

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

ZELINDA SCHEMCZSSEN

**ESTUDO DA DINÂMICA DE REPLICAÇÃO CROMOSSÔMICA EM *Astyanax* aff.
scabripinnis (TELEOSTEI: CHARACIDAE), COM ÊNFASE NA NATUREZA DOS
CROMOSSOMOS B**

**PONTA GROSSA
2016**

ZELINDA SCHEMCZSEN

ESTUDO DA DINÂMICA DE REPLICAÇÃO CROMOSSÔMICA EM *Astyanax* aff. *scabripinnis* (TELEOSTEI: CHARACIDAE), COM ÊNFASE NA NATUREZA DOS CROMOSSOMOS B

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

Orientador: Prof. Dr. Orlando Moreira-Filho.

Co-orientador: Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni.

**PONTA GROSSA
2016**

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

S324 Schemczssen, Zelinda
Estudo da dinâmica de replicação cromossômica em *Astyanax aff. scabripinnis* (Teleostei: Characidae), com ênfase na natureza dos cromossomos B/ Zelinda Schemczssen. Ponta Grossa, 2016.
59f

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Área de Concentração: Biologia Evolutiva), Universidade Estadual de Ponta Grossa e Universidade Estadual do Centro-Oeste.

Orientador: Prof. Dr. Orlando Moreira-Filho.

Coorientador: Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni.

1. Cromossomo supranumerário.
2. Replicação cromossômica. 3. FISH.
4. Bandamento cromossômico.
I. Moreira-Filho, Orlando. II. Artoni, Roberto Ferreira. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Universidade Estadual do Centro-Oeste. Mestrado em

CDD: 597



PABENA

Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva

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



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº. 01/2016

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

Aos dezoito dias do mês de fevereiro de dois mil e dezesseis, no auditório do Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, sob a presidência do Dr. Orlando Moreira Filho em sessão pública, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação do (a) aluno (a) **Zelinda Schemczssen**, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-área de concentração Biologia Evolutiva, visando o título de Mestre, constituída pelos: Dr. Dr. Orlando Moreira Filho (Orientador UFSCar), Drª Mara Cristina de Almeida Matiello (UEPG) e Drª Íris Hass (UFPR). Atestada pela colenda Congregação do Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia Evolutiva. Iniciados os trabalhos a presidência deu conhecimento aos membros da Comissão e ao (a) candidato (a) das normas que regem a defesa de dissertação. A seguir a candidata passou a defesa de sua dissertação intitulada: "**Estudo da dinâmica da replicação cromossômica em *Astyanax aff. scabripinnis* (Teleostei: Characidae), com ênfase na natureza do cromossomo B**". Encerrada a defesa, procedeu-se ao julgamento e a Comissão Examinadora considerou o (a) candidato (a) **APROVADA**. A Presidência ressaltou que a obtenção do título de Mestre está condicionada ao disposto da atual aprovação de outorga do Título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de concentração em Biologia Evolutiva, **com validade de sessenta dias**; assim como comprovante de envio de um artigo científico proveniente de seu trabalho de dissertação a revista com Qualis igual ou superior a B1 (Biodiversidade – Capes) **até o prazo máximo de 90 dias após a defesa**; o não depósito da versão definitiva de Dissertação, bem como as cópias em CD (PDF) com todas as correções feitas e atestadas pelo (a) orientador (a) assim como o comprovante de envio do artigo nestes prazos anulará toda possibilidade de outorga definitiva do Título, recebimento de Certidão e outros documentos, bem como a solicitação do Diploma. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Observação (se necessário)

Alteração de Título: sim não

Novo título: _____

Ponta Grossa, 19 de fevereiro de dois mil e dezesseis.

Prof. Dr. Orlando Moreira Filho (UFSCar) _____

Profª Drª Mara Cristina de Almeida Matiello (UEPG) _____

Profª Drª Íris Hass (UFPR) _____

Dedico este trabalho em especial ao meu pai Elvino (*in memoriam*), grande pai que esta sempre comigo onde quer que eu vá. A minha mãe Tereza e a minha futura sogra Maria pelo incentivo. Ao meu amado noivo Samuel, que me incentiva torce por mim e caminha ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida.

Aos meus familiares mãe, irmãos sobrinhos cunhados e minha futura sogra, por participarem da minha vida e por se alegrarem com as minhas conquistas.

Ao meu noivo Samuel Graeff, por ser um gigante na minha vida, meu companheiro de todas as horas, meu amor.

Agradeço a grandiosidade de ter tido dois cientistas orientadores, Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni e Prof. Dr. Orlando Moreira-Filho. Em especial ao professor Roberto, por ter aceitado me orientar.

A Capes (Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior) pela Bolsa de mestrado.

A Universidade Estadual de Ponta-Grossa e à Universidade Federal de São Carlos, ao Laboratório de Genética e Evolução por disponibilizar os meios, para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos queridos professores da minha graduação da Universidade Estadual do Paraná, União da Vitória, por todo apoio e incentivo.

Aos queridos professores da pós-graduação da Universidade Estadual de Ponta Grossa-PR, por toda a contribuição para com a minha formação. Em especial a professora Mara Cristina de Almeida de Matiello, pelas contribuições com a minha banca de qualificação apoio com as técnicas de meiose e disponibilidade de participar da banca de defesa.

A professora Iris Hass da Universidade Federal do Paraná, pela disponibilidade de participar da minha banca de defesa.

Aos meus colegas de mestrado por compartilharem este momento de aprendizagem.

A Ieda Cristina Scheleger pela contribuição com as figuras. Ao Jonathan Pena Castro por todas as contribuições. A Thaiz Aparecida Dulz pelo incentivo. A Patrícia Barbosa pelas contribuições no laboratório, sempre muito solícita. A Marcela Bauer Pucci pelo apoio e amizade. A Kaline Zienmczack pelo apoio e amizade. Ao Luiz Antonio de Oliveira; Alceu Ferreira Junior Lucas Rosolen; Viviane Nascimento pela amizade e companhia no laboratório. Ao técnico do laboratório Miguel Airton Carvalho pela amizade e apoio. A Michelle Orane Schemberger pelas contribuições como banca da minha qualificação e aos demais colegas de laboratório pelas conversas diárias e pela companhia agradável.

A minha amiga Elizangela Paz de Oliveira, amiga para todas as horas. Agradeço a Deus por ter me dado esta amigaaaaaaa, a melhor companhia para a etapa do mestrado.

“Se vi mais longe foi por estar de pé sobre ombros de gigantes.”

Isaac Newton

“Se fiz descobertas valiosas, foi mais por ter paciência do que qualquer outro talento”.

Isaac Newton

RESUMO

Cromossomos B são componentes genômicos encontrados em vários grupos taxonômicos de plantas e animais. Até agora nenhuma evidência de efeitos fenotípicos detectáveis foi encontrado em indivíduos portadores de cromossomo B em *Astyanax scabripinnis*. Para conhecer a localização, variabilidade e natureza da cromatina do cromossomo B e elucidar possíveis regiões transcricionais, é necessário, *a priori*, obter padrões de bandas cromossômicas resolutivas. Através desta obtenção de bandas de replicação (bandas RBG) é possível saber em quais regiões o cromossomo B replica no início da fase S, onde nestes locais a cromatina pode ser matéria prima do genoma usado para transcrição. Neste estudo foram utilizados 35 exemplares de *Astyanax* aff. *scabripinnis* provenientes de rios da região de Campos do Jordão, São Paulo, em população previamente identificadas pela presença de cromossomos B. As amostragens foram realizadas em um ponto do Córrego da Fazenda Lavrinha, bacia do rio Paraíba do Sul. A população do de *A. scabripinnis* apresentou indivíduos com $2n=50$ e $2n=51$, estes portadores de um cromossomo B metacêntrico. Foi possível identificar regiões claras e escuras no cromossomo B, no início da replicação cromossômica, confirmando que a replicação não acontece de forma homogênea, elucidando que o cromossomo B de *A. scabripinnis* possui uma compartimentalização cromossômica, alusiva aos isocores observados em outros metazoários, que estão envolvidos na compartimentalização do genoma e estão relacionados ao suporte da regulação transcricional. Através da incorporação do análogo de base BrdU, *in vivo*, foi possível encontrar regiões do cromossomo B que replicam no início da fase S, diferencialmente caracterizadas em relação as regiões de replicação tardia. Nesta perspectiva é possível mostrar que o cromossomo B desta espécie possui território e cromatina disponíveis para transcrever, especialmente nas bandas claras de replicação inicial, sendo estas: p1.1; p1.3; p2.2 e q1.1; q1.3; q2.1; q2.3. As regiões de replicação tardia são correspondentes a blocos de heterocromatina constitutiva e localização preferencial de sequências repetitivas As51. Com o emprego do fluorocromo cromomicina CMA₃ foi possível evidenciar regiões ricas em CG em diferente contraste das regiões ricas em AT, evidenciando que as regiões CG coincidem com regiões de replicação inicial, confirmando os dados obtidos para bandas de replicação e banca C. Comprovando e delimitando que o cromossomo B possui cromatina para transcrição é necessário que este estudo de continuidade para que, se possam identificar quais informações são transcritas, e o efeito fenotípico que estes possíveis genes localizados nestas regiões de replicação inicial, trazem ao indivíduo portador do cromossomo B.

Palavras-chave: Cromossomo supranumerário, replicação cromossômica, FISH, bandamento cromossômico.

ABSTRACT

The B chromosomes are genomic components found in several taxonomic groups of plants and animals. So far no evidence of detectable phenotypic effects was found in specimens carrier chromosome B. In order to know the location, variability and nature of the chromatin of the B chromosome, and try to elucidate transcript regions, it is necessary, *a priori*, to obtain chromosomal bands patterns. After the determination of these replication bands (RBG bands), it is possible to know where the B chromosome begins to replicate, in the early S phase. These replication bands may have a local chromatin used as genome raw material for transcription. In this study 35 specimens of *Astyanax* aff. *scabripinnis* were analyzed and captured from rivers of Campos do Jordão regions, São Paulo, in populations previously identified by the presence of B chromosomes. The sample were made at one point of the Fazenda Lavrinha stream, Paraíba do Sul river basin. The specimens of the *A. scabripinnis* population presented a diploid number of $2n=50$ and $2n=51$, with a supernumerary metacentric B chromosome. It was possible to identify light and dark regions on B chromosome, at the chromosomal replication beginning, which confirm that replication does not happen in a homogeneous way. Thus, the B chromosome of *A. scabripinnis* has a chromosomal compartmentalization, similar to the isocores observed in other metazoan, which are involved in the genome compartmentalization and in the transcription regulation. By incorporating the analogue base BrdU *in vivo*, it was possible to find regions of B chromosome that replicate in the early S phase, different to the regions of late replication. In this perspective, the B chromosome of this species has available territory and chromatin to transcribe, especially in the initial replication of light bands, which are: p1.1; p1.3; p2.2 e q1.1; q1.3; q2.1; q2.3. The late replication regions match to constitutive heterochromatin blocks and to the As51 repetitive sequences location. GC-rich regions in a different contrast were evidenced with fluorochrome chromomycin CMA₃, overlapping early replication regions, and confirming the replication bands and C-banding results. Proving and defining that the B chromosome has chromatin for transcription, thus it is necessary to continue this study to identify which informations are transcribed, and what possible phenotypic effects these potential genes located in the early replication regions may bring to the B chromosome keeper.

Keywords: Supernumerary chromosome, chromosomal replication, FISH, chromosomal banding.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Exemplar de <i>Astyanax</i> aff. <i>scabripinnis</i> do Córrego Lavrinha, região de Campos do Jordão, São Paulo, Brasil.....	12
Figura 2 - Imagem panorâmica da região de Campos do Jordão-SP.....	13
Figura 3 - Bacia do Rio Paraíba do Sul.....	22
Figura 4 - Local de coleta: Córrego da Fazenda Lavrinha. Campos do Jordão-SP..	23
Figura 5 - Metáfase mitótica de <i>Astyanax</i> aff. <i>scabripinnis</i> , do Córrego da Fazenda Lavrinha.....	32
Figura 6 - Cromossomos B de <i>A. aff. scabripinnis</i> , do Córrego da Fazenda Lavrinha.....	33
Figura 7 - Metáfase mitótica de <i>Astyanax</i> aff. <i>scabripinnis</i> , do Córrego da Fazenda Lavrinha.....	35

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	ORDEM CHARACIFORME, FAMÍLIA CHARACIDAE.....	11
1.1.1	O complexo <i>Astyanax scabripinnis</i>	11
1.2	O CROMOSSOMO B.....	13
1.2.1	Cromossomos B em <i>Astyanax scabripinnis</i>	15
1.3	REPLICAÇÃO E BANDAMENTO CROMOSSÔMICO.....	17
1.4	HETEROCROMATINA.....	19
2	JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	21
3	MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1	LOCAIS DE COLETA.....	22
3.2	MÉTODOS UTILIZADOS.....	23
4	RESULTADOS	25
4.1	CAPÍTULO I - ESTUDO DA DINÂMICA DE REPLICAÇÃO CROMOSSÔMICA EM <i>Astyanax aff. Scabripinnis</i> (TELEOSTEI: CHARACIDAE), COM ÊNFASE NA NATUREZA DOS CROMOSSOMOS B.....	26
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	41
	REFERÊNCIAS	43
	Anexo A - Licença permanente para coleta de material zoológico emitido pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis-IBAMA	50
	Anexo B - Parecer da Subcomissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Ponta Grossa-PR	52
	Anexo C - Obtenção dos cromossomos mitóticos	53
	Anexo D - Obtenção de metáfases mitóticas, método indireto “in vitro”	54
	Anexo E - Incorporação do análogo de base BrdU (5-bromo-2'-deoxiuridina)	55
	Anexo F - Detecção da Heterocromatina Constitutiva	56
	Anexo G - Hibridação in situ fluorescente (FISH)	57
	Anexo H - Coloração CMA₃ DAPI	59

1 INTRODUÇÃO

1.1 ORDEM CHARACIFORME, FAMÍLIA CHARACIDAE

Os peixes constituem cerca de 50% das espécies de vertebrados atualmente existentes, com uma vasta diversidade em sua morfologia, hábitat e biologia particular (NELSON, 2006).

