

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PROGRAMA DE POS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ESTRUTURAL, MOLECULAR E GENÉTICA

JESÚS MARÍA HERNÁNDEZ GÓMEZ

AVALIAÇÃO CITOGENÔMICA DO CROMOSSOMO B EM *Psalidodon scabripinnis*
(TELEOSTEI: CHARACIDAE): IMPLICAÇÕES PARA O DRIVE MEIÓTICO

PONTA GROSSA

2024

JESÚS MARÍA HERNÁNDEZ GÓMEZ

AVALIAÇÃO CITOGENÔMICA DO CROMOSSOMO B EM *Psalidodon scabripinnis*
(TELEOSTEI: CHARACIDAE): IMPLICAÇÕES PARA O DRIVE MEIÓTICO

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 requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas (Área de concentração: Biologia Evolutiva)

Orientador: Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni
Coorientador: Prof. Dr. André Marques

PONTA GROSSA

2024

H557 Hernández Gómez, Jesús María
 Avaliação citogenômica do cromossomo B em *Psalidodon scabripinnis*
 (Teleostei: Characidae): implicações para o drive meiótico / Jesús María
 Hernández Gómez. Ponta Grossa, 2024.
 63 f.

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

 Orientador: Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni.
 Coorientador: Prof. Dr. André Marques.

 1. Meiose. 2. Ovócitos. 3. Inovação metodológica. 4. Herança não
 mendeliana. 5. Elementos genéticos egoístas. I. Artoni, Roberto Ferreira. II.
 Marques, André. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Biologia Evolutiva.
 IV.T.

CDD: 576



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. 02/2024

Ata referente a 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, pelo candidato JESÚS MARÍA HERNÁNDEZ GÓMEZ aos *vinte e sete dias de fevereiro de dois mil e vinte e quatro*, sob a presidência do Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni em sessão pública, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação de Mestrado do aluno Jesús María Hernández Gómez, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Área de concentração em Biologia Evolutiva, constituída por: Prof. Dr. George Shigueki Yasui (USP – FMVZ), Prof. Dr. Jonathan Pena Castro (SEED – Paraná), Prof. Dr. Tiago Marafija Degrandi (PPG-BioEvol – UEPG) 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 candidato das normas que regem a defesa de Dissertação. A seguir o candidato passou a defesa da sua Dissertação intitulada: “**Drive meiótico do cromossomo B em fêmeas de *Psalidodon scabripinnis* (TELEOSTEI: Characidae)**”. Encerrada a defesa, procedeu-se ao julgamento e a Comissão Examinadora considerou o candidato **APROVADO**. 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 depósito da versão definitiva e corrigida na biblioteca da IES **até o prazo máximo de 90 dias após a defesa**; o não depósito da versão definitiva da Dissertação, 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.

Alteração de Título: sim não

NOVO TÍTULO:

Avaliação citogenômica do cromossomo B em *Psalidodon scabripinnis* (Teleostei: Characidae): Implicações para o drive meiótico

Ponta Grossa, 27 de fevereiro de 2024

Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni (PPG-BioEvol - UEPG)

Documento assinado digitalmente

Prof. Dr. George Shigueki Yasui (on line) (USP – FMVZ)



GEORGE SHIGUEKI YASUI
 Data: 27/02/2024 11:18:46-0300
 Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. Jonathan Pena Castro (SEED – Paraná)

Prof. Dr. Tiago Marafija Degrandi (PPG-BioEvol - UEPG)

Dedico este trabajo a mi amada familia: Dalys, Bernardo y Adriana, quienes, a pesar de la distancia, siempre me acompañan con su amor, apoyo incondicional y presencia constante, brindándome fortaleza y colmando mi vida de felicidad y optimismo...

A Glau, por su constante apoyo, su resiliencia, su ternura, y por todas las experiencias significativas compartidas...

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradecer a Deus, motor da vida e pai da evolução, por me brindar a força espiritual em meu dia a dia.

A minha mãe Dalys Gómez, meu pai Bernardo Hernández e minha irmã Adriana Hernández, minha bela e maravilhosa família. Obrigado por todo amor, carinho e apoio incondicional para cumprir este sonho de fazer mestrado longe de meu país. Obrigado por fazer de mim a pessoa que sou hoje, por todos os ensinamentos e cuidados durante toda a minha vida. Embora a distância física possa nos separar, saibam que vocês estão sempre presentes em meu dia a dia. Agradeço-lhes do fundo da minha alma por tudo o que fizeram e continuam a fazer por mim. Que esta expressão de gratidão seja apenas uma pequena amostra do amor infinito que tenho por vocês.

Ao resto da família na Colômbia por toda ajuda e atenção para fazer meus estudos no Brasil. Agradeço especialmente a meu primo, amigo, colega e irmão Allen René Ruiz Hernández pelo apoio e ânimos para empreender esta longa viagem. Fiquei muito feliz ao saber que você se mudou para Minas Gerais a fazer teus estudos de mestrado, seja muito bem-vindo ao Brasil. Esse fato é um impulso forte para eu continuar fazendo meus estudos de pós-graduação. Muchas gracias.

