. **Heredity**, v. 90, p. 10-16, 2003.
- NOGUEIRA, B.P.; BRITO, M.F.G.; CAMPOS-DA-PAZ, R.; PEREIRA, G.A. Ichthiofauna of the Rio Grande, Paraná River System, at the funil dam área, MG, Brazil. **American Society of Ichthyology and Herpetology**, p.30, 2003.
- NOKKALA, C.; NOKKALA S. Characteristics of B-chromosome in *Galerucella nymphaeae* species complex (Coleoptera, Chrysomelidae). **Hereditas**, v. 111, p. 175-181, 1989.

- NOKKALA, S.; VALENTINA, K.; MARYANSKA-NADACHOWSKA, A. Achiasmate segregation of a B chromosome from the X chromosome in two species of psyllids (Psylloidea, Homoptera). **Genetica**, v. 108, p. 181-189, 2000.
- OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Occurrence of supernumerary microchromosomes in *Steindachnerina insculpta* (Pisces, Characiformes, Curimatidae). **Cytobios**, v. 76, p. 183-186, 1993.
- OLIVEIRA, C.; SABOYA, S.M.R.; FORESTI, F.; SENHORINI, J.A.; BERNARDINO, G. Increased B chromosome frequency and absence of drive in the fish *Prochilodus lineatus*. **Heredity**, v. 79, p. 473-476, 1997.
- PALOMEQUE, T.; LORITE, P. Satellite DNA in insects: a review. **Heredity**, v. 100, p. 564-573, 2008.
- PARDO, M.C.; LOPEZ-LEON, M.D.; VISERAS, E.; CABRERO, J.; CAMACHO, J.P.M. Mitotic instability of B chromosomes during embryo development in *Locusta migratoria*. **Heredity**, v. 74, p. 164-169, 1995.
- PAULS, E.; BERTOLLO, L.A.C. Evidence for a system of supernumerary chromosomes in *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881 (Pisces, Prochilodontidae). **Caryologia**, v. 36, p. 307-314, 1983.
- PAWLOWSKI, W.P.; GOLUBOVSKAYA, I.N.; CANDE, W.Z. Altered nuclear distribution of recombination protein RAD51 in maize mutants suggests the involvement of RAD51 in meiotic homology recognition. **The Plant Cell**, v. 15, p. 1807-1816, 2003.
- PENDÁS, A.M.; MÓRAN, P.; FREIJE, J.P.; GARCIA-VÁSQUEZ, E. Chromosomal location and nucleotide sequence of two tandem repeats of the Atlantic salmon 5S rDNA. **Cytogenetic and Cell Genetics**, v. 67, p. 31-36, 1994.
- PENDÁS, A.M.; MÓRAN, P.; GARCIA-VÁSQUEZ, E. Ribosomal RNA genes are interspersed throughout a heterochromatic chromosome arm in Atlantic salmon. **Cytogenetic and Cell Genetics**, v. 63, p. 128-130, 1993.
- PEPPERS, J.A.; WIGGINS, L.E.; BAKER, R.J. Nature of B chromosomes in the harvest mouse *Reithrodontomys megalotis* by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). **Chromosome Research**, v. 5, p. 475-476, 1997.
- PETESSE, M.L.; PETRERE, M.; SPIGOLON, R.J. The hydraulic management of the Barra Bonita reservoir (SP, Brazil) as a factor influencing the temporal