A América do Sul faz parte da região Neotropical, e possui uma das maiores biodiversidades do planeta. Lewinsohn e Prado (2002) afirmam que o Brasil encontra-se entre os 17 países megadiversos e segundo Eschmeyer e Fong (2015) com mais de três mil espécies válidas atualmente.

A ordem Characiforme está agrupada em 17 famílias, com ocorrência na África, no sul da América do Norte, na América Central e na América do Sul (MIRANDE, 2009).

Os peixes desta ordem apresentam variação de tamanho, com espécies que variam de 26 milímetros até 1 metro de comprimento (MOREIRA, 2007), com mandíbula superior não protraída e dentes faríngeos frequentemente pequenos (NELSON, 2006). São observados diferentes hábitos alimentares, tais como: piscívoras, iliófagas (se alimentam de detritos); herbívoras e lepidófagas (se alimentam de escamas de outros peixes) e espécies que se alimentam das nadadeiras de outros peixes (MOREIRA, 2007).

A família Characidae é a mais numerosa e complexa entre os Characiformes (RODRIGUES; QUEROL; BRACCINI, 2005). Seus integrantes são conhecidos popularmente como lambaris, piraicanjubas, piranhas, pacus, peixes-cachorro e dourados. Compreende a maioria dos peixes de escamas caracterizados pela presença de nadadeira caudal adiposa (BRITSKI, 1972), dentes bem desenvolvidos, nadadeira pélvica, nadadeira anal curta a moderadamente longa e linha lateral com frequência curvilínea, às vezes incompleta (NELSON, 2006). Dentre os Characidae destaca-se um grupo de peixes fascinantes, os *Astyanax*.

1.1.1 O complexo *Astyanax scabripinnis*

Astyanax é um dos gêneros mais abundante e amplamente distribuído da América Neotropical, onde é encontrado, desde o México até a Argentina. O gênero *Astyanax* é caracterizado por apresentar tamanho reduzido, nadadeira adiposa geralmente presente,

linha lateral completa e um pouco curva na frente, pré-maxilar não protátil, dentes pré-maxilares dispostos em duas séries, à interna com cinco dentes, escamas de tamanho normal, cobrindo apenas a base dos raios da nadadeira caudal (BRITSKI; SATO; ROSA, 1988).

Astyanax scabripinnis é um peixe de pequeno porte (Figura 1) de taxonomia pouco resolvida, reconhecido em sua morfologia e características genéticas como um complexo de espécies (MOREIRA-FILHO; BERTOLLO, 1991). O termo complexo de espécies pode ser empregado quando indivíduos compartilham uma característica morfológica semelhante, mas não são da mesma espécie e, devido ao alto grau de variação não podem ser delimitadas. Estas podem ocorrer em alopatria, parapatría e também em simpatria (MAYR, 1942). Estes peixes são reconhecidos em sua biologia particular por habitar locais restritos a cabeceiras de riachos formando demes populacionais isolados (MOREIRA-FILHO et al., 2004).

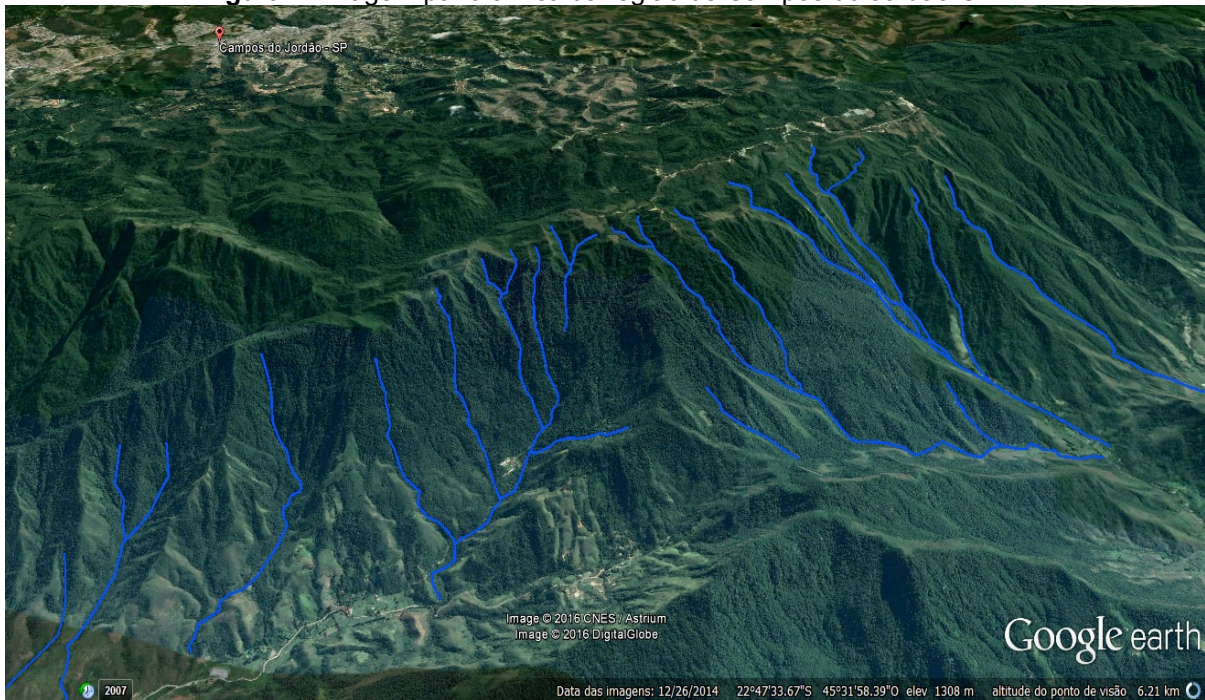
Figura 1. Exemplar de *Astyanax* aff. *scabripinnis* do Córrego Lavrinha da região de Campos do Jordão, São Paulo, Brasil.



Fonte: Laboratório de Genética Evolutiva, Universidade Estadual de Ponta Grossa.
Exemplar com 10 cm de comprimento padrão.

Populações de *A. scabripinnis* da região de Campos do Jordão, São Paulo, Brasil, têm atraído atenção especial para estudos evolutivos, devido às características onde se encontram. Uma dessas características é o relevo muito acidentado (Figura 2) apresentando altitudes que variam de 600 a 1.900m. Outra característica que esta região apresenta é um divisor de águas entre duas grandes bacias hidrográficas, onde são formados inúmeros riachos, onde alguns despejam suas águas na bacia do rio Sapucaí, enquanto os outros fluem para a bacia do rio Paraíba do Sul. Devido à altitude desta região e os desníveis dos riachos formam-se inúmeras cachoeiras que impedem o fluxo gênico entre as populações, portanto, as características desta região e a presença de cromossomos B em distintos isolados populacionais de *A. scabripinnis* justificam as pesquisas nesta localidade.

Figura 2. Imagem panorâmica da região de Campos do Jordão-SP.



Fonte: Google Earth, com modificações.
O relevo acidentado e rede hidrográfica dendrítica está destacado em azul.

Em relação à constituição cariotípica, o gênero *Astyanax* é possuidor de considerável variação do número de cromossomos, sendo $2n=50$ o número cromossômico modal considerado para este gênero (OLIVEIRA et al., 1988, KAVALCO; MOREIRA-FILHO, 2003). Os números diplóides variam de $2n=36$ a 50 cromossomos, apresentam variações nas fórmulas cariotípicas, polimorfismo de blocos heterocromáticos e na localização das regiões organizadoras do nucléolo (MORELLI et al., 1983) e ocorrência de cromossomos supranumerários ou B, especialmente no complexo A. *scabripinnis* (revisado em Moreira-Filho et al., 2004).

1.2 O CROMOSSOMO B

Cromossomos B são componentes genômicos encontrados em vários grupos taxonômicos de plantas e animais (BEUKEBOON, 1994). Entre os peixes neotropicais, 4% das mais de 1.000 espécies com cariótipos conhecidos têm descrição para ocorrência de cromossomos B (OLIVEIRA; ALMEIDA-TOLEDO; FORESTI, 2007).

Cromossomos supranumerários ou B são adicionais, presentes em alguns indivíduos de algumas populações de algumas espécies, e que provavelmente surgiram a

partir dos cromossomos do complemento padrão (cromossomos A), mas seguem o seu próprio caminho evolutivo (CAMACHO et al., 2000).

O termo cromossomo B é utilizado para casos onde os supranumerários possuem uma determinada frequência na população, sendo esta uma característica da mesma (JONES; REES, 1982). Inicialmente é possível assumir a definição de cromossomos B apresentada por Rejon et al. (1987), como segue, embora nem todas as condições sejam encontradas universalmente entre os diferentes organismos portadores destes elementos supranumerários:

- Variam de tamanho e forma, sendo em muitos casos os menores do complemento;
- Diferem da morfologia dos cromossomos do complemento padrão A, não sendo homólogos aos A;
- São geralmente heterocromáticos;
- Em geral com poucos efeitos genéticos;
- Não são essenciais para a vida dos organismos podendo estar presente ou ausente em indivíduos de uma determinada população;
- Não seguem as leis de segregação mendeliana, podendo ser instáveis durante a mitose e ou meiose;
- Quando presentes em número elevado, podem afetar a fertilidade e o crescimento, mas em alguns casos podem ser favoráveis;
- Em algumas espécies à sua origem é desconhecida.
- Alteram o ciclo celular, metabolismo e comportamento dos cromossomos A na meiose.

A presença de cromossomo B geralmente aumenta a frequência de quiasmas nos cromossomos A, promovendo uma maior diversidade genética (VOLOBUJEV, 1981) os cromossomos B podem afetar o pareamento dos cromossomos do padrão A na meiose ou causar anomalias (REJON et al., 1987) se o número de B for alto pode afetar aspectos do crescimento e desenvolvimento do organismo. Em alguns casos os cromossomos B expandem a duração do ciclo celular mitótico, o que se atribui ao aumento da quantidade de DNA que devem se replicar, eles também podem causar efeitos nucleotípicos como

alterar a proporção de histonas e DNA e aumentar o volume dos cromossomos A e a síntese de RNA e proteínas (REJON et al., 1987).

Segundo os autores Rejon et al. (1987) e Volobujev (1981) esses efeitos nucleotípicos parecem indicar que os cromossomos B interferem na regulação da atividade genética dos cromossomos A, como no caso de plantas Liliacea onde o aparecimento da isoenzima da esterase E-1 depende da presença do cromossomo B. O gene estrutural para a E-1 estaria localizado num cromossomo A e o cromossomo B ativaria este gene.

Desde a sua descoberta no início do século passado por Wilson (1907), a manutenção dos cromossomos B nos organismos têm sido intensamente estudada (JONES; REES, 1982; JONES, 1995; CAMACHO et al., 2000; PUERTAS, 2002), sendo descritos em mais de 1.300 espécies de plantas e quase 500 espécies de animais (JONES; REES, 1982; JONES, 1995).

1.2.1 Cromossomos B em *Astyanax scabripinnis*

Os cromossomos B são encontrados em aproximadamente 61 espécies de peixes neotropicais de diferentes táxons (CARVALHO; MARTINS-SANTOS; DIAS 2008).

A ocorrência de cromossomos B no gênero *Astyanax* já foi descrita em seis espécies: *Astyanax scabripinnis* (SALVADOR; MOREIRA-FILHO, 1992; FERRO et al., 2003), *Axtyanax fasciatus* e *Axtyanas schubarti* (MOREIRA-FILHO et al., 2001) *Astyanax altiparanae* (HASHIMOTO et al., 2008) *Astyanax bockmanni* (DANIEL et al., 2012) e em *Axtyanax paranae* (SILVA et al., 2014).

Sobre a distribuição do cromossomo B em *A. scabripinnis*, Néo, Moreira-Filho e Camacho (2000) observaram a relação entre a altitude e a quantidade de cromossomos B, e encontraram a presença desse elemento somente em populações isoladas acima de 1.000 metros de altitude na região de Campos do Jordão, São Paulo sendo verificada frequência mais alta em fêmeas. Rocon-Stange e Almeida-Toledo (1993) observaram cromossomos B exclusivamente em machos em estudo no Rio Jucu, Espírito Santo.

A origem do macrocromossomo B em *A. scabripinnis* foi atribuída inicialmente a eventos de não disjunção cromossômica baseada em inferências comparativas do tamanho e morfologia do cromossomo B em relação ao primeiro par de cromossomos do complemento padrão (SALVADOR; MOREIRA-FILHO, 1992). A hipótese de origem por isocromossomo para o cromossomo B metacêntrico em *A. scabripinnis* foi originalmente

proposta por Vicente; Moreira-Filho e Camacho (1996) com base no padrão de banda C.

Evidências posteriores reforçaram esta hipótese com base na distribuição simétrica do DNA repetitivo *As51* em ambos os braços do cromossomo B. A prova funcional veio do comportamento meiótico do B em ambos os sexos. Os dois braços do B-univalente foram os primeiros a completar a formação do complexo sinaptonêmico, sugerindo que a sua proximidade física confere uma vantagem no pareamento, acontecendo antes dos demais cromossomos (MESTRINER et al., 2000).