A meu orientador Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni, grande exemplo de pessoa e amigo. Obrigado por me aceitar como seu mestrando, por toda ajuda, apoio, atenção, confiança, paciência e muitos ensinamentos. Você é um excelente professor e pesquisador. Muito obrigado, sempre será uma honra trabalhar com você e agora ser seu doutorando.

A minha colega e amiga da faculdade Dra. Luz Elena de la Ossa Guerra, por me falar da oportunidade de fazer mestrado no PPG-BioEvol e pelo convite para trabalhar no LabGEV, pela atenção, ajuda e suporte durante o tempo de adaptação no Brasil. Além disso, agradeço a sua confiança em minhas capacidades como cientista, por me recomendar com o professor Roberto, e pelos ensinamentos de muitas técnicas. Muchas gracias.

Ao Dr. Jonathan Pena Castro, pela parceria e companheirismo, além da ajuda e ensinamentos na realização de diversos protocolos no laboratório, especialmente no concernente a FISH. Obrigado também por ser parte da minha banca de defesa.

Aos Doutores Tiago Marafiga Degrandi e Augusto Ferreira Jr pela ajuda e conselhos na execução de diversas técnicas, principalmente no manejo do citômetro. Igualmente ao prof. Dr. George Shigueki Yasui da USP pelas dicas na citometria de fluxo. Ao Tiago e o George, obrigado por serem parte da minha banca de defesa.

Às professoras Dra. Mara Cristina de Almeida Matiello e à Dra. Daniele Aparecida Matoso (*in memoriam*) pelas dicas e sugestões na banca de qualificação. Muito obrigado.

Em geral, a todo o pessoal do Laboratório de Genética e Evolução (LabGEv) pela ajuda, suporte, ensinamentos de técnicas, conhecimentos, manutenção dos peixes, etc. Ao técnico Miguel Airton Carvalho pelo suporte com os materiais e reagentes. A meu companheiro de mestrado e laboratório Samuel Mateus Massinhan por sua amizade, pelos bons conselhos e sabias palavras. Muito obrigado.

Ao Dr. Roger Dalcin, pela ajuda na coleta dos peixes na região de Campos do Jordão. Muito obrigado pela amizade, companhia nas viagens que fizemos, apoio e boas conversas. Agradecimento pela carona para Foz do Iguaçu em um momento e circunstâncias muito difíceis para mim. Você e a Luz fazem uma bonita dupla, desejo todo o melhor para vocês.

A todo o corpo de professores do PPG-BioEvol pelos ensinamentos durante minha formação de mestrado. Muito obrigado por me fornecer muitos conhecimentos e sugestões para ser um melhor cientista. Também agradeço aos professores da faculdade de Biologia da Universidad de Sucre por minha formação como biólogo, em especial a minha primeira orientadora, à Prof. Dra. Olga Perna Manrique (*in memoriam*). Sua morte repentina me entristeceu muito.

Ao meu colega e amigo Humberto Quintana pelo companheirismo, apoio e parceria desde a Colômbia. Obrigado por toda atenção e amizade de muitos anos desde os estudos na faculdade. É um prazer trabalhar com você na realização de artigos científicos, falar de ciência e entre outras coisas engraçadas.

A meu amigo e colega na Colômbia Lácides Gil, pela parceria, amizade, total apoio e muitas rodadas de bicicleta. Muito obrigado pelos bons conselhos e por me ajudar a filosofar sobre as questões da vida.

A meus companheiros de bicicleta do grupo Toxic Team MTB de Sincelejo, Colômbia por todo o apoio e ânimos para fazer esta longa viagem.

Ao Estado do Paraná através da Fundação Araucária pelo apoio financeiro mediante a concessão da bolsa de mestrado (Convênio nº 033/2021).

À cidade de Ponta Grossa “Princesa dos Campos” por me acolher como residente e fazer de minha estância no Brasil agradável.

Agradecimento especial a Rosecleia Korchak Alves e Valdivir Alves, por terem me aberto as portas da sua casa, por todo apoio, atenção e companhia que me forneceram. Imensa gratidão com vocês. A Joseph Davi Alves, por ser um menino com umas qualidades incríveis, por ser uma pessoa muito atenta comigo, amável, por me ensinar muitas coisas significativas

que nunca vou esquecer, por ser meu amigo, que todos teus sonhos se cumpram... Muito obrigado por tudo, vocês foram, junto a Glaucieli, minha segunda família, e sempre terão um lugar especial em meu coração. Nunca vou esquecer tudo o que fizeram por mim.

Finalmente, agradecimientos desde lo más profundo de mi corazón a una hermosa mujer que conocí en este maravilloso país, que habla un español de forma increíble, a una persona muy bella tanto física como espiritualmente, a una mujer que, a pesar de haber vivido muchos momentos difíciles siempre se levanta y sigue adelante sin importar los muchos obstáculos y problemas; te admiro profundamente... A esa mujer maravillosa, colega, profesora, compañera de estudios de maestría, futura doctora, amiga, confidente, flor valiente, inteligente, luchadora, amante de la naturaleza, experta en abejas, gran ejemplo de mamá... la que me enseñó el significado del verdadero amor en todas sus formas y matices... a Glaucieli Aparecida Alves. Glau, siento una inmensa gratitud contigo por haberme ayudado a ser una mejor persona, por todo amor, cariño, comprensión, apoyo y compañía que me brindaste, por todo lo que me enseñaste, por tu atención, por ayudarme a ser más fuerte... Infinitas gracias por todo. A pesar de las circunstancias, siempre tendrás un lugar muy especial en mi corazón y jamás olvidaré los momentos bellos y significativos que vivimos juntos. Muchísimas gracias Glau... Dios es maravilloso y sabe hacer sus cosas, y le agradezco mucho por haberte conocido. Alhamdulillah.