- succession of its fish community. **Brazilian Journal of Biology**, v. 67, p. 433-445, 2007.
- PHILLIPS, R.B.; REED, K.M. Application of fluorescence in situ hybridization (FISH) techniques to fish genetic: a review. **Aquaculture**, v. 140, p. 197-216, 1996.
- PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J.W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 83, p. 2934-2938, 1986.
- PORTO, J.I.R.; FELDBERG, E.; FALCÃO, J.N.; NAKAYAMA, C.M. Cytogenetics studies in *Hemiodus* (Ostariophysi, Characiformes) fishes from central amazon. **Cytologia**, v. 58, p. 397-402, 1993.
- PLOWMAN, A.B.; BOUGOURD, S.M. Selectively advantageous effects of B chromosomes on germination behaviour in *Allium schoenoprasum* L. **Heredity**, v. 72, p. 587-593, 1994.
- REED, K.M.; PHILLIPS, R.B. Molecular characterization and cytogenetic analysis of highly repeated DNAs of lake trout, *Salvelinus namaycush*. **Chromosoma**, v. 104, p. 242-251, 1995.
- REED, K.M.; BOHLANDER, S.K.; PHILLIPS, R.B. Microdissection of the Y chromosome and fluorescence in situ hybridization analysis of the sex chromosomes in lake trout, *Salvelinus namaycush*. **Chromosome Research**, v. 3, p. 221-226, 1995.
- REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS, C.J. Family Curimatidae, p. 51-64 In: Check list of the freshwater fishes of South and Central America. Porto Alegre, RS. **EDIPUCRS**, pp. 729, 2003.
- RIBEIRO, V.M.A.; SANTOS, G.B.; BAZZOLI, N. Reproductive biology of *Steindachnerina insculpta* (Fernandez-Yépez) (Teleostei, Curimatidae) in Furnas reservoir, Minas Gerais, Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 24, n. 1, p. 71-76, 2007.
- RICCI, G.L.; SILVA, N.; PAGLIARINI, M.S.; SCAPIN, C.A. B chromosomes in popcorn (*Zea mays* L.). **Genetics and Molecular Biology**, v. 6, p. 137-143, 2007.
- ROCCO, L.; COSTAGLIOLA, D.; STINGO, V. (TTAGGG)_n telomeric sequence in selachian chromosomes. **Heredity**, v. 87, p. 583-588, 2001.

- ROCHA, M.P.; POMPOLO, S.G. Karyotypes and heterochromatin variation (C-bands) in *Melipona* species (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Genetics and Molecular Biology** (on line), v. 21, 1998.
- SANCHEZ, S.; FENOCCHIO, A.S. Karyotypic analysis in three populations of the South-American eel like fish *Synbranchus marmoratus*. **Caryologia**, v. 49, p. 65-71, 1996.
- SANTOS, D.A.; FERNÁNDEZ, H.R.; CUEZZO, M.G.; DOMINGUEZ, E. Sympatry Inference and network analysis in biogeography. **Systematic Biology**, v. 57, p. 432-448, 2008.
- SCHMID, M. Chromosome banding in Amphibia: VII. Analysis of the structure and variability of NORs in Anura. **Chromosoma**, v. 87, p. 327-344, 1982.
- SCHWARZACHER, T. Meiosis, recombination and chromosomes: a review of gene isolation and fluorescent in situ hybridization data in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 54, p. 11-23, 2003.
- SCHWEIZER, D. Simultaneous fluorescent staining of R-bands and specific heterochromatic regions (DA-DAPI bands) in human chromosomes. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 27, p. 190-193, 1980.
- SCHWEIZER, D.; LOIDL, J. A model for heterochromatin dispersion and the evolution of C-band pattern. In: **Chromosome Today**, v.9, Allen & Unwin, New York, pp. 61-74, 1987.
- SENA, D.C.S.; MOLINA, W.F. Robertsonian rearrangements and pericentric inversions in Scaridae fish (Perciformes). **Genetics and Molecular Research**, v. 6, p. 575-580, 2007.
- SHARBEL, T.F.; GREEN, D.M.; HOUBEN, A. B-chromosome origin in the endemic New Zealand frog *Leiopelma hochstetteri* through sex chromosome devolution. **Genome**, v. 41, p. 14-22, 1998.
- SILVA, D.S.; MILHOMEM, S.S.R.; PIECZARKA, J.C.; NAGAMACHI, C.Y. Cytogenetic studies in *Eigenmannia virescens* (Sternopygidae, Gymnotiformes) and new inferences on the origin of sex chromosomes in the *Eigenmannia* genus. **BMC Genetics**, v. 10, p. 74-78, 2009.
- SINGH, L.; PURDOM, I.F.; JONE, K.W. Sex chromosomes associated DNA: evolution and conservation. **Chromosoma**, v. 79, n. 2, p. 137-157, 1980.
- SOBRINHO-SCUDELER, P.E.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Caracterização citogenética e molecular de cromossomos B em *Moenkhausia*