Atualmente, a teoria mais aceita propõe que o cromossomo B em *A. scabripinnis* tenha se originado a partir da formação de um isocromossomo do par acrocêntrico 24. Esta hipótese baseia-se na presença de uma banda heterocromática intersticial no braço longo deste par, após a formação do isocromossomo, originando um cromossomo B metacêntrico grande com bandas C intersticiais simetricamente em ambos os braços deste cromossomo B (VICENTE; MOREIRA-FILHO; CAMACHO, 1996).

Mestriner et al. (2000) utilizando a sonda de DNA repetitivo *As51* mostrou marcações intersticiais na região de banda C do par 24 e marcações simétricas em ambos os braços do cromossomo B, corroborando com a hipótese de origem do cromossomo B proposta anteriormente por Vicente; Moreira-Filho; Camacho, (1996).

Moreira-Filho et al. (2004) revisaram as informações disponíveis a respeito de cromossomos B em *A. scabripinnis*, sua presença, a origem, a frequência e distribuição em populações naturais, e concluíram que estas abordagens precisam de outros estudos complementares, de modo que a presença e o significado dos cromossomos B para a espécie seja melhor compreendido. Uma das questões que ainda permanecem, segundo os autores, refere-se a possíveis efeitos de cromossomos B em seus portadores. Sendo que até agora nenhuma evidência de efeitos fenotípicos detectáveis foi encontrado.

Ao analisar células somáticas e gaméticas Vicari et al. (2011) confirmaram que o macrocromossomo B em *A. scabripinnis* surgiu através da formação de isocromossomo pelo autopareamento dos elementos paquitênicos hibridados com a sonda *As51*, possivelmente do par 24, entretanto, a incerteza permanece em relação a falta de bandamento resolutivo ou pintura cromossômica exclusiva que demonstrem esta origem.

Castro et al. (2014) em seu estudo de morfometria, observaram uma variação na região ventral do corpo de indivíduos que possuíam cromossomo B em relação aos indivíduos que não possuíam, sendo a região ventral menos dilatada em indivíduos que possuíam cromossomo B, encontraram também diferenças morfométricas em relação as populações de alta e baixa altitude.

Castro et al. (2014) em outro estudo, definiram como característica notável a presença exclusiva do cromossomo B em população de altitude mais elevada, confirmando o que outros autores já haviam associado (NÉO et al., 2000). Desta forma condições ambientais específicas mais favoráveis, permitiram uma maior tolerância para esse elemento genômico adicional, em populações de *A. scabripinnis* em altitudes mais elevadas, na região de Campos do Jordão, no Estado de São Paulo, explicando a presença ou ausência deste cromossomo em diferentes populações de *A. Scabripinnis*.

White (1973) propôs o modelo heterótico para explicar que os cromossomos B seriam mantidos graças às vantagens adaptativas que conferem ao indivíduo portador, quando se encontram em números baixos. Já o modelo parasítico vem sendo suportado por vários autores (ÖSTERGREN, 1945; JONES, 1985; SHAW; HEWITT, 1990) que consideram que os cromossomos B se mantêm nas populações em razão de seus próprios meios de acúmulo. Esses cromossomos seriam como elementos parasitas, uma vez que sua presença não traria vantagem alguma ao indivíduo portador.

Camacho et al. (2003) discutem o ciclo de vida prolongado de cromossomos B com base no conflito genômico que ocorre entre o aumento da frequência deste elemento, suportado pela deriva genética em um estágio de acúmulo, e posterior efeito negativo e declínio com a neutralização do cromossomo B original e surgimento de novas variantes do B, que iniciaria novamente um ciclo de acúmulo.

1.3 REPLICAÇÃO E BANDAMENTO CROMOSSÔMICO

Um dos principais problemas que possam ter impedido uma melhor compreensão da evolução cromossômica em peixes é a dificuldade de obter bons padrões de bandas cromossômicas longitudinais (ARTONI et al., 1999). Esta falta de resultados pode ser explicada pela dificuldade na obtenção de bandas resolutivas, o suficiente para permitir a comparação cromossômica. Provavelmente o tamanho dos cromossomos de peixes, geralmente pequeno (<5µm) pode dificultar a caracterização de regiões claras e escuras ao longo do cromossomo (DANIEL-SILVA; ALMEIDA-TOLEDO, 2005).

Embora alguns estudos tenham demonstrado que o cromossomo B de *A. scabripinnis* possui um padrão de replicação tardio (MAISTRO; FORESTI; OLIVEIRA, 1999), devido principalmente a sua natureza heterocromática (SALVADOR; MOREIRA-FILHO, 1992; VICENTE; MOREIRA-FILHO; CAMACHO, 1996), ainda é uma questão em aberto para

relacionar a replicação destes cromossomos com a localização, variabilidade e natureza da heterocromatina.

A presença do padrão de bandas de replicação em cromossomos de peixes indica que a replicação se dá em duas etapas, a precoce e a tardia, levando a um padrão de bandas distinto em cada replicação do cromossomo (SÁNCHEZ et al., 1993), tal como acontece em outros eucariotos (CUNY et al., 1981; MEDRANO et al., 1988; BERNARDI, 1989; BERNARDI, 1995; MAISTRO; FORESTI; OLIVEIRA, 1999).

A incorporação de bromodeoxiuridina “5-bromo-2'-deoxiuridina” (BrdU) *in vivo* gera padrão de bandas RBG que é o reverso ao padrão de bandas GBG (bandas claras e escuras ao longo dos cromossomos) (VERMA; BABU 1995).

A bromodeoxiuridina é uma pirimidina análoga da timidina de fórmula molecular $C_9H_{11}BrN_2O_5$, que é seletivamente incorporada ao DNA durante a fase S do ciclo celular. É um nucleótido halogenado (devido ao grupo brometo incorporado na quinta cadeia de carbono), formado por uma base de pirimidina e o monossacarídeo da ribose, cuja analogia a timidina permite substituição quase completa, entre 99,8 e 100%, de nucleotídeos timidina nas células em fase de síntese (informações do fabricante). A propriedade fotodegradável do BrdU permitiu a demonstração microscópica de regiões cromossômicas que consistem em DNA substituído por ele, apresentando coloração diferente (VERMA; BABU 1995).

Na revelação da banda proveniente da incorporação do BrdU é possível diferenciar regiões que replicam precocemente e outras tardiamente (MAISTRO; FORESTI; OLIVEIRA 1999, DANIEL-SILVA; ALMEIDA-TOLEDO, 2005). Estes autores obtiveram bandas RBG com sucesso a partir da incorporação de BrdU *in vivo* espécies do gênero *Astyanax*, com exposição ao tratamento num período de 5 a 7 horas.

Outro meio de obtenção de banda RBG é o uso de fluorocromo, a vantagem desta técnica é que na presença de luz em comprimento de onda adequado, que realça dois padrões de bandas na mesma metáfase (SCHWEIZER et al., 1980).

Os fluorocromos são corantes fluorescentes geralmente utilizados associados com um contra corante. Existem duas categorias destes corantes, com especificidade para as bases AT ou com afinidade para as bases GC, e em geral, esses podem ser o 4"-6-diamidino-2 fenilindol (DAPI) e a Cromomicina (CMA_3), respectivamente. O fluorocromo CMA_3 pode ser usado associado ao antibiótico distamicina o qual age como um contra corante que se liga às bases AT, permitindo um maior contraste nas regiões ricas em GC (SCHWEIZER et al., 1980).

1.4 HETEROCROMATINA

Astyanax scabripinnis pode apresentar variações no padrão de bandas C no que diz respeito à natureza, quantidade e distribuição de heterocromatina constitutiva entre as populações (MOREIRA-FILHO; BERTOLLO, 1991).

A heterocromatina constitutiva foi definida por Brown (1966) como a heterocromatina que ocorre em porções homologas do par cromossômico, estando inativa, sendo mais tarde denominada de não codificadora por Melo (1978).

Summer (1990) destacou as principais características da heterocromatina constitutiva como sendo sua universalidade, diversidade e variabilidade. A diversidade é entendida como as diferenças em termos de composição de bases de DNA e a variabilidade, como mudanças na quantidade de heterocromatina constitutiva no cariótipo.

A heterocromatina constitutiva diferencia da heterocromatina facultativa que, em humanos, pode ser representada pela condensação e inativação de um dos cromossomos X no sexo homogamético. A inativação não é total, podendo ocorrer alguma atividade. Um exemplo é do cromossomo X em mamíferos (LYON, 1968), onde o macho possui o cromossomo X e o Y ativos, enquanto nas fêmeas, um dos cromossomos X constitui a cromatina sexual condensada e inativada.

Os DNAs repetitivos constituem uma grande porcentagem do genoma eucariótico consistindo em sequências que podem ser idênticas ou semelhantes, que se repetem diversas vezes podendo estar em tandem, repetidas ou dispersas no genoma (SUMNER 2003).

Os DNA repetitivos em tandem são classificados de acordo com sua unidade de repetição, a qual apresenta variação de tamanho, onde os maiores que 100 pb são denominados satélites, de 10 a 100 pb minissatélites e de 2 a 6 pb microssatélites (SUMNER 2003).

O DNA satélite está empacotado de forma densa nas regiões de heterocromatina constitutiva (PLOHL et al., 2008).

Apesar do DNA satélite estar relacionado com a inatividade de transcrição (BERIDZE, 1986), tem sido sugerido sua importância acompanhado de proteínas específicas, nos processos de estabilidade da estrutura genômica, pareamento cromossômico e segregação, atuando em função estrutural, também na investigação de variabilidade e diversidade genética, numa perspectiva evolutiva (KURENOVA et al.,

1998; MONOD et al., 2002; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ et al., 2008; BUSSIEK et al., 2009).

Mestriner et al. (2000) identificaram um DNA satélite, cortado pela enzima de restrição *Kpn* I, 59% rico em AT no genoma de *A. scabripinnis*, com unidades monoméricas de 51 pares de base, denominado *As51*. Análises por hibridação *in situ* fluorescente (FISH) mostraram que este DNA está localizado principalmente nas heterocromatinas distais, em alguns sítios de RONS e em partes do cromossomo B da população analisada (MESTRINER et al., 2000).

Os sítios de DNA satélite podem ser prováveis alvos para quebras e fusões cromossômicas. Contudo, o DNA satélite *As51* não se mostrou associado aos rearranjos cromossômicos que modificaram os números diplóides em *A. scabripinnis* e *A. fasciatus* (KANTEK et al., 2009).

Elementos transponíveis têm como característica a habilidade de se espalhar dentro do genoma através de sua própria amplificação, sendo assim chamados de parasitas genômicos, mas que fornecem opção à evolução (KIDWELL, 2001).

Assumindo que o DNA satélite *As51* é derivado de um elemento transponível, cada população ou espécie poderia seguir evolutivamente um caminho independente, seja pelo acúmulo ou invasão de outras sequências de cromossomos, ou a eliminação de sequências no genoma, acentuando assim divergências no cariótipo entre as populações ou espécies. Nesse sentido, não se pode descartar o potencial papel do DNA satélite *As51* nos processos de especiação do gênero *Astyanax* (VICARI et al., 2010).

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Um dos principais problemas que possa ter impedido uma melhor compreensão da evolução cromossômica em peixes é a dificuldade de obter bons padrões de bandas cromossômicas longitudinais (ARTONI et al., 1999).

Para elucidar se o cromossomo B possui regiões possivelmente transcricionais, é necessário obter padrões de bandas longitudinais resolutivas. Através desta obtenção de bandas de replicação (bandas RBG) é possível saber em que regiões o cromossomo B replica no início da fase S, onde nestes locais a cromatina pode ser matéria prima do genoma usado para transcrição.

Sendo assim, este estudo teve como objetivo:

Evidenciar possíveis regiões transcricionais no cromossomo B e no cariótipo de *A. scabripinnis* por meio do padrão de replicação e da natureza da cromatina.