A todas as pessoas e organizações que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho de pesquisa.

Muchas gracias!!!

“Therefore, if anyone is in Christ, he is a new creation. The old has passed away; behold, the new has come”

2 Corinthians 5:17

“Tua palavra é lâmpada para o meu pé, e luz para meu caminho”

Salmo 119:105

“La suerte es donde confluyen la preparación y la oportunidad”

Séneca

“La felicidad no es lo que nos pasa, sino como interpretamos lo que nos pasa”

Marian Rojas Estapé

“La vida no es la que uno vivió, sino la que uno recuerda y cómo la recuerda para contarla”

Gabriel García Márquez

“Queda prohibido no sonreír a los problemas, no luchar por lo que quieres, abandonarlo todo por miedo, no convertir en realidad tus sueños”

Pablo Neruda

“Debemos dejar de obligarnos a encajar en espacios que ya no son de nuestro tamaño”

Irene Albacete

“Las palabras nunca alcanzan cuando lo que hay que decir desborda el alma”

Julio Cortázar

RESUMO

Os cromossomos B são elementos supranumerários no genoma que ocorrem em uma ampla variedade de organismos eucariotos, são importantes por seu papel na história evolutiva, e destaca-se o fato de que esses elementos em muitos casos possuem mecanismos de segregação preferencial aumentando sua frequência nas populações, fenômeno conhecido como “*Drive*”. Peixes do complexo *Psalidodon scabripinnis* possuem cromossomos B, onde diversos aspectos relacionados com esse elemento genético adicional já foram estudados, mas não se conhece se esse cromossomo possui a capacidade de drive. Neste sentido, o objetivo deste estudo foi estabelecer ferramentas para a determinação do drive meiótico do cromossomo B em fêmeas de *P. scabripinnis* de uma população do sudeste do Brasil. Para isso, foram amostradas fêmeas de *P. scabripinnis* com cromossomo B (B+) e sem cromossomo B (B-) do Ribeirão Grande, município de Pindamonhangaba-SP. Os indivíduos foram eutanasiados, extraídas as suas gônadas e submetidas ao protocolo de extração de núcleos de ovócitos. Adicionalmente, foram removidos os rins anteriores para a obtenção de células metafásicas para a verificação do número diploide. Foram testados três marcadores: SatDNA As51, sonda B e microssatélite CA₍₁₅₎ para análise de citogenética molecular nas preparações metafásicas e de núcleos de ovócitos. A citometria de fluxo foi usada para avaliar a quantidade de DNA em amostras de tecido de gônada de fêmeas com cromossomo B. A dupla FISH com as sondas B e As51 foram aquelas que apresentaram os melhores resultados na marcação do cromossomo B em núcleos de ovócitos e também em metafases mitóticas. Além disso, o marcador As51 ajudou na identificação de núcleos haploides e diploides, que foram corroborados pela citometria de fluxo. Os resultados obtidos no presente estudo apresentam ferramentas úteis para a determinação da existência ou não de drive no cromossomo B. Alguns avanços são ainda necessários para aprimorar esse método inovador, por exemplo, na diferenciação dos corpúsculos polares dos ovócitos maduros e na manutenção dos ovócitos por mais tempo em condições de análise.

Palavras chave: meiose, ovócitos, inovação metodológica, herança não mendeliana, elementos genéticos egoístas.

ABSTRACT

B chromosomes are supernumerary elements in the genome that occur in a wide variety of eukaryotic organisms, they are important for their role in evolutionary history, and the fact that these elements in many cases have preferential segregation mechanisms increases their frequency in populations, a phenomenon known as “*Drive*”. Fish from the *Psalidodon scabripinnis* complex have B chromosomes, where several aspects related to this additional genetic element have already been studied, but it is not known whether this chromosome has the drive capacity. In this sense, the objective of this study was to establish tools for determining the meiotic drive of the B chromosome in *P. scabripinnis* females from a population in southeastern Brazil. For this, females of *P. scabripinnis* with chromosome B (B+) and without chromosome B (B-) were sampled from Ribeirão Grande, municipality of Pindamonhangaba-SP. The individuals were euthanized, their gonads extracted and subjected to the oocyte nuclei extraction protocol. Additionally, the anterior kidneys were removed to obtain metaphase cells to verify the diploid number. Three markers were tested: SatDNA As51, probe B and microsatellite CA₍₁₅₎ for molecular cytogenetic analysis in metaphase preparations and oocyte nuclei. Flow cytometry was used to evaluate the amount of DNA in gonad tissue samples from females with a B chromosome. Double FISH with probes B and As51 were those that showed the best results in marking the B chromosome in oocyte nuclei and also in mitotic metaphases. Furthermore, the As51 marker helped in the identification of haploid and diploid nuclei, which were corroborated by flow cytometry. The results obtained in the present study present useful tools for determining the existence or not of a *drive* on the B chromosome. Some advances are still necessary to improve this innovative method, for example, in the differentiation of the polar bodies of mature oocytes and in the maintenance of oocytes by more time under analysis conditions.