- sanctaeofilomenae* (Characiformes, Characidae). Resumo do 54º Congresso de Genética –ISBN 978-85-89109-06-2, **Sociedade Brasileira de Genética**, 2009.
- SUMNER, A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**, v. 75, p. 304-306, 1972.
- SUMNER, A.T. Chromosome banding. **Unwin Hyman Ltda**, London, UK, 1990.
- SUMNER, A.T. Chromosomes: Organization and Function. **Blackwell Science Ltda**, North Berwick, UK, pp. 283, 2003.
- TELENIUS, H.; CARTER, N.P.; BEBB, C.E.; NORDENSKJOLD, M.; PONDER, B.A.; TUNNACLIFFE, J. Degenerate Oligonucleotide-Primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. **Genomics**, v. 13, p. 718-725, 1992.
- TERIBELE, R.; GRAVENA, W.; CARVALHO, K.; GIULIANO-CAETANO, L.; DIAS, A.L. Karyotypic analysis in two species of fishes of the family Curimatidae: AgNO₃, CMA3 and FISH with 18S probe. **Caryologia**, v. 61, p. 1-5, 2008.
- TERUEL, M.; CABRERO, J.; MONTIEL, E.E.; ACOSTA M.J.; SÁNCHEZ A.; CAMACHO, J.P.M. Microdissection and chromosome painting of X and B chromosomes in *Locusta migratoria*. **Chromosome Research**, v. 17, p. 11-18, 2009.
- TORREZAN, R.; POGLIARINI, M.S. Influence of heterochromatin on chiasma localization and terminalization in maize. **Caryologia**, v. 48, p. 247-253, 1995.
- TRIFONOV, V.A.; PERELMAN, P.L.; KAWADA, S-I.; IWASA, M.A.; ODA, S-I.; GRAPHODATSKY, A.S. Complex structure of B-chromosomes in two mammalian species: *Apodemus peninsulae* (Rodentia) and *Nyctereutes procyonoides* (Carnivora). **Chromosome Research**, v. 10, p. 109-116, 2002.
- UNESP – BOTUCATU. 2009. Disponível em <http://www.ibb.unesp.br/extensao/acidos_nucleicos/material_didatico/19_Hibridacao_in_situ_cromossomica.pdf>. Acesso em 10 de Dezembro de 2009.
- VARI, R.P. Phylogenetic relationships of the families Curimatidae, Prochilodontidae, Anostomidae, and Chilodontidae (Pisces: Characiformes). **Smithsonian Institution Press**, n. 378, p. 1-58, 1983.