Para isso foram seguidos os seguintes objetivos específicos:

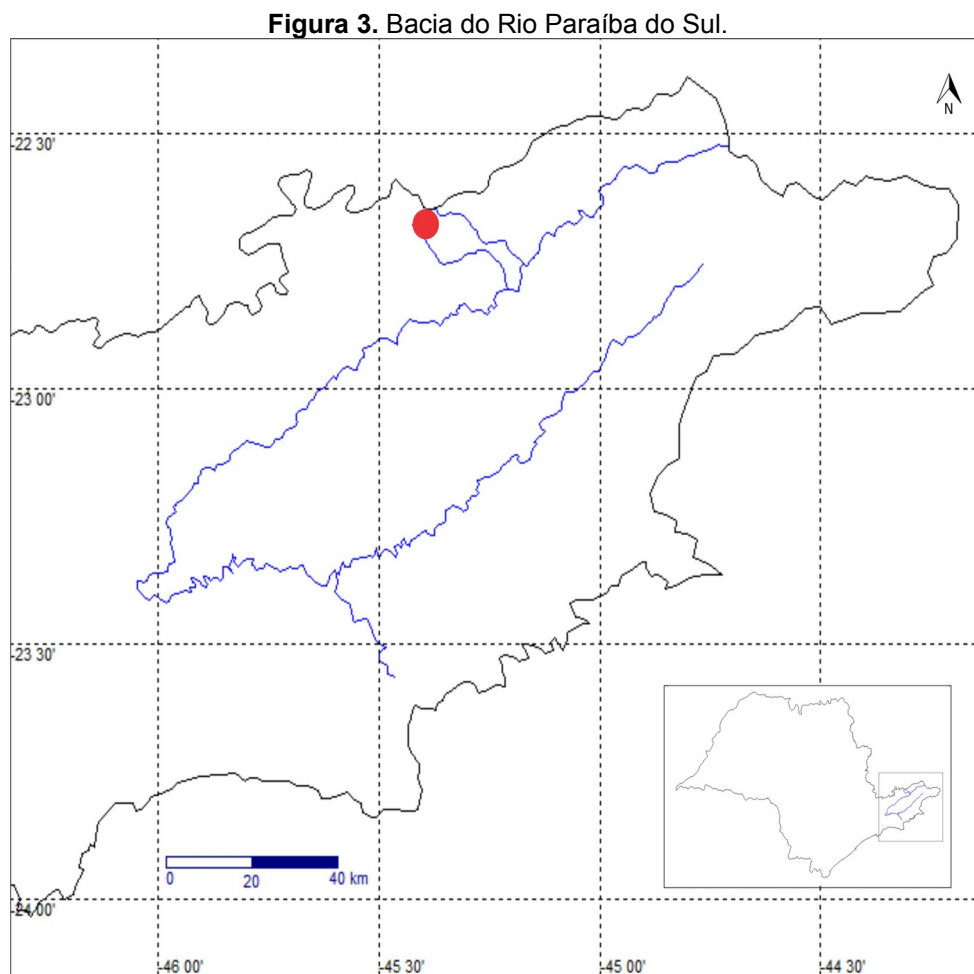
- Incorporar análogo de base BrdU *in vivo* a fim de obter padrões de bandas de replicação em cromossomos B de *A. scabripinnis* em cromossomos mitóticos.
- Mapear sequências minissatélites em cromossomos B de *A. scabripinnis*;
- Analisar possíveis homologias do padrão de bandas de replicação do cromossomo B com os cromossomos do complemento padrão.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAIS DE COLETA

Foram utilizados 35 exemplares de *Astyanax aff. scabripinnis* provenientes de rios da região de Campos do Jordão, São Paulo-SP, em população previamente identificadas pela presença de cromossomos B. A coleta foi realizada no Córrego da fazenda Lavrinha, bacia do rio Paraíba do Sul (Figura 3) coordenada S 22°43'09,6"/WO 45°25'38,5" (Figura 4) com elevação de 1881m.

A Licença permanente para coleta de material zoológico foi emitida pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis-(IBAMA) (Anexo I). Esta pesquisa teve autorização do comitê de ética da UEPG (Anexo II).



Fonte: Google Earth, com modificações.

Região de Campos do Jordão Estado de São Paulo, com destaque para local de coleta, em vermelho, no córrego da Fazenda Lavrinha.

Figura 4. Local de coleta: Córrego da Fazenda Lavrinha, Campos do Jordão-SP.



Fonte: Google Earth, com modificações.

3.2 MÉTODOS UTILIZADOS

A obtenção de cromossomos mitóticos seguiu o método de preparação direta adaptado para peixes por BERTOLLO et al. (1978), (Anexo III) e de cultura de curto tempo descrito por FENOCCHIO et al. (1991). (Anexo IV). Para o padrão de bandas de replicação inicial foi feito a incorporação do análogo de base 5-Bromodesoxiuridina (BrdU) e a revelação das bandas seguiu o protocolo estabelecido por GILES et al. (1988), com modificação no tempo da incorporação do BrdU que foram de 6 horas e trinta minutos e a exposição a luz ultravioleta que foi de duas horas e trinta minutos (Anexo V). O padrão de banda-C seguiu o protocolo segundo SUMNER (1972), (Anexo VI). A hibridização *in situ* fluorescente (FISH) foi de acordo com PINKEL et al. (1986) foi empregada para o mapeamento de regiões repetitivas, utilizando a sonda de As51, (Anexo VII) com modificações segundo Vicari et al. (2010). Para a coloração com os fluorocromos base-específicos CMA₃ e DAPI, seguiu-se o protocolo descrito por SCHWEIZER, (1980) com adaptações, (Anexo VIII).

As 15 melhores metáfases foram fotografadas em microscópio de epifluorescência Axiophot Zeiss e capturadas por câmara CCD com auxílio do programa Zen Imaging Software, versão: zen 2012 (blue edition). Os exemplares foram depositados no Museu de

Zoologia da Universidade Estadual de Londrina-PR, com o número 17482. O idiograma foi montado pelo programa Corel Draw v. X7. O cariótipo foi montado, através do programa Photoshop versão CC 2015.

4 RESULTADOS

Os resultados estão organizados em forma de artigo científico em um capítulo, conforme as normas de escrita exigidas pela Instituição.

4.1 CAPÍTULO I - ESTUDO DA DINÂMICA DE REPLICAÇÃO CROMOSSÔMICA EM *Astyanax* aff. *Scabripinnis* (TELEOSTEI: CHARACIDAE), COM ÊNFASE NA NATUREZA DOS CROMOSSOMOS B

RESUMO

Cromossomos B são componentes genômicos encontrados em vários grupos taxonômicos de plantas e animais. Até agora nenhuma evidência de efeitos fenotípicos detectáveis foi encontrado em indivíduos portadores de cromossomo B em *Astyanax scabripinnis*. Para conhecer a localização, variabilidade e natureza da cromatina do cromossomo B e elucidar possíveis regiões transcricionais, é necessário, *a priori*, obter padrões de bandas cromossômicas resolutivas. Neste estudo foram utilizados 35 exemplares de *Astyanax aff. scabripinnis* provenientes de rios da região de Campos do Jordão, São Paulo, em populações previamente identificadas pela presença de cromossomos B. As amostragens foram realizadas em um ponto do Córrego da fazenda Lavrinha, bacia do rio Paraíba do Sul. Através da incorporação do análogo de base BrdU *in vivo*, foi possível encontrar regiões do cromossomo B que replicam no início da fase S, diferencialmente caracterizadas em relação as regiões de replicação tardia. Nesta perspectiva é possível mostrar que o cromossomo B desta espécie possui território e cromatina disponíveis para transcrever, especialmente nas bandas claras de replicação inicial, sendo estas: p1.1; p1.3; p2.2 e q1.1; q1.3; q2.1; q2.3. As regiões de replicação tardia são correspondentes a blocos de heterocromatina constitutiva e localização preferencial de sequências repetitivas As51. Com o emprego do fluorocromo cromomicina CMA₃ foi possível evidenciar regiões ricas em CG em diferente contraste das regiões AT, mostrando que as regiões ricas em CG coincidem com regiões de replicação inicial, confirmando o que foi revelado pelas bandas de replicação e banda C.

Palavras-chave: Cromossomo supranumerário, replicação cromossômica, FISH, bandamento cromossômico.

ABSTRACT

The B chromosomes are genomic components found in several taxonomic groups of plants and animals. So far no evidence of detectable phenotypic effects was found in specimens carrier chromosome B in *Astyanax scabripinnis*. In order to know the location, variability and nature of the chromatin of the B chromosome, and try to elucidate transcript regions, it is necessary, *a priori*, to obtain chromosomal bands patterns. In this study 35 specimens of *Astyanax* aff. *scabripinnis* were analyzed and captured from rivers of Campos do Jordão regions, São Paulo, in populations previously identified by the presence of B chromosomes. The sample were made at one point of the Fazenda Lavrinha stream, Paraíba do Sul river basin. By incorporating the analogue base BrdU *in vivo*, it was possible to find regions of B chromosome that replicate in the early S phase, different to the regions of late replication. In this perspective, the B chromosome of this species has available territory and chromatin to transcribe, especially in the initial replication of light bands, which are: p1.1; p1.3; p2.2 e q1.1; q1.3; q2.1; q2.3. The late replication regions match to constitutive heterochromatin blocks and to the As51 repetitive sequences location. GC-rich regions in a different contrast were evidenced with fluorochrome chromomycin CMA₃, overlapping early replication regions, and confirming the replication bands and C-banding results.

Keywords: Supernumerary chromosome, chromosomal replication, FISH, chromosomal banding.

Introdução

Cromossomos B são componentes genômicos encontrados em vários grupos taxonômicos de plantas e animais (BEUKEBOON, 1994). Desde a sua descoberta no início do século passado por Wilson (1907), a manutenção dos cromossomos B nos organismos têm sido intensamente estudada (JONES; REES, 1982; JONES, 1995; CAMACHO et al., 2000; PUERTAS, 2002). Trabalhos recentes têm versado sobre a evolução e biologia dos cromossomos B, com especial destaque para a ocorrência de genes nestes elementos extragenômicos (revisado em HOUBEN et al., 2014).

Entre os peixes neotropicais, 4% das mais de 1.000 espécies com cariótipos conhecidos têm descrição para ocorrência de cromossomos B (OLIVEIRA; ALMEIDA-TOLEDO; FORESTI, 2007; CARVALHO et al., 2008). O gênero *Astyanax* tem sido bastante explorado em relação à presença de cromossomos B em peixes, com ocorrência já descrita em seis espécies: *A. scabripinnis* (SALVADOR; MOREIRA-FILHO, 1992), *A. fasciatus* e *A. schubarti* (MOREIRA-FILHO et al., 2001), *A. altiparanae* (HASHIMOTO et al., 2008), *A. bockmanni* (DANIEL et al., 2012) e em *A. paranae* (SILVA et al., 2014).

Em *A. scabripinnis* a origem de um macro cromossomo B foi atribuída inicialmente a eventos de não disjunção cromossômica baseada em inferências comparativas do tamanho e morfologia do cromossomo B em relação ao primeiro par de cromossomos do complemento padrão (SALVADOR; MOREIRA-FILHO, 1992).

Atualmente, a teoria mais aceita propõe que o cromossomo B de *A. scabripinnis* tenha se originado a partir da formação de um isocromossomo do par acrocêntrico 24 (VICENTE; MOREIRA-FILHO; CAMACHO 1996). Esta hipótese baseia-se na presença de uma banda heterocromática intersticial no braço longo deste par (VICENTE; MOREIRA-FILHO; CAMACHO 1996), corroborada pela hibridização *in situ* com sondas de DNA repetitivo As51 (MESTRINER et al., 2000) e comportamento de autopareamento na meiose (VICARI et al., 2011).

Populações de *A. scabripinnis* da região de Campos do Jordão, São Paulo, têm atraído atenção especial para estudos evolutivos, tendo em vista a grande variação na altitude que vai de 600 a 1.900m, com uma rede hidrográfica bastante dendrítica que permite o estabelecimento de várias populações isoladas nas cabeceiras de pequenos riachos (FERRO; MOREIRA-FILHO; BERTOLLO, 2003). Muitas destas populações com a ocorrência de cromossomos B (revisado por MOREIRA-FILHO et al., 2004).

Um dos principais problemas da citogenética de peixes é a dificuldade de obter padrões resolutivos de bandas cromossômicas longitudinais (ARTONI et al., 1999). Uma alternativa é a obtenção de bandas de replicação pela incorporação de análogos de base durante a divisão celular. Esta pode ser uma estratégia para investigar possíveis regiões transcricionais nos cromossomos B.

Embora alguns estudos tenham demonstrado que o cromossomo B de *A. scabripinnis* possui um padrão de replicação tardio, através do bandamento RBG (MAISTRO FORESTI; OLIVEIRA, 1999, DANIEL-SILVA; ALMEIDA-TOLEDO 2001), devido principalmente a sua natureza heterocromática (SALVADOR; MOREIRA-FILHO, 1992; VICENTE; MOREIRA-FILHO; CAMACHO 1996), ainda é pouco esclarecido se a replicação destes cromossomos é uniforme, e qual é a localização, variabilidade e natureza da heterocromatina que constitui o cromossomo B em *A. scabripinnis*.

Sendo assim, este estudo teve como objetivo evidenciar possíveis regiões transcricionais no cromossomo B e no cariótipo de *A. scabripinnis* por meio do padrão de replicação e da natureza da cromatina.

Material e métodos

Amostras biológicas

Foram utilizados 35 exemplares de *Astyanax aff. scabripinnis* provenientes de rios da região de Campos do Jordão, São Paulo, em populações previamente identificadas pela presença de cromossomos B. A coleta foi realizada no Córrego da fazenda Lavrinha, bacia do rio Paraíba do Sul, coordenada S 22°43'09,6"/WO 45°25'38,5" com elevação de 1881m. Os exemplares foram depositados no Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina-PR com o número 17482. Esta pesquisa teve autorização do comitê de ética da UEPG (protocolo 04509/08) e licença para coleta pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis-(IBAMA) sob o n°15115-1.

Preparações cromossômicas

A obtenção de cromossomos mitóticos seguiu o método de preparação direta adaptado para peixes por Bertollo et al. (1978) e de cultura de curto tempo descrito por Fenocchio et al. (1991). Para o padrão de bandas de replicação inicial foi feito a incorporação do análogo de base 5-Bromodeoxiuridina (BrdU) *in vivo* e a revelação das bandas seguiu o protocolo estabelecido por Giles et al. (1988) com adaptação no tempo

de incorporação do BrdU *in vivo*, que foi de 6 horas e trinta minutos e o tempo de exposição a luz ultravioleta que foi 2 horas e trinta minutos. O padrão de banda-C seguiu o protocolo segundo Sumner (1972). Para a coloração com os fluorocromos base-específicos cromomicina (CMA₃) e DAPI seguiu o protocolo descrito por Schweizer (1980).

Hibridação in situ fluorescente

A hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com a sonda de As51 foi empregada para o mapeamento de regiões repetitivas, de acordo com Pinkel et al. (1986), com adaptações segundo Vicari et al. (2010).

As quinze melhores metáfases foram fotografadas em microscópio de epifluorescência Axiophot Zeiss e capturadas por câmara CCD com auxílio do programa Zen Imaging software, versão: zen 2012 (blue edition). O cariótipo foi montado, através do programa photoshop versão CC 2015. O idiograma foi montado através do programa Corel Draw v. X7.