Key words: meiosis, oocytes, methodology innovation, non-Mendelian inheritance, selfish genetic elements.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 – Exemplar de *P. scabripinnis* de Ribeirão Grande, Pindamonhangaba-São Paulo, Brasil. Comprimento padrão 10 cm 15
- FIGURA 2 – Drive meiótico do cromossomo B em gametas femininas..... 19
- FIGURA 3 - Modelo parasítico do ciclo dos cromossomos B.20
- FIGURA 4 - Crescimento, maturação e meiose nos ovócitos de teleósteos.25
- FIGURA 5 - Localização geográfica do ponto de amostragem.....36
- FIGURA 6 - Núcleos de ovócitos obtidos de fêmeas de *P. scabripinnis*. (a) Coloração com Giemsa, (b) coloração com DAPI. Escala: 10µm.38
- FIGURA 7 - Metáfases mitóticas de *P. scabripinnis* sometidas a FISH com sonda única: sonda B (B probe) e CA₍₁₅₎ marcadas com antidigoxigenina rodamina e contracorados com DAPI (azul). As marcações estão sinalizadas com uma seta amarela. Metáfases com cromossomo B (a, c) e sem cromossomo B (b, d). Escala: 10 µm.40
- FIGURA 8 – Metáfases e núcleos de ovócitos diploides obtidos de fêmeas de *P. scabripinnis* com a sonda As51 marcadas com antidigoxigenina rodamina (vermelho) e contracorados com DAPI (azul). As marcações estão sinalizadas com uma seta amarela. As amostras foram classificadas em quatro grupos distintos com base na presença ou ausência de cromossomo B e no número de sinais de As51. Os grupos incluem (a, b) configurações com cromossomo B e dois sinais, (c, d) com cromossomo B e um sinal, (e, f) sem cromossomo B e um sinal, e (g, h) sem cromossomo B e dois sinais. Escala: 10µm.41
- FIGURA 9 - Comparativa de núcleos de ovócitos de fêmeas de *P. scabripinnis* com (B+) e sem cromossomo B (B-) submetidas a FISH com as sondas As51 e sonda B (B probe), ambas marcadas com antidigoxigenina rodamina e contracorados com DAPI. Escala: 10 µm.42
- FIGURA 10 - Comparativa de metáfase e núcleos de ovócitos de fêmeas de *P. scabripinnis* com cromossomo B submetidas a dupla FISH com a sonda B (B probe) marcada com antidigoxigenina rodamina e As51 com estreptavidina Alexa flúor 488 e contracorados com DAPI. Os sinais estão indicados com setas amarelas. (a) metáfase com presença do cromossomo B; (b) ovócito diploide; (c) ovócito haploide. Escala: 10 µm.43

- FIGURA 11 – Gráfico de citometria de fluxo de ovário de *P. scabripinnis* no estágio imaturo de desenvolvimento gonadal.43
- FIGURA 12 - Proposta da determinação de drive meiótico do cromossomo B na meiose em fêmeas de *P. scabripinnis* com o uso da sonda B + SatDNA As51 (seta amarela) e As51 (seta verde). A ideia apresentada é para uma fêmea com dois sinais terminais em um par homólogo acrocêntrico (homozigota para essa característica). Se esquematiza os diferentes conteúdos de DNA dos ovócitos e corpúsculos polares (C), e o número de cromossomos (N) em diversas etapas da divisão celular reducional: Interfase (fase G1) (2C, 2N); Metáfase I (4C, 2N); Metáfase II (2C, 1N) e telófase II (1C, 1N). Para cada etapa se ilustra a presença dos cromossomos A e B, que são indicados pela cor das setas nos núcleos dos ovócitos.....48

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Número diploide e cromossomos B de espécies do gênero <i>Astyanax</i> e <i>Psalidodon</i> . Baseado na revisão de Pazza e Kavalco (2007).	16
---	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	14
1.1 FAMÍLIA CHARACIDAE.....	14
1.2 GÊNERO <i>Psalidodon</i> E <i>P. scabripinnis</i> (JENYNS, 1842).	14
1.3 CROMOSSOMOS B.....	16
1.4 DRIVE E FREQUÊNCIA DO CROMOSSOMO B	18
1.5 CROMOSSOMOS B EM <i>P. scabripinnis</i>	21
1.6 DNA REPETITIVO COM ÊNFASE NO GÊNERO <i>Psalidodon</i> e cromossomos B	21
1.7 INFLUÊNCIA DO CROMOSSOMO B NA RAZÃO SEXUAL E REPRODUÇÃO EM <i>P. scabripinnis</i>	23
1.8 MEIOSE E MATURAÇÃO DOS OVÓCITOS EM PEIXES.....	24
2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	27
2.1 OBJETIVO GERAL.....	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	28
3 MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 LOCAL DE COLETA E AMOSTRAS	29
3.2 ANÁLISE CITOGÊNÉTICA CONVENCIONAL	29
3.3 ISOLAMENTO DE NÚCLEOS DOS OVÓCITOS	30
3.4 PREPARAÇÃO DAS SONDAS	30
3.5 ANÁLISE CITOGÊNÉTICA MOLECULAR	31
3.6 CITOMETRIA DE FLUXO	31
4 RESULTADOS	32
4.1 AVALIAÇÃO CITOGENÔMICA DO CROMOSSOMO B EM <i>Psalidodon scabripinnis</i> (TELEOSTEI: CHARACIDAE): IMPLICAÇÕES PARA O DRIVE MEIÓTICO	32
REFERÊNCIAS	49
ANEXO A- AUTORIZAÇÃO DO INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE - ICMBIO (LICENÇA SISBIO 15115-1) ...	59
ANEXO B- AUTORIZAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL DA UEPG (PROCESSO CEUA: 0769342/2021).....	60