- VARI, R.P. The Curimatidae a lowland Neotropical fish family (Pisces, Characiformes): distribution, endemism and phylogenetic biogeography, p. 343-377 In: Heyer WR, Vanzolini PE. **Neotropical Distribution Patterns**. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, 1988.
- VARI, R.P. A phylogenetic study of the Neotropical Characiform family Curimatidae (Pisces: Ostariophysi). **Smithsonian Institution Press**, n. 471, p. 1-67, 1989.
- VARI, R.P. Systematics of the Neotropical Characiform genus *Steindachnerina* Fowler (Pisces: Ostariophysi). **Smithsonian Institution Press**, n. 507, p. 1-116, 1991.
- VARI, R.P. Systematics of the Neotropical Characiform genus *Cyphocharax* Fowler (Pisces: Ostariophysi). **Smithsonian Institution Press**, n. 529, p. 1-109, 1992.
- VENERE, P.C.; GALETTI, P.M. Natural triploidy and chromosome B in the fish *Curimata modesta* (Curimatidae, Characiformes). **Revista Brasileira de Genética**, v. 8, p. 681-687, 1985.
- VENERE, P.C.; GALETTI, P.M. Chromosome evolution and phylogenetic relationships of some neotropical Characiformes of the family Curimatidae. **Revista Brasileira de Genética**, v. 12, p. 17-25, 1989.
- VENERE, P.C.; GALETTI, P.M. Multiple longitudinal bands in fish chromosomes: comparison of structural G-banding and replication R bands among curimatids. **Cytobios**, v. 84, p. 71-78, 1995.
- VENERE, P.C.; MIYAZAWA, C.; GALETTI, P.M. New cases of supernumerary chromosomes in characiform fishes. **Genetics and Molecular Biology**, v. 22, p. 345-349, 1999.
- VENERE, P.C.; SOUZA, I.L.; SILVA, L.K.S.; DOS ANJOS, M.B., De OLIVEIRA, R.R.; GALETTI, P.M. Recent chromosome diversification in the evolutionary radiation of the freshwater fish family Curimatidae (Characiformes). **Journal of Fish Biology**, v. 72, p. 1976-1989, 2008.
- VENTURA, K.; SILVA, M.J.J.; FAGUNDES, V.; CHRISTOFF, A.U.; YONENAGA-YASSUDA, Y. Non-telomeric sites as evidence of chromosomal rearrangement and repetitive (TTAGGG)_n arrays in heterochromatic and euchromatic regions in four species of *Akodon*

- (Rodentia, Muridae). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 115, p. 169-175, 2006.
- VICARI, M.R.; ALMEIDA, M.C.; BERTOLLO, L.A.C.; MOREIRA-FILHO, O.; ARTONI, R.F. Cytogenetic analysis and chromosomal characteristics of the polymorphic 18S rDNA in the fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae): **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, p. 621-625, 2006.
- VICENTE, V.E.; JESUS, C.M.; MOREIRA-FILHO, O. Chromosomal localization of 5S and 18S rRNA genes in three *Parodon* species (Pisces, Parodontidae). **Caryologia**, v. 54, p. 365-369, 2001.
- VOLTOLIN, T.A.; SENHORINI, J.A.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F.; BORTOLOZZI, J.; PORTO-FORESTI, F. B-chromosome frequency stability in *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae). **Genetica** (on line), 2009.
- VRÁNA, J.; KUBALÁKOVÁ, M.; SIMKOVÁ, H.; CÍHALÍKOVÁ J.; LYSÁK, M.A.; DOLEZEL, J. Flow sorting of mitotic chromosomes in common wheat (*Triticum aestivum* L.). **Genetics Society of America**, v. 156, p. 2033-2041, 2000.
- WEITZMAN, S.H.; VARI, R.P. Characins and their allies. Encyclopedia of fishes. **Academic Press** – San Diego, USA, p.101-107, 1998.
- WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: A guide to methods and applications. **Academic Press**, San Diego, p. 315-322, 1990.
- YUDKIN, D.V.; TRIFONOV, V.A.; KUKKOVA, A.V.; VOROBIEVA, N.V.; RUBTSOVA, N.V.; YANG, F.; ACLAND, G.M.; FERGUSON-SMITH, M.A.; GRAPHODATSKY, A.S. Mapping of KIT adjacent sequences on canid autosomes and B chromosomes. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 116, p. 100-103, 2007.
- ZHUO, L.; REED, K.M.; PHILLIPS, R.B. Hypervariability of ribosomal DNA at multiple chromosomal sites in lake trout (*Salvelinus namaycush*). **Genome**, v. 38, p. 487-496, 1995.
- ZIEGLER, C.G.; LAMATSCH, D.K.; STEINLEIN, C.; ENGEL, W.; SCHARTL, M.; SCHMID, M. The giant B chromosomes of the cyprinid fish *Alburnus*

alburnus harbours a retrotransposon-derived repetitive DNA sequence.
Chromosome Research, v. 11, p. 23-35, 2003.