Resultados e Discussão

A análise convencional do cariótipo de *Astyanax aff. scabripinnis* evidenciou uma macroestrutura cariotípica com a presença de cromossomo B. Estes dados corroboram estudos anteriores com exemplares da população do Córrego da Fazenda Lavrinha com $2n=51$ cromossomos (6m+22sm+10st+12a+1Bm) em machos e fêmeas sem a presença de cromossomos sexuais morfologicamente diferenciados (BARBOSA et al., 2015).

A análise de células incorporadas com BrdU mostrou um padrão de replicação heterogêneo em cromossomos de *Astyanax aff. scabripinnis* (Figura 5), com destaque para a presença de cromossomos B que demonstrou um padrão de replicação em bandas longitudinais (Figura 6). Este padrão longitudinal de bandas foi demonstrado em espécies do gênero *Astyanax* (DANIEL-SILVA; ALMEIDA-TOLEDO 2001). Na levedura *Saccharomyces cerevisiae* algumas regiões cromossômicas têm replicação inicial e outras tardiamente (BREWER et al., 1993; BICKMORE; CRAIG, 1997), bem como, acontece em mamíferos e outros eucariotos (SUMNER 2003).

Figura 5. Metáfase mitótica de *Astyanax aff. scabripinnis*, do Córrego da Fazenda Lavrinha.



A figura mostra bandas de replicação tardia pela incorporação do análogo de base BrdU. Com destaque para a ocorrência de um cromossomo B.

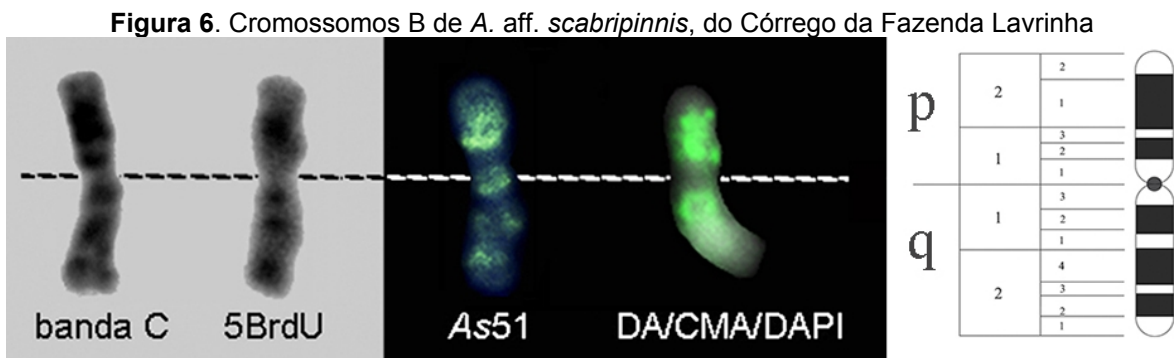
As regiões de replicação tardia do cromossomo B são coincidentes a blocos de heterocromatina constitutiva e localização preferencial de sequências repetitivas *As51* (Figura 6).

Com o fluorocromo CMA_3 foi possível mostrar regiões ricas em CG em diferente contraste das regiões ricas em AT no cromossomo B, sendo que as regiões ricas em CG coincidem com regiões de replicação inicial, confirmando os resultados encontrados pela incorporação com BrdU e bandamento C (Figura 6). Segundo Sumner (2003) bandas GBG (regiões ricas em AT) são relativamente pobres em genes, e bandas RBG (regiões ricas em CG) são relativamente rica em genes.

A técnica de banda C identificou regiões heterocromáticas já descritas e conhecidas por outros autores (SALVADOR; MOREIRA-FILHO 1992; VICENTE; MOREIRA-FILHO; CAMACHO 1996).

Embora esta seja a primeira abordagem na tentativa de relacionar a replicação do cromossomo B com a localização, e natureza da heterocromatina, foi possível identificar, especialmente em relação ao cromossomo B, regiões correspondentes a bandas claras e escuras. Este padrão mostra que este cromossomo, apesar de geralmente parecer totalmente heterocromático, possui uma natureza heterogênea em relação à heterocromatina (Figuras 6 e 7). Além disso, pode-se inferir que a replicação desse cromossomo se dá em momentos diferentes da fase S do ciclo celular.

Este padrão de replicação diferenciando regiões claras e escuras coincidentes, porém não de forma homóloga, entre o cromossomo B e os cromossomos do complemento A, revela a presença de cromatina para transcrição, no cromossomo B, sendo possível observar ao longo do complemento A que os cromossomos se apresentam bandados seguindo o padrão do bandamento R que foi identificado no cromossomo B.



Os cromossomos foram submetidos a diferentes tratamentos evidenciando a estrutura, compartimentalização e natureza da cromatina. Ao lado direito da figura, destaque para o ideograma mostrando a compartimentalização de bandas longitudinais do cromossomo B.

Maistro et al. (1999) sugeriu, pela comparação do padrão de bandas de replicação, que o cromossomo B possui um padrão diferente daquele evidenciado para o cromossomo do par 1, que sustentava naquela época a hipótese de origem do cromossomo B por não disjunção do cromossomo 1 na divisão meiótica. Contudo, o padrão de bandas RBG obtido para o cromossomo B por estes autores foi pouco resolutivo. Neste estudo foi possível concluir que apesar do cromossomo B apresentar um padrão de bandas de replicação, apresentando regiões claras e escuras, tal como nos cromossomos do par um e demais cromossomos do genoma, não justifica sua origem através da não disjunção do par um, devido à hipótese de origem por isocromossomo corroborada por muitos estudos (VICENTE; MOREIRA-FILHO; CAMACHO 1996; MESTRINER et al., 2000; NÉO et al., 2000a; JESUS et al., 2003; MOREIRA-FILHO et al., 2004).

Em coleópteros Amorin e colaboradores (2016) fizeram hibridação cruzada em nove espécies relacionadas de *Dichotomius* usando o cromossomo B como sonda e não obtiveram quaisquer sinal de hibridação. Os resultados sugerem uma origem intra-específica e monofilética para cromossomos B em *Dichotomius sericeus*, provavelmente a partir do segundo ou terceiro par autossômico.

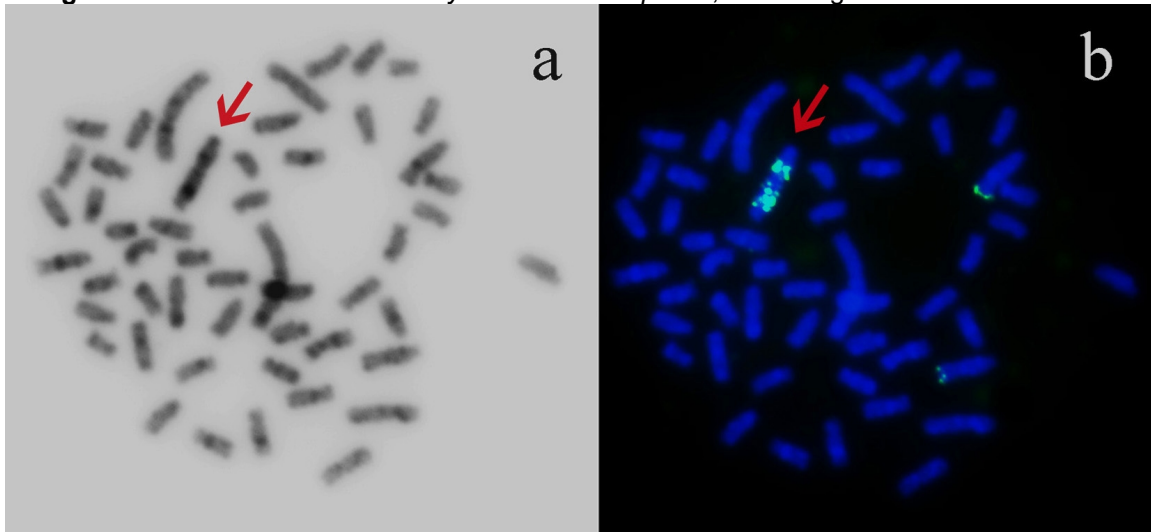
UTSUNOMIA e colaboradores (2016) observaram que o peixe *Moenkhausia sanctafilomenae* abriga duas variantes de cromossomos B, que se diferenciam em seus padrões de bandas C, frequência e abundância de DNAr 18S. Ambas as variantes de cromossomo B foram presumivelmente derivados independentemente do mesmo cromossomo A, entretanto, a variante heterocromática mostra sinais de ser mais jovem do que a variante eucromática, ambas as variantes de cromossomo B apresentaram maiores taxas de dN/DS para o gene da histona H3.2, sugerindo que a seleção negativa é relaxada para as sequências B, como se espera, sendo eles na maior parte inativos.

Nossos resultados elucidam que o cromossomo B de *A. scabripinnis* possui uma compartimentalização cromossômica, alusiva aos isocores (MAISTRO; FORESTI; OLIVEIRA, 1999) observados em outros metazoários, que estão envolvidos na compartimentalização do genoma e no suporte da regulação transcricional, tecido específica em todos os metazoários (TANAY; CAVALLI, 2013). Nesta perspectiva é possível mostrar que o cromossomo B desta espécie possui território e cromatina disponíveis para transcrever, especialmente nas bandas claras de replicação inicial, sendo elas: p1.1; p1.3; p2.2 e q1.1; q1.3; q2.1; q2.3 (Figura 6). Entretanto estas regiões podem se comportar de forma dinâmica podendo mudar suas posições a partir do *crossing-over* que acontece no autopareamento do cromossomo B, no entanto não altera os arranjos gênicos que foram delimitados nestas regiões de replicação inicial.

Esta população está sobre um processo de isolamento reprodutivo, desde o soerguimento das montanhas que formam a região de Campos do Jordão. Devido ao relevo muito acidentado desta região o que forma uma rede hidrográfica com inúmeros riachos isolados entre si não permitindo o fluxo gênico entre as populações. A presença do cromossomo B nestes indivíduos pode estar proporcionando uma solução para endogamia nesta região. Volobujev (1981) observou que a presença do cromossomo B geralmente aumenta a frequência de quiasmas nos cromossomos A, promovendo uma maior diversidade genética.

Regiões marcadas pela FISH com As51 coincidem com algumas das regiões heterocromáticas de replicação tardia dos cromossomos do complemento A e, especialmente do cromossomo B (Figura 7). Regiões que replicam tardiamente já eram esperadas devido à natureza heterocromática do cromossomo B.

Figura 7. Metáfase mitótica de *Astyanax aff. scabripinnis*, do Córrego da Fazenda Lavrinha.



A metáfase foi tratada sequencialmente evidenciando bandas de replicação tardia (a) pela incorporação do análogo de base BrdU e a localização de sequências As51 pela FISH (b). Destaque nas flechas para a ocorrência de um cromossomo B.

Moreira-Filho et al. (2004) revisaram as informações conhecidas para o cromossomo B em *A. scabripinnis*, sua presença, a origem, a frequência e a distribuição em populações naturais, e concluíram que estas abordagens precisam de outros estudos complementares, de modo que a presença e o significado dos cromossomos B para a espécie seja melhor compreendido. Uma das questões que ainda permanecem, segundo os autores, refere-se a possíveis efeitos dos cromossomos B em seus portadores, não tendo sido relatado até agora nenhuma evidência de efeitos fenotípicos.

Huang et al. (2016) evidenciaram em seu estudo, que no milho a presença de cromossomo B, alterou a transcrição de genes no genoma A, com mais impacto onde havia aumento do número do cromossomos B. Os autores mostraram um total de 130 genes diferencialmente expressos em comparação entre linhagens com presença de cromossomos B e sem presença de cromossomos B. Estes genes estão envolvidos principalmente no metabolismo celular e ligação de nucleótidos. Cromossomos A e B mostraram-se transcricionalmente ativos. A localização de *loci* de cromossomo B com genes ativos mostrou alta similaridade com o genoma A e retrotransposons em cromossomo B, que teve sequências com parcial homologia ao genoma A.

Em *Crepis capillaris* a presença de transcrição de genes RNAr do cromossomo B indicam que esses genes não estão totalmente suprimidos, porém a transcrição é rara, quando são comparados com o número de genes do RNAr no cromossomo B, o que

sugere que esta transcrição é rapidamente degradada quando comparada com a transcrição originada dos cromossomos A (LEACH et al., 2005).

Comprovando e delimitando que o cromossomo B possui cromatina para transcrição é necessário que este estudo de continuidade para que se possam identificar quais informações são transcritas, e o que estes possíveis genes localizados nestas regiões de replicação inicial, trazem de efeito fenotípico ao indivíduo portador do cromossomo B.

Conclusões

A população do de *Astyanax aff. scabripinnis* apresentou indivíduos com $2n=50$ e $2n=51$.

Foi possível identificar regiões claras e escuras no cromossomo B, no início da replicação cromossômica. A incorporação do BrdU *in vivo* revelou padrões de bandas longitudinais definidas.

O cromossomo B de *A. scabripinnis* possui uma compartimentalização cromossômica, alusiva aos isocores observados em outros metazoários, que estão envolvidos na compartimentalização do genoma e no suporte da regulação transcricional.

De acordo com esta compartimentalização encontrada foi possível mostrar que o cromossomo B desta espécie possui território e cromatina disponíveis para transcrever, especialmente nas bandas claras de replicação inicial, sendo estas: p1.1; p1.3; p2.2 e q1.1; q1.3; q2.1; q2.3.

Regiões marcadas com DNA repetitivo, As51 coincidem com algumas das regiões heterocromáticas de replicação tardia dos cromossomos do complemento A e cromossomo B.