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 FAMÍLIA CHARACIDAE

Os exemplares dessa família fazem parte da ordem Characiformes (Baumgartner *et al.*, 2012), e são conhecidos comumente como lambaris, tetras, piracanjubas, piranhas, pacus, peixes-cachorro e dourados. A distribuição da família vai desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Patagonia na Argentina (Mirande, 2010, 2019), onde a maioria das espécies podem ser encontradas nas bacias dos rios Amazonas, Orinoco, e nos rios das Guianas (Van Der Sleen e Albert, 2017). A família contém aproximadamente 1.100 espécies, o que representa mais da metade das espécies conhecidas da ordem Characiformes (Oliveira *et al.*, 2011), sendo os mais diversos entre os peixes neotropicais (Mirande, 2010).

Devido a sua ampla diversidade morfológica e alta riqueza de espécies, as relações filogenéticas entre os gêneros ainda não estão resolvidas (Van Der Sleen e Albert, 2017), por isso, o pouco conhecimento que existe sobre a sua taxonomia e relações interespecíficas (Netto Ferreira *et al.*, 2013). Essa situação leva a denominação de muitos táxons da família Characidae como “*Incertae sedis*” ("de classificação incerta").

Em relação ao seu tamanho, muitos peixes da família são pequenos, e têm um comprimento menor que 8 cm (Mirande, 2019; Xu *et al.*, 2021), por outro lado as espécies predadoras podem chegar aos 20 cm (Mirande, 2019). O hábito alimentar comum na família é omnívoro, e seu habitat é variável e inclui lagos, savanas, grandes rios de planície, florestas inundadas, pequenos riachos florestais e de montanha de fluxo rápido (Van Der Sleen e Albert, 2017).

Dentro da família Characidae está a subfamília Stethaprioninae (Terán, Benitez e Mirande, 2020), com gêneros muito estudados entre os peixes. No Brasil ressalta-se o gênero *Astyanax* e *Psalidodon* por possuir características que são de interesse para as áreas da genética e evolução.

1.2 GÊNERO *Psalidodon* E *P. scabripinnis* (JENYNS, 1842).

A categorização taxonômica para *Psalidodon* foi feita por Eigenmann (1911), e posteriormente o gênero foi colocado como um sinônimo para o gênero *Astyanax* (Pavanelli e Oliveira, 2009). No entanto, *Psalidodon* foi novamente estabelecido como um gênero válido por Terán, Benitez e Mirande (2020) ao fazer um estudo amplo que incluiu caracteres morfológicos e moleculares. O estudo citado estabelece o gênero *Astyanax* como não

monofilético, ao contrário de *Psalidodon*, onde seu caráter monofilético é moderadamente suportado.

Dentro do gênero *Psalidodon*, destaca-se *P. scabripinnis*, que são teleósteos abundantes na América do Sul (Castro *et al.*, 2018), e no Brasil sua distribuição vai desde o estado do Espírito Santo até o Rio Grande do Sul (Moreira Filho, Galetti Jr e Bertollo, 2004). Considerado como um complexo de espécies tendo em conta dados morfológicos e cariotípicos (Moreira Filho e Bertollo, 1991) *P. scabripinnis* formam populações isoladas em cabeceiras de riachos (Limeira *et al.*, 2019). Um fato de importância é que essa espécie serve como modelo de estudos evolutivos e genéticos em peixes devido a presença de cromossomos B em algumas populações (Barbosa *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2022).

Com respeito a sua morfologia, em *P. scabripinnis* destaca-se seu corpo fusiforme de pequeno porte e, coloração castanha-clara e, alguns indivíduos com nadadeiras caudais e anais avermelhadas (Shibatta *et al.*, 2002), a altura de seu corpo varia entre 2,6 e 3,6 vezes o comprimento padrão, a sua nadadeira anal possui 25 ou menos raios, tem uma cabeça robusta e seu corpo também tem um padrão de robustez similar na altura das nadadeiras peitorais (Abilhoa, 2007). No aspecto alimentar, *P. scabripinnis* pode ser classificada como onívora, o qual inclui sementes, restos de insetos e peixes na sua dieta, e ao longo do ano sua plasticidade trófica pode variar (Oliveira *et al.*, 2023).

FIGURA 1 – Exemplar de *P. scabripinnis* de Ribeirão Grande, Pindamonhangaba-São Paulo, Brasil. Comprimento padrão 10 cm



Fonte: O autor

O complexo *P. scabripinnis* apresenta machos e fêmeas nas populações, no entanto, casos de hermafroditismo já foram encontrados (Castro *et al.*, 2018; Cornelio *et al.*, 2017), onde esse fenômeno foi atribuído a variáveis ambientais e não à presença do cromossomo B (Cornelio *et al.*, 2017).