As regiões de replicação tardia são correspondentes a blocos de heterocromatina constitutiva e localização preferencial de sequências repetitivas As51.

Com o fluorocromo CMA₃ foi possível evidenciar regiões ricas em CG em diferente contraste das regiões ricas em AT, confirmando o que foi identificado pela incorporação de BrdU e banca C.

O cromossomo B apresentou regiões claras e escuras, tal como nos cromossomos do par um e demais cromossomos do genoma, entretanto, isso não justifica sua origem através da não disjunção do par um.

Agradecimentos

À Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior pelo financiamento desta pesquisa. A Universidade Estadual de Ponta Grossa-PR a Universidade Federal de São Carlos-SP e Laboratório de Genética e Evolução locais que proporcionaram o desenvolvimento dessa pesquisa.

Referências

- AMORIM, I. C.; MILANI, D.; CABRAL-DE-MELLO, D.; ROCHA, M. F.; MOURA, R. C. Possible origin of B chromosome in *Dichotomius sericeus* (Coleoptera). **Genome**, 1-6, 2016.
- ARTONI, R. F.; MOLINA, W. F.; BERTOLLO, L. A. C.; GALETTI JR. P. M. Heterochromatin analysis in the fish species *Liposarcus anisitsi* (Siluriformes) and *Leporinus elongates* (Characiformes). **Genetic and Molecular Biology**, v. 22: 1, p. 39-44, 1999.
- BARBOSA, P.; OLIVEIRA, L. A.; PUCCI, M. B.; SANTOS, M. H.; MOREIRA-FILHO, O.; VICARI, M. R.; VIVIANE, N.; ALMEIDA, M. C.; ARTONI, R. F. Identification and chromosome mapping of repetitive elements in the *Astyanax scabripinnis* (Teleostei: Characidae) species complex. **Genetica**, v. 143, n. 1, p. 55-62, 2015.
- BERTOLLO, L. A. C.; TAKAHASHI, C. S.; MOREIRA-FILHO, O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Brazilian Journal of Genetics**, v. 1, n. 2, p. 103-120, 1978.
- BEUKEBOOM, L. W. Bewildering B: An impression of the 1st B–chromosome conference. **Heredity** 73: 328–336, 1994.
- BICKMORE, W. A.; CRAIG, J. **Chromosome Bands: Patterns in the Genome**. R. G. Landes, Austin, Texas, 1997.
- BREWER, B. J.; DILLER, J. D.; FRIEDMAN, K. L. The topography of chromosome replication in yeast. **Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology** p: 425–434, 1993.
- CAMACHO, J. P.; SHARBEL, T. F.; BEUKEBOOM, L. W. B-chromosome evolution **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 355, n. 1394, p. 163-178, 2000.
- 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, n. 8, p. 1907-1932, 2008.

DANIEL, S. N.; HASHIMOTO, D.T.; PANSONATO-ALVES, J. C.; FORESTI, F.; PORTO-FORESTI, F. Cytogenetic characterization of distinct B chromosomes in a population of the fish *Astyanax bockmanni* (Teleostei, Characiformes). **Caryologia**, v. 65, n. 3, p. 229-233, 2012.

DANIEL-SILVA, M. F. Z.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. Chromosome evolution in fish: BrdU replication patterns demonstrate chromosome homologies in two species of the genus *Astyanax*. **Cytogenetic and genome research**, v. 109, n. 4, p. 497-501, 2005.

DANIEL-SILVA, M. F. Z.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. D. Chromosome R-banding pattern and conservation of a marker chromosome in four species, genus *Astyanax* (Characidae, Tetragonopterinae). **Caryologia**, v. 54, n. 3, p. 209-215, 2001.

FENOCCHIO, A. S.; VENERE, P. C.; CESAR, A. C. G.; DIAS A. L.; BERTOLLO, L. A. C. Short term culture from solid tissues of fishes. **Caryologia**, v. 44, n.2, p.161-166, 1991.

FERRO, D. A. M.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. B chromosome polymorphism in the fish, *Astyanax scabripinnis*. **Genetica**, v. 119, n. 2, p. 147-153, 2003.

GILES, V.; THODE, G.; ALVAREZ, M. C. Early replication bands in two scorpion fishes, *Scorpaena porcus* and *S. notata* (order Scorpaeniformes). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 47, n. 1-2, p. 80-83, 1988.

HASHIMOTO, D. T.; GONÇALVES, V. R.; BORTOLOZZI, J.; FORESTI, F.; PORTO-FORESTI, F. First report of a B chromosome in population of the *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 1, p. 275-278, 2008.

HOUBEN, A.; BANAEI-MOGHADDAM, A. M.; KLEMME, S. TIMMIS, J. N. Evolution and biology of supernumerary B chromosomes. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 71, n. 3, p. 467-478, 2014.

HUANG, W.; DU, Y.; ZHAO, X.; JIN, W. B chromosome contains active genes and impacts the transcription of A chromosomes in maize (*Zea mays* L.). **BMC Plant Biology**, v. 16(1), 1, 2016.

JESUS, C. M.; GALETTI Jr. P. M.; VALENTINI, S. R.; MOREIRA-FILHO, O. Molecular characterization and chromosomal location of two families of satellite DNA in *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae), a species with B chromosomes. **Genetica**, v. 118, n. 1, p. 25-32, 2003.

JONES, R. N. Tansley review no 85: B chromosomes in plants. **New Phytologist**, v. 131, n. 4, p. 411-434, 1995.

JONES, R. N.; REES, H. B Chromosomes. **Academic Press**, London, 1982.

LEACH, C. R.; HOUBEN, A.; FIELD, B.; PISTRICK, K.; DEMIDOV, D.; TIMMIS, J. N. Molecular evidence for transcription of genes on a B chromosome in *Crepis capillaris*. **Genetics**, 171(1), 269-278, 2005.

MAISTRO, E. L.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. R-and G-band patterns in *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characiformes, Characidae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 22, n. 2, p. 201-204, 1999.

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

MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C.; GALETTI, Jr. P. M. B chromosome in the fish *Astyanax scabripinnis* (Characidae, Tetragonopterina): An overview in natural populations. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 106, n. 2-4, p. 230-234, 2004.

MOREIRA-FILHO, O.; FENOCCHIO, A. S.; PASTORI, M. C.; BERTOLLO, L. A. C. Occurrence of a metacentric macrochromosome B in different species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae, Tetragonopterinae). **Cytologia**, v. 66, n. 1, p. 59-64, 2001.

NÉO, D. M.; MOREIRA-FILHO, O.; CAMACHO, J. P. M. Altitudinal variation for B chromosome frequency in the characid fish *Astyanax scabripinnis*. **Heredity**, v. 85, n. 2, p. 136-141, 2000.

OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; FORESTI, F. Karyotype evolution in neotropical fishes. **Fish cytogenetics**, p. 111-164, 2007.

PINKEL, Dr.; STRAUME, T.; GRAY, J. W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 83, n. 9, p. 2934-2938, 1986.

PUERTAS, M. J. Nature and evolution of chromosome in plants: a non-cod but information-rich part of plant genomes. **Cytogenetic Genome** 96:198 205, 2002.

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

SCHWEIZER, D. Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatic regions (DA-DAPI bands) in human chromosomes. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 27, n. 2-3, p. 190-193, 1980.

SILVA, D. M. Z.; PANSONATO-ALVES, J. C.; UTSUNOMIA, R.; ARAYA-JAIME, C.; RUIZ-RUANO, F.J. Delimiting the Origin of a B Chromosome by FISH Mapping, Chromosome Painting and DNA Sequence Analysis in *Astyanax paranae* (Teleostei, Characiformes). **PLoS one**, v. 9, n. 4, p. e b 94896, 2014.

SUMMER, A. T. **Chromosomes: organization and function**. Cap. 10, 2003.

SUMNER, A. T. A. Simple Technique for Demonstrating Centromeric Heterochromatin. **Experimental cell research**, v. 75, n. 1, p. 304-306, 1972.

TANAY, A.; CAVALLI, G. Chromosomal domains: epigenetic contexts and functional implications of genomic compartmentalization. **Current opinion in genetics e development**, v. 23, n. 2, p. 197-203, 2013.

UTSUNOMIA, R.; DE ANDRADE SILVA, D. M. Z.; RUIZ-RUANO, F. J.; ARAYA-JAIME, C.; PANSONATO-ALVES, J. C.; SCACCHETTI, P. C.; CAMACHO, J. P. M. Uncovering the ancestry of B chromosomes in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Teleostei, Characidae). **PloS one**, 11(3), e0150573, 2016.

VICARI, M. R.; NOGAROTO, V.; NOLETO, R. B.; CESTARI, M. M.; CIOFFI, M. B.; ALMEIDA, M. C.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C.; ARTONI, R. F. Satellite DNA and chromosomes in Neotropical fishes: Methods, applications and perspectives. **Journal of Fish Biology**, v. 76, n. 5, p. 1094-1116, 2010.

VICARI, M. R.; PISTUNE, H. F. M.; CASTRO, J. P.; ALMEIDA, M. C.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O.; CAMACHO, J. P. M.; ARTONI, R. F. New insights on the origin of B chromosome in *Astyanax scabripinnis* obtained by chromosome painting and FISH. **Genetica**, v. 139, n. 8, p. 1073-1081, 2011.

VICENTE, V. E.; MOREIRA-FILHO, O.; CAMACHO, J. P. M. Sex-ratio distortion associated with the presence of a B chromosome in *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 74, n. 1-2, p. 70-75, 1996.

VOLOBUJEV, V. T. The B-chromosome system of mammals. **Caryologia**, v. 34, p.1-23, 1981.

WILSON, C. B. Additional notes on the development of the Argulidae, with description of a new species. **Proceedings of the United States National Museum**. 32:411–424, 1907.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo a população do de *Astyanax aff. scabripinnis* da localidade da Fazenda Lavrinha, bacia do Rio Paraíba do Sul apresentou indivíduos com $2n=50$ e $2n=51$, este com presença cromossomo B metacêntrico.

Com o objetivo de investigar se o padrão de replicação e a natureza da cromatina do cromossomo B evidenciam possíveis regiões transcricionais no cariótipo em *A. scabripinnis*, foi incorporado análogo de base BrdU *in vivo* a fim de obter padrões de bandas de replicação. A incorporação do BrdU *in vivo* revelou padrões de bandas consistentes, mostrando regiões da cromatina que podem estar servindo de matéria prima para o genoma, ou seja, regiões de transcrição. Estas regiões foram determinadas de acordo com a sua localização: p1.1; p1.3; p2.2 e q1.1; q1.3; q2.1; q2.3. Foi possível identificar regiões claras e escuras no cromossomo B, no início da replicação cromossômica, através das bandas longitudinais, confirmando que a replicação não acontece de forma homogênea.

Com o fluorocromo CMA₃ foi possível evidenciar regiões ricas em CG em contraste diferente das regiões ricas em AT mostrando que as regiões ricas em CG coincidem com regiões de replicação inicial, confirmando o que foi identificado pela incorporação de BrdU e banca C.

Com o mapeamento das sequências repetitivas em cromossomos B de *A. scabripinnis* foi possível concluir que regiões marcadas com DNA repetitivo, As51 coincidem com algumas das regiões heterocromáticas de replicação tardia dos cromossomos do complemento A e especialmente do cromossomo B. As regiões de replicação tardia são correspondentes a blocos de heterocromatina constitutiva e localização preferencial de sequências repetitivas As51.

Ao analisar possíveis homologias do padrão de bandas de replicação do cromossomo B com os cromossomos do complemento padrão A, foi possível concluir que, apesar do cromossomo B apresentar um padrão de bandas de replicação, apresentando regiões claras e escuras, tal como nos cromossomos do par um e demais cromossomos do genoma, não justifica a hipótese de sua origem ter sido através da não disjunção do par um, visto que, a hipótese de origem por isocromossomo estar amplamente discutida, consolidada e comprovada por muitos estudos.

Este padrão de replicação coincide, não de forma homóloga, com as bandas dos cromossomos do complemento A, mostrando claramente a evidência da presença de cromatina para transcrição, no cromossomo B.

REFERÊNCIAS

- AMORIM, I. C.; MILANI, D.; CABRAL-DE-MELLO, D.; ROCHA, M. F.; MOURA, R. C. Possible origin of B chromosome in *Dichotomius sericeus* (Coleoptera). **Genome**, 1-6, 2016.
- ARTONI, R. F.; MOLINA, W. F.; BERTOLLO, L. A. C.; GALETTI JR., P. M. Heterochromatin analysis in the fish species *Liposarcus anisitsi* (Siluriformes) and *Leporinus elongates* (Characiformes). **Genetic and Molecular Biology**, v. 22: 1, p. 39-44, 1999.
- BARBOSA, P.; OLIVEIRA, L. A.; PUCCI, M. B.; SANTOS, M. H.; MOREIRA-FILHO, O.; VICARI, M. R.; VIVIANE, N.; ALMEIDA, M. C.; ARTONI, R. F. Identification and chromosome mapping of repetitive elements in the *Astyanax scabripinnis* (Teleostei: Characidae) species complex. **Genetica**, v. 143, n. 1, p. 55-62, 2015.
- BENVIN, A. L.; CREEGER, Y.; FISHER, G. W.; BALLOU, B.; WAGGONER, A.S.; ARMITAGE, B. A. Fluorescent DNA nanotags: supramolecular fluorescent labels based on intercalating dye arrays assembled on nanostructured DNA templates. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 7, p. 2025-2034, 2007.
- BERIDZE, T. Satellite DNA. **Germany: Verlag Berlin Heidelberg**, 149p, 1986.
- BERNARDI, G. The isochore organization of the human genome and its evolutionary history – a review. **Gene**, v. 135, n. 1-2, p. 57-66, 1993.
- BERNARDI, G. The isochore organization of the human genome. **Annual Review of Genetics** 23, 637–661, 1989.
- BERTOLLO, L. A. C.; TAKAHASHI, C. S.; MOREIRA-FILHO, O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Brazilian Journal of Genetics**, v. 1, n. 2, p. 103-120, 1978.
- BEUKEBOOM, L.W. Bewildering B: An impression of the 1st B–chromosome conference. **Heredity** 73:328–336, 1994.
- BICKMORE, W. A.; CRAIG, J. **Chromosome Bands: Patterns in the Genome**. R.G. Landes, Austin, Texas, 1997.
- BREWER, B. J.; DILLER, J. D.; FRIEDMAN, K. L. The topography of chromosome replication in yeast. **Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology** p: 425–434, 1993.
- BRITSKI, H. A. Peixes de água doce do Estado de São Paulo: Sistemática. In: BRANCO, S. M. (Org.). **Poluição e Piscicultura**. São Paulo, Brasil: Faculdade de Saúde Pública da USP e Instituto de Pesca. São Paulo, p. 79-108, 1972.

BRITSKI, H. A.; SATO, Y.; ROSA, A. B. S. **Manual de identificação de peixes da Região de Três Marias: com chaves de identificação para os peixes da Bacia do São Francisco**. 3 ed. Brasília: Codevasf, 1988.

BROWN, S.W. Heterochromatin. **Science** v: 151: 417-425, 1966.

BUSSIEK, M.; HOISCHEN, C.; DIEKMANN, S.; BENNINK, M.L. Sequence-specific physical properties of African green monkey alpha-satellite DNA contribute to centromeric heterochromatin formation. **Journal of structural biology**, v. 167, n. 1, p. 36-46, 2009.

CAMACHO, J. P.; SHARBEL, T. F.; BEUKEBOOM, L. W. B-chromosome evolution **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 355, n. 1394, p. 163-178, 2000.

CAMACHO, M. R.; PHILLIPSON, S. L.; CROFT, P. N.; MARSHALL, S.J.; GHAZANFAR, S. A. Screening of plants extracts for antiprotozoal and cytotoxic activities. **Journal of ethnopharmacology**, v. 89, n. 2, p. 185-191, 2003.

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, n. 8, p. 1907-1932, 2008.

CASTRO, J. P.; MOURA, M. O.; MOREIRA-FILHO, O.; SHIBATTA A. O.; SANTOS, M. H.; NOGAROTO, V.; VICARI, M. R.; ALMEIDA, M. C.; ARTONI, R. F. Diversity of the *Astyanax scabripinnis* species complex (Teleostei: Characidae) in the Atlantic Forest, Brazil: species limits and evolutionary inferences. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 25, n. 1, p. 231-244, 2015.

CASTRO, P. J.; MOURA, M. O.; Moreira-Filho, O.; SHIBATTA, O. A.; SANTOS, M. H.; NOGAROTO, V.; VICARI, R. M.; ALMEIDA, C. M.; ARTONI, F. R. Evidence of incipient speciation in *Astyanax scabripinnis* species complex (Teleostei: Characidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 12, n. 2, p. 429-438, 2014.

CUNY, G.; SORIANO, P.; MACAYA, G.; BERNARDI, G. The major components of the mouse and human genomes: preparation, basic properties and compositional heterogeneity. **European Journal of Biochemistry**, v. 115, n. 2, p. 227-233, 1981.

DANIEL, S. N.; HASHIMOTO, D. T.; PANSONATO-ALVES, J. C.; FORESTI, F.; PORTO-FORESTI, F. Cytogenetic characterization of distinct B chromosomes in a population of the fish *Astyanax bockmanni* (Teleostei, Characiformes). **Caryologia**, v. 65, n. 3, p. 229-233, 2012.

DANIEL-SILVA, M. F. Z.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. Chromosome evolution in fish: BrdU replication patterns demonstrate chromosome homologies in two species of the genus *Astyanax*. **Cytogenetic and genome research**, v. 109, n. 4, p. 497-501, 2005.

DANIEL-SILVA, M. F. Z.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. Chromosome R-banding pattern and conservation of a marker chromosome in four species, genus *Astyanax* (Characidae, Tetragonopterinae). **Caryologia**, v. 54, n. 3, p. 209-215, 2001.

ESCHMEYER, W. N.; FONG, R. 2015. Catalog of Fishes, California Academy of Sciences. Disponível em: <<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalogSpeciesByFamily.asp>> acesso em: 15 out. 2015.

FENOCCHIO, A. S.; VENERE, P. C.; CESAR, A. C. G.; DIAS A. L.; BERTOLLO, L. A. C. Short term culture from solid tissues of fishes. **Caryologia**, v. 44, n.2, p.161-166, 1991.

FERRO, D. A. M.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. B chromosome polymorphism in the fish, *Astyanax scabripinnis*. **Genetica**, v. 119, n. 2, p. 147-153, 2003.

GILES, V.; THODE, G.; ALVAREZ, M. C. Early replication bands in two scorpion fishes, *Scorpaena porcus* and *S. notata* (order Scorpaeniformes). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 47, n. 1-2, p. 80-83, 1988.

HASHIMOTO, D. T.; GONÇALVES, V. R.; BORTOLOZZI, J.; FORESTI, F.; PORTO-FORESTI, F. First report of a B chromosome in population of the *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 1, p. 275-278, 2008.

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

HOUBEN, A.; BANAEI-MOGHADDAM, A. M.; KLEMME, S. TIMMIS, J. N. Evolution and biology of supernumerary B chromosomes. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 71, n. 3, p. 467-478, 2014.

HOWELL, W. M.; BLACK, D. A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia**, v. 36, n. 8, p. 1014-1015, 1980.

HUANG, W.; DU, Y.; ZHAO, X.; JIN, W. B chromosome contains active genes and impacts the transcription of A chromosomes in maize (*Zea mays* L.). **BMC Plant Biology**, v 16 (1), 1, 2016.

JESUS, C. M.; GALETTI Jr., P. M.; VALENTINI, S. R.; MOREIRA-FILHO, O. Molecular characterization and chromosomal location of two families of satellite DNA in *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae), a species with B chromosomes. **Genetica**, v. 118, n. 1, p. 25-32, 2003.

JONES, R. N. Tansley review no 85: B chromosomes in plants. **New Phytologist**, v. 131, n. 4, p. 411-434, 1995.

JONES, R. N.; REES, H. B Chromosomes. **Academic Press**, London, 1982.

KANTEK, D. L. Z.; VICARI, M. R.; PERES, W. A. M.; CESTARI, M. M.; ARTONI, R. F.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. Chromosomal location and distribution of

As51 satellite DNA in five species of the genus *Astyanax* (Teleostei, Characidae, Incertae sedis). **Journal of Fish Biology**, v. 75, n. 2, p. 408-421, 2009.

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

KIDWELL, M. G.; LISH, D.R. Perspective: transposable elements, parasitic DNA, and genome evolution. **International Journal of Organic Evolution**, Lancaster, v. 55, n.1 p. 1-24, 2001.

KURENOVA, E.; CHAMPION, L.; BIESSMANH, H.; MASON, J. M. Direction gene silencing induced by a complex subtelomeric satellite from *Drosophila*. **Chromosoma**, v. 107, n. 5, p. 311-320, 1998.

LEACH, C. R.; HOUBEN, A.; FIELD, B.; PISTRICK, K.; DEMIDOV, D.; TIMMIS, J. N. Molecular evidence for transcription of genes on a B chromosome in *Crepis capillaris*. **Genetics**, 171(1), 269-278, 2005.

LEWINSOHN, D. K.; PRADO, P. I. **Biodiversidade brasileira: síntese do estado atual do conhecimento**. São Paulo: Editora Contexto, 2002.

LYON, M. F., Chromosomal and subchromosomal inactivation. **Annual review of genetics**, v. 2, n. 1, p. 31-52, 1968.

MAISTRO, E. L.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. R-and G-band patterns in *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characiformes, Characidae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 22, n. 2, p. 201-204, 1999.

MAYR, E. Systematics and the origin of species, from the viewpoint of a zoologist. Harvard University Press, 1942.

MEDRANO, L.; BERNARDI, G.; COUTURIER, J.; DUTRILLAUX, B.; BERNARDI, G. Chromosome banding and genome compartmentalization in fishes. **Chromosoma**, v. 96, n. 2, p. 178-183, 1988.

MELLO, M. L. S. Heterocromatina. **Revista Ciência e Cultura**, 30: 290-303, 1978.

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

MIRANDE, J. M. Weighted parsimony phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes). **Cladistics**, v. 25, n. 6, p. 574-613, 2009.

MONOD, M.; JACCOUD, S.; ZAUGG, C.; LECHENN, B.; BAUDRAZ, F.; PANIZZON, R. Survey of dermatophyte infections in the Lauseanne area (Switzerland). **Dermatology**, v. 205: 201-203, 2002.

- MOREIRA, C. R. **Relações Filogenéticas na ordem Characiformes (Teleostei: Ostariophysi)**. 485f. Tese (Doutorado em Ciências)–Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): A species complex. **Revista Brasileira de Genética**, 14: 331-347, 1991.
- MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C.; GALETTI, Jr. P. M. B chromosome in the fish *Astyanax scabripinnis* (Characidae, Tetragonopterina): An overview in natural populations. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 106, n. 2-4, p. 230-234, 2004.
- MOREIRA-FILHO, O.; FENOCCHIO, A. S.; PASTORI, M. C.; BERTOLLO, L. A. C. Occurrence of a metacentric macrochromosome B in different species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae, Tetragonopterinae). **Cytologia**, v. 66, n. 1, p. 59-64, 2001.
- MORELLI, S.; BERTOLLO, L. A. C.; FORESTI, F.; MOREIRA-FILHO, O.; TOLEDO-FILHO, S. A. Cytogenetic considerations on the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). I Karyotypic variability. **Caryologia**, v. 36, n. 3, p. 235-244, 1983.
- NELSON, J. S. **Fishes of the World** 4.ed. New Jersey: John Wiley e Sons, 2006.
- NÉO, D. M.; MOREIRA-FILHO, O.; CAMACHO, J. P. M. Altitudinal variation for B chromosome frequency in the characid fish *Astyanax scabripinnis*. **Heredity**, v. 85, n. 2, p. 136-141, 2000.
- OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO L. F.; FORESTI, F.; BRITSKI A.; TOLEDO FILHO, S. A. Chromosome formulae of neotropical freshwater fishes. **Revista Brasileira Genética**, v. 11, n. 57, p. 624, 1988.
- OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; FORESTI, F. Karyotype evolution in neotropical fishes. **Fish Cytogenetics**, p. 111-164, 2007.
- OSTERGREN, G. Parasitic nature of extra fragment chromosomes. **Bot. Notiser** v.2, p.157-163, 1945.
- PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J. W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 83, n. 9, p. 2934-2938, 1986.
- PLOHL, M.; LUCHETTI, A.; MESTROVIC, N.; MONTOVANI, B. Sattelite DNAs between selfishness and functionality: Structure, genomics and evolution of tandem repeats in centromeric (hetero) chromatin. **Gene**, v. 409, n. 1, p. 72-82, 2008.
- PUERTAS, M. J. Nature and evolution of chromosome in plants: a non-cod but information-rich part of plant genomes. **Cytogenetic Genome** 96:198-205, 2002.
- REJON, M. R.; REJON, C. R.; OLIVER, J. L. Evolución de los cromosomas B. **Investigación y Ciencia**, v.133, p.92-101, 1987.

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

RODRIGUES, L. P.; QUEROL, E.; BRACCINI, M. C. Descrição morfo-histológica do ovário de *Acestrorhynchus pantaneiro* (MENEZES, 1992) (Teleostei, Characidae), em seus diferentes estádios de desenvolvimento, na bacia do Rio Uruguai médio, Uruguaiana, RS. **Biodiversidade Pampeana**, v.3, p. 11-18, PUCRS, 2005.

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

SÁNCHEZ, F. Las comunidades de peces de la plataforma del Cantábrico. **Publicaciones Especiales-Instituto Español de Oceanografía**. v.13 p.137, 1993.

SCHWEIZER, D. Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatic regions (DA-DAPI bands) in human chromosomes. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 27, n. 2-3, p. 190-193, 1980.

SHAW, M. W.; HEWITT, G. M. The genetic control of meiotic drive acting on the B chromosome of *Myrmeleotettix maculatus* (Orthoptera: Acrididae). **Heredity**, v. 54, p. 259-268, 1985.

SILVA, D. M. Z.; PANSONATO-ALVES, J. C.; UTSUNOMIA, R.; ARAYA-JAIME, C.; RUIZ-RUANO, F.J. Delimiting the Origin of a B Chromosome by FISH Mapping, Chromosome Painting and DNA Sequence Analysis in *Astyanax paranae* (Teleostei, Characiformes). **PloS one**, v. 9, n. 4, p. e94896, 2014.

SUMMER, A. T. **Chromosomes: organization and function**. Cap. 10, 2003.

SUMMER, A. T. **Chromosome banding**. London: /Unwin Hyman. p. 434, 1990.

SUMNER, A. T. A. Simple Technique for Demonstrating Centromeric Heterochromatin. **Experimental cell research**, v. 75, n. 1, p. 304-306, 1972.

TANAY, A.; CAVALLI, G. Chromosomal domains: epigenetic contexts and functional implications of genomic compartmentalization. **Current opinion in genetics e development**, v. 23, n. 2, p. 197-203, 2013.