Em *Astyanax* e *Psalidodon*, o número diploide varia entre 36 a 50 cromossomos (Pazza e Kavalco, 2007) (Tabela 1).

TABELA 1 – Número diploide e cromossomos B de espécies do gênero *Astyanax* e *Psalidodon*. Baseado na revisão de Pazza e Kavalco (2007).

Espécie	Número diploide	Cromossomos B
<i>Astyanax altiparanae</i>	50	-
<i>Psalidodon eigenmanniorum</i>	50	-
<i>Psalidodon fasciatus</i>	45 – 46 – 47 – 48	1 ^a
<i>Psalidodon paranae</i> ^b	50	1
<i>Astyanax lacustres</i>	50	-
<i>Astyanax mexicanus</i>	50	-
<i>Psalidodon parahybae</i>	48	-
<i>Psalidodon scabripinnis</i>	46 – 48 – 50	1 – 2
<i>Psalidodon schubarti</i>	36	1
<i>Psalidodon aff. fasciatus</i>	48 – 49 – 50	-

Notas: ^a Silva *et al.* (2016)

^b Silva *et al.* (2014)

Em geral, o cariótipo de *P. scabripinnis* apresenta $2n=50$ cromossomos, onde seis são metacêntricos, 22 submetacêntricos, 10 subtelocêntricos e 12 acrocêntricos, com número fundamental (NF) de 88, podendo apresentar 1 ou 2 cromossomos B em indivíduos em algumas populações (Castro *et al.*, 2018; Salvador e Moreira Filho, 1992). No entanto, podem ser encontradas populações com indivíduos com $2n=48$ cromossomos (Castro *et al.*, 2015), ou $2n=46$ cromossomos (Fernandes e Martins-Santos, 2005).

Segundo a literatura, não existe registros de cromossomos sexuais morfologicamente diferenciados em *Psalidodon* e *Astyanax* (Ashman *et al.*, 2014; Moreira Filho, Bertollo e Galetti Jr, 1993).

1.3 CROMOSSOMOS B

Os cromossomos B são elementos dispensáveis encontrados no genoma de uma ampla variedade de táxons (Cardoso *et al.*, 2022; Chen, Birchler e Houben, 2022; Jones, 2018; Lee *et al.*, 2023). Eles são um exemplo de cromossomos supranumerários ou acessórios que podem

ser encontrados em aproximadamente 3000 espécies que inclui 185 famílias de animais, 7 famílias de fungos e 119 famílias de plantas (D'ambrosio *et al.*, 2017). Inicialmente, os cromossomos B eram entendidos como sequências de DNA repetitivos, pobres em genes e mantidos por um mecanismo parasitário na divisão celular (Valente *et al.*, 2017).

A transmissão dos cromossomos B de célula a célula nas divisões mitóticas na maioria das espécies ocorre de forma típica durante o crescimento e desenvolvimento, ou seja, todas as células de um mesmo indivíduo possuem o mesmo número de cromossomos B (Banaei-Moghaddam *et al.*, 2012; Houben *et al.*, 2014), no entanto, existem exceções onde os cromossomos B são eliminados (Ruban *et al.*, 2020). Uma peculiaridade dos cromossomos B reside no fato de que não estão necessariamente dispostos em pares nas células dos indivíduos portadores, destacando-se, ademais, a presença de diversas variantes desses cromossomos dentro de uma mesma espécie (Rajpal *et al.*, 2023). Neste cenário, os cromossomos B apresentam um comportamento irregular na meiose, que inclui o não emparelhamento com os cromossomos padrão (As), além de ter mecanismos de acumulação incluindo não disjunção e impulso meiótico, fenômeno também conhecido como “drive” (Jones, 1991, 2018).

Os cromossomos B representam um exemplo extraordinário de DNA extra (Houben *et al.*, 2014), e pelo alto conteúdo de elementos repetitivos como os DNA satélite (SatDNA), DNA ribossomal (rDNA) e de elementos moveis do DNA (mobDNA) (CAMACHO, 2005), fazendo que os cromossomos B sejam de natureza heterocromática (Camacho, 2005; Jones, 1991, 2018), e detectáveis por técnicas de citogenética convencional como o bandamento C (Gonen *et al.*, 2022; Sumner, 1972), ou por citogenética molecular com o emprego de sondas específicas do cromossomo B (Banaei-Moghaddam *et al.*, 2012; Mestriner *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2017; Vicari *et al.*, 2011). Contudo, existem exemplos de cromossomos B eucromáticos, por exemplo no gafanhoto *Abracris flavolineata* (Milani *et al.*, 2021) e nos peixes *Moenkhausia oligolepis* (Santos *et al.*, 2021) e *Astyanax mexicanus* (Imarazene *et al.*, 2021).

Nos últimos anos, os estudos do cromossomo B estão direcionados à procura de elementos repetitivos como os satélites (Camacho *et al.*, 2021; Silva *et al.*, 2017), transposons (Blavet *et al.*, 2021), RNA de interação como PIWI (piRNA) (Oliveira *et al.*, 2022), e principalmente na expressão de genes (Blavet *et al.*, 2021; Cardoso *et al.*, 2022; Dalla *et al.*, 2020; Navarro-Domínguez *et al.*, 2019; Shi *et al.*, 2022; Silva e Ruiz-Ruano, *et al.*, 2021). Em relação a expressão gênica, os cromossomos B não podem ser mais considerados “geneticamente inertes” (Ruban *et al.*, 2017), porque essas sequências gênicas transcricionalmente ativas possuem possíveis funções (Ruban *et al.*, 2017; Valente *et al.*, 2017), com capacidade de modular a atividade de genes autossômicos do conjunto A (cariótipo padrão)

(Boudichevskaia *et al.*, 2022; Shi *et al.*, 2022; Valente *et al.*, 2017). As tecnologias de sequenciamento de última geração (NGS) para o sequenciamento do DNA e RNA contribuíram significativamente para o conhecimento desses aspectos nos cromossomos B (Ruban *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2022).

Outro aspecto que é muito explorado em relação aos cromossomos B na atualidade, em parte graças aos avanços nos estudos de NGS, diz respeito ao fenômeno de “*Drive*”. Esse comportamento do cromossomo B tem sido estudado nos últimos anos em plantas como o milho (*Zea mays*) (Blavet *et al.*, 2021; Brennan *et al.*, 2023), *Festuca pratensis* (Ebrahimzadegan *et al.*, 2023), *Aegilops speltoides* (Wu *et al.*, 2019), e animais como *Drosophila melanogaster* (Hanlon e Hawley, 2023), e peixes como *Astatotilapia latifasciata* (Cardoso *et al.*, 2022) e *Astyanax mexicanus* (Imarazene *et al.*, 2021).

Apesar dos avanços sobre diferentes aspectos biológicos dos cromossomos B, ainda é essencial a realização de mais estudos para compreender os aspectos comportamentais mecanicistas relacionados à sua presença distintiva, transmissão e manutenção nas populações (Rajpal *et al.*, 2023).

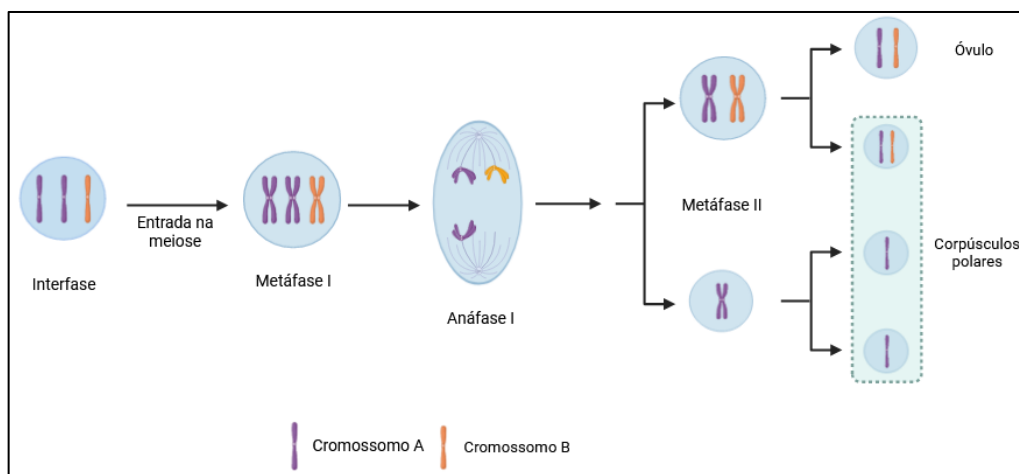
1.4 DRIVE E FREQUÊNCIA DO CROMOSSOMO B

Se conhece como impulso genético ou “*drive*” a aquele fenômeno onde um elemento genômico não segue a lei de segregação de Mendel e a sua taxa de transmissão é superior a 0,5 (Chen, Birchler e Houben, 2022; Houben, 2017; Rajpal *et al.*, 2023; Silva *et al.*, 2022). Os elementos do genoma que seguem esse comportamento são conhecidos como elementos genéticos egoístas (Camacho, 2022; Lindholm *et al.*, 2016) como, por exemplo, os cromossomos B, porque faz com que sua frequência aumente em uma população ao longo das gerações (Wedell, Price e Lindholm, 2019). Pelo conceito, o *drive* pode ter um forte impacto evolutivo uma vez que afeta aspectos como a gametogênese, a fertilidade, o comportamento individual, o sistema de acasalamento, a sobrevivência da população e o isolamento reprodutivo (Lindholm *et al.*, 2016). Cabe ressaltar que nem todos os organismos que possuem cromossomo B tem a capacidade de ter *drive* (Houben, 2017).

De acordo com o tipo de divisão celular onde ocorre, existem três tipos de *drive*: aquele que sucede na meiose (*drive* meiótico) (Fig. 2), antes da meiose nas divisões mitóticas (*drive* pré-meiótico) e nas divisões mitóticas posteriores a meiose (*drive* pós-meiótico) (Camacho, 2022; Chen, Birchler e Houben, 2022; Houben, 2017; Rajpal *et al.*, 2023). A produção de gametas femininos em algumas plantas e vertebrados é um evento ideal para a ocorrência de

drive meiótico, devido a assimetria da divisão celular e porque somente uma célula filha das quatro resultantes da meiose (o óvulo) contribuem geneticamente para a próxima geração (Chen, Birchler e Houben, 2022) (Fig. 2). O *drive* pós-meiótico acontece principalmente em plantas durante o desenvolvimento do pólen (Camacho, 2022; Chen, Birchler e Houben, 2022). A segregação preferencial (*drive*) durante a meiose é responsável pela presença de certos tipos de cromossomos em alguns cariótipos de mamíferos, aves, insetos e peixes, o que contribui para a evolução desses organismos (Molina *et al.*, 2014).

FIGURA 2 – Drive meiótico do cromossomo B em gametas femininas



Fonte: O autor

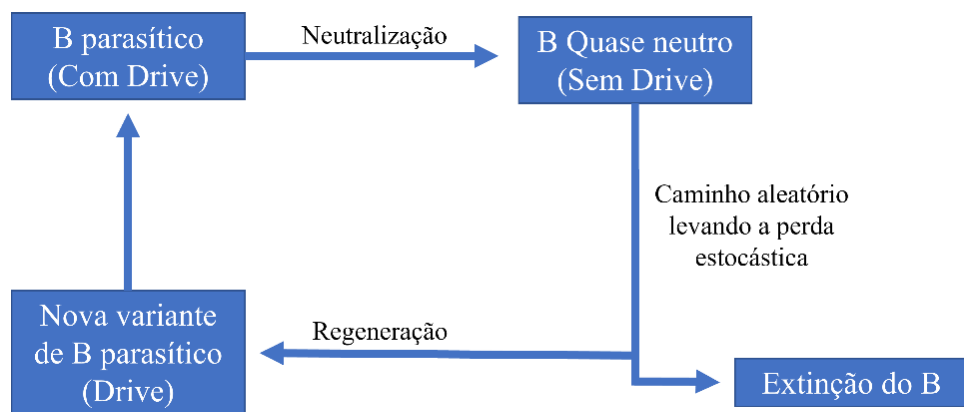
Notas: Figura feita na plataforma Biorender (<https://www.biorender.com>)

O fenômeno do *drive* pode ser estudado de diversas formas usando diversas técnicas de citogenética convencional e molecular, cruzamentos entre indivíduos que possuem ou não o cromossomo B, análises de células em divisão celular, emprego de sondas em hibridação fluorescente *in situ* (FISH), tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS) para a detecção de genes ou proteínas que favorecem o *drive*, ou também o emprego simultâneo de várias delas. Por exemplo, em *Astatotilapia latifasciata*, o *drive* foi analisado ao fazer combinações de cruzamentos entre fêmeas e machos com B e sem B, e verificando posteriormente o número de descendentes que tinham ou não a presença desse cromossomo com a ajuda de marcadores moleculares específicos (Cardoso *et al.*, 2022); esse trabalho evidenciou a não ocorrência de *drive* nesse organismo. O trabalho feito por Oliveira *et al.* (1997) usando a mesma estratégia anterior, também confirmou a ausência de *drive* para cromossomos B em *Prochilodus lineatus*. Outra estratégia empregada para avaliar o *drive* é usando uma combinação de técnicas como a citometria de fluxo, imunocoloração e FISH; desta forma Wu

et al. (2019) verificaram que núcleos vegetativos e espermáticos de pólen de *Aegilops speltoides* com e sem cromossomo B podem ser diferenciados, o que ajudou a uma melhor compreensão do mecanismo celular do *drive* do cromossomo B nesta espécie de gramínea.

O equilíbrio da frequência dos cromossomos B nas populações depende da vantagem adaptativa que eles oferecem aos hospedeiros, os efeitos adversos na reprodução e a capacidade de *drive* (Feldman e Levy, 2023; Houben, 2017; Rajpal *et al.*, 2023). Com respeito à evolução da frequência dos cromossomos B ao longo do tempo nas populações, Camacho, Sharbel e Beukeboom (2000) estabeleceram uma teoria parasítica para o cromossomo B (Fig. 3). O modelo explica que o ciclo de vida desses cromossomos inicia com a capacidade deles de ter *drive* e ser prejudiciais aos organismos que os possuem. Posteriormente, o cromossomo B sofre uma neutralização onde é suprimido o *drive* pela ação de genes nos cromossomos A, que ao mesmo tempo diminuem o seu efeito nocivo, tornando os organismos mais toleráveis a eles. Esta condição leva os cromossomos B a uma não fixação na população (pela meiose irregular), fazendo que diminua a frequência dele na população, o que pode levar a sua extinção total; no entanto, pode acontecer que durante essa rota o cromossomo B sofra mutações tornando-o em uma nova variante que tenha capacidade de *drive*, e assim o ciclo inicia de novo (Fig. 3).

FIGURA 3 - Modelo parasítico do ciclo dos cromossomos B.



Fonte: Adaptado de Camacho, Sharbel e Beukeboom (2000).

Devido ao uso do termo “*drive* meiótico” para se referir a qualquer tipo de *drive*, Camacho (2022) sugere o termo “distorção da taxa de transmissão” (TRD por suas siglas em inglês) para todos esses fenômenos, incluindo aquele