UTSUNOMIA, R.; DE ANDRADE SILVA, D. M. Z.; RUIZ-RUANO, F. J.; ARAYA-JAIME, C.; PANSONATO-ALVES, J. C.; SCACCHETTI, P. C.; CAMACHO, J. P. M. Uncovering the ancestry of B chromosomes in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Teleostei, Characidae). **PloS one**, 11(3), e0150573, 2016.

VERMA, R. A.; BADU, A. **Human Chromosomes: Principles and Techniques**. 2º Ed. 1995.

VICARI, M. R.; NOGAROTO, V.; NOLETO, R. B.; CESTARI, M. M.; CIOFFI, M. B.; ALMEIDA, M. C.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C.; ARTONI, R. F. Satellite

DNA and chromosomes in Neotropical fishes: Methods, applications and perspectives. **Journal of Fish Biology**, v. 76, n. 5, p. 1094-1116, 2010.

VICARI, M. R.; PISTUNE, H. F. M.; CASTRO, J. P.; ALMEIDA, M. C.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O.; CAMACHO, J. P. M.; ARTONI, R. F. New insights on the origin of B chromosome in *Astyanax scabripinnis* obtained by chromosome painting and FISH. **Genetica**, v. 139, n. 8, p. 1073-1081, 2011.

VICENTE, V. E; MOREIRA-FILHO, O.; CAMACHO, J. P. M. Sex-ratio distortion associated with the presence of a B chromosome in *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 74, n. 1-2, p. 70-75, 1996.

VOLOBUJEV, V. T. The B-chromosome system of mammals. **Caryologia**, v. 34, p.1-23, 1981.

WHITE, M. J. D. **Animal cytology and Evolution**. Third edition, Cambridge University Press: London. p.961, 1973.

WILSON, C. B. Additional notes on the development of the Argulidae, with description of a new species. **Proceedings of the United States National Museum**. 32:411–424. 1907.

Anexo A - Licença permanente para coleta de material zoológico emitido pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis-IBAMA.



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

Licença permanente para coleta de material zoológico

Número: 15115-1		Data da Emissão: 02/04/2008 10:47
Dados do titular		
Registro no Ibama: 550248	Nome: Roberto Ferreira Artoni	CPF: 138.549.798-00
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA		CNPJ: 80.257.355/0001-08

Observações, ressalvas e condicionantes

1	A participação de pesquisador(a) estrangeiro(a) nas atividades previstas nesta autorização depende de autorização expedida pelo Ministério de Ciência e Tecnologia (CNPq/MCT).
2	A licença permanente não é válida para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) manutenção de espécimes de fauna silvestre em cativeiro; c) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e d) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna. A restrição prevista no item d não se aplica às categorias Reserva Particular do Patrimônio Natural, Área de Relevante Interesse Ecológico e Área de Proteção Ambiental constituídas por terras privadas.
3	O pesquisador titular da licença permanente, quando acompanhado, deverá registrar a expedição de campo no Sisbio e informar o nome e CPF dos membros da sua equipe, bem como dados da expedição, que constarão no comprovante de registro de expedição para eventual apresentação à fiscalização.
4	Esta licença permanente não exime o seu titular da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
5	Esta licença permanente não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais, esportivos ou para realização de atividades inerentes ao processo de licenciamento ambiental de empreendimentos.
6	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular da necessidade de atender ao disposto na Instrução Normativa Ibama nº 277/2002, que regulamenta o Sistema Nacional de Anilhamento de Aves Silvestres.
7	O pesquisador titular da licença permanente será responsável pelos atos dos membros da equipe (quando for o caso).
8	O órgão gestor de unidade de conservação estadual, distrital ou municipal poderá, a despeito da licença permanente e das autorizações concedidas pelo Ibama, estabelecer outras condições para a realização de pesquisa nessas unidades de conservação.
9	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
10	O titular da licença permanente deverá apresentar, anualmente, relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias após o aniversário de emissão da licença permanente.
11	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo Ibama e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
12	A licença permanente será válida enquanto durar o vínculo empregatício do pesquisador com a instituição científica a qual ele estava vinculado por ocasião da solicitação.
13	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospeção e desenvolvimento tecnológico.
14	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constantes de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexploradas ou ameaçadas de sobreexploração.

Táxons autorizados

#	Nível taxonômico	Taxon(s)
1	ORDEM	Characiformes, Gymnotiformes, Tetraodontiformes, Siluriformes, Synbranchiformes, Perciformes
2		

Destino do material biológico coletado

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

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

Código de autenticação: 85979796





Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Licença permanente para coleta de material zoológico

Número: 15115-1		Data da Emissão: 02/04/2008 10:47	
Dados do titular			
Registro no Ibama: 950248	Nome: Roberto Ferreira Afonso	CPF: 138.540.796-00	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA		CNPJ: 80.257.385/0001-08	

Anexo para registrar Coletas Imprevistas de Material Biológico

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

Nível	Taxon*	Qtde.	Armadilha	Qtde.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico mais específico possível.

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

Código de autenticação: 85979796



Página 2/2

Anexo B - Parecer da Subcomissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Ponta Grossa-PR.

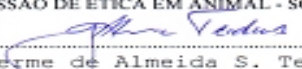


PARECER Nº 02/2008
Protocolo: 04509/08

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

Ponta Grossa, 08 de maio de 2008.

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


Profº Guilherme de Almeida S. Tedrus
Coordenador substituto da SCEEa

Anexo C - Obtenção dos cromossomos mitóticos

Para a obtenção dos cromossomos mitóticos foi utilizado o procedimento descrito por (BERTOLLO et al., 1978).

Injetar intra-abdominalmente no animal uma solução aquosa de colchicina 0,0125 %, na proporção de 1 ml/100 g de peso. Manter os peixes em aquário bem aerado durante 50-60 minutos, posteriormente anestesiá-los com benzocaína diluída a 0,01%, e sacrificá-los. Retirar a porção do rim anterior e dissociar com uma seringa desprovida de agulha em cerca de 10ml de solução hipotônica (KCl 0,075M).

Incubar o tecido dissociado em estufa a 37°C durante 25-30 minutos, e depois ressuspender com auxílio de uma pipeta Pasteur e colocar em tubo de centrífuga. Adicionar neste tubo algumas gotas de fixador (3 partes de metanol para 1 de ácido acético glacial), ressuspender o material novamente repetidas vezes (até ser homogeneizado), centrifugar durante 10 minutos, a 900 rpm e depois descartar o sobrenadante.

Após a centrifugação adicionar 5-7ml do mesmo fixador, ressuspender e centrifugar por mais 10 minutos a 900 rpm, repetir mais uma vez. Descartar o sobrenadante e adicionar uma quantidade de fixador para obter uma suspensão celular moderadamente concentrada (geralmente de 0,5 a 1,0ml), ressuspender e adicionar em freezer para posterior utilização.

Para confecção de lâminas gotejar de 1-2 gotas da suspensão celular, com uma pipeta Pasteur. Em lâmina limpa, levemente inclinada, com uma película d'água a 60°C, de tal forma que a água escorra e permita que o material fique aderido sobre a lâmina. Deixar o material secar ao ar e corar com solução de Giemsa a 5%, em tampão fosfato pH=6,8 durante 6 a 8 minutos.

Anexo D - Obtenção de metáfases mitóticas, método indireto “in vitro”

O procedimento seguiu o protocolo descrito por (FENOCCHIO et al., 1991).

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

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

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

Pingar 300µl de colchicina (0,025%) em cada recipiente 25 minutos antes de completar o tempo. Agitar suavemente a placa de Petri para homogeneizar o material e manter em estufa até o término do tempo;

Transferir a cultura para um tubo de ensaio e centrifugar por 10 minutos a 800-900 rpm;

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

Preparar solução fixadora com três partes de metanol para uma parte de ácido acético e manter sob refrigeração. Após o tempo da hipotonização, adicionar cerca de 1 ml do fixador em cada tubo. Ressuspender o material até ficar homogêneo, e centrifugar por 10 minutos de 800 a 900 rpm;

Descartar o sobrenadante e em seguida completar o tubo até o volume de 8ml. Ressuspender o material novamente e centrifugar por 10 minutos de 800 a 900 rpm; Repetir a etapa anterior por duas vezes descartado o sobrenadante, colocar fixador e ressuspender o material. Armazenar esta solução em tubo de microcentrífuga em freezer à -20°C ou gotejar o material sobre lâminas de vidro previamente limpas e secar ao ar.

Anexo E - Incorporação do análogo de base BrdU (5-bromo-2'-deoxiuridina)

O procedimento seguiu o protocolo descrito por (GILES et al., 1988).

Inocular intraperitonealmente *in vivo*, o análogo de base BrdU (5-bromo-2'-deoxiuridina) (5mg/ml em solução 0,9% NaCl), na proporção de 1ml/100g de peso corporal do indivíduo, deixando agir 6 horas, para obtenções de bandas de replicação inicial, posteriormente, anestésiar e sacrificar os indivíduos e submetê-los à técnica de obtenção cromossômica previamente descrita.

Preparar as lâminas com as suspensões celulares dos exemplares, deixar envelhecer por dois dias em estufa a 37°C e após esse período, lavar em solução de 2x SSC, corar no escuro, com 40µl de Hoescht 6024 (Sigma) (1mg de Hoescht/1ml de metanol e 100ml de 0,5x SSC), em seguida recobrir com lamínula e incubar por 60 minutos em câmara escura umedecida.

Lavar as lâminas com jatos de água destilada para a retirada das lamínulas e do corante e secar ao ar, em seguida recobrir com uma camada de 2xSSC e expor à luz de uma lâmpada ultravioleta 15 watts (254 nm) a uma distância de 10 cm em uma câmara escura por um período de 60 minutos.

Por último, incubar em 2xSSC a 60°C, por 20 minutos, lavar com água destilada e secá-las ao ar, após corar com solução de giemsa a 5%, diluído em tampão fosfato pH 6,8, durante 10 minutos, lavar com água destilada, secá-las ao ar e analisar sob microscopia ótica.

Anexo F - Detecção da Heterocromatina Constitutiva

O procedimento seguiu o protocolo descrito por (SUMNER, 1972).

Tratar as lâminas contendo o material celular com ácido clorídrico (HCl) 0,2 N, a 37°C, durante 10 minutos e posteriormente lavar com água destilada.

Incubar a 28°C em solução de bário $Ba(OH)_2$ durante 1 a 2 minutos. Depois colocar as lâminas submersas em solução de ácido clorídrico 0,2 N e lavar com água destilada. Deixar o material imerso em solução salina (*saline salt citrate*) 2xSSC, a 60°C, durante 40 minutos, lavar em água destilada e secar ao ar.

Corar as lâminas com solução de giemsa a 2%, em tampão fosfato pH=6,8 durante 15 minutos.

Anexo G - Hibridação *in situ* fluorescente (FISH)

O procedimento seguiu o protocolo descrito por (PINKEL et al., 1986)

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

Desidratar o material em série alcoólica 70%, 85% e 100%, 5 minutos cada e secar. Incubar as lâminas em 90µl de RNase (0,4% RNase/ 2xSSC) a 37 °C por 1 hora em câmara úmida com água milli Q.

Lavar três vezes por 5 minutos em 2xSSC.

Lavar durante 5 minutos em PBS uma vez.

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

Lavar em PBS uma vez por 5 minutos sob agitação.

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

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

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

Desidratar o material em série alcoólica 70%, 85% e 100% durante 5 minutos cada. Preparar câmara úmida à 37 °C.

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

Lavagens:

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

Lavar as lâminas três vezes em 0,1x SSC a 60 °C, por 5 minutos cada sob agitação.

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

Incubar as lâminas em tampão 5% NFDM (*non fat dry milk*) 4xSSC por 15 minutos.

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

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

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

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

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

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

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

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

Montagem da lâmina:

Misturar 200µl de anti-fading mais 1µl de DAPI (4'6 diamidino-2 phenilindole) (50µg/ml). Colocar 25µl da solução e cobrir com lamínula. Guardar no escuro.

Anexo H - Coloração CMA₃ DAPI

O procedimento seguiu o protocolo descrito por (SCHWEIZER, 1980) com adaptações.

Sobre uma lâmina, preparada segundo a técnica descrita para cromossomos mitóticos, colocar cerca de 150µl de solução de distamicina, 0,3mg/ml, utilizando uma micropipeta.

Cobrir com uma lamínula e deixar agindo por 15 minutos. Escorrer a lamínula e lavar a lâmina em água destilada ou água corrente rapidamente e deixar a lâmina em tampão McIlvaine por alguns minutos. Deixar secar ao ar.

Colocar 150µl da solução de cromomicina A₃ (dissolver 5 mg de mitramicina em 10 ml de tampão McIlvaine diluído 1:1 em água destilada e adicionar 5 mM de cloreto de magnésio, deixar a cromomicina dissolver lentamente na geladeira por alguns dias), com auxílio de uma micropipeta, sobre a lâmina, cobri-la novamente com uma lamínula e deixar corando por 60 minutos no escuro.

Escorrer a lamínula e lavar a lâmina, em água corrente, em jatos fortes, por aproximadamente 3 minutos e depois deixá-la em tampão McIlvaine por mais ou menos 1 minuto. Secar a lâmina no escuro a temperatura ambiente.

Mergulhar a lâmina em solução de DAPI 0,3µg/ml, recém-preparada, por 15 minutos, preferencialmente no escuro. Lavar a lâmina em água corrente, em jatos fortes.

Deixar a lâmina secar no escuro e montá-la com uma nova lamínula, utilizando meio de solução de sacarose saturada, filtrada antes do uso.

Deixar a lâmina guardada na geladeira à 4°C, no escuro, por no mínimo 15 dias antes de analisá-la (para aumentar a estabilidade do fluorocromo) ou cobrir com *anti-fading* e analisar após 24 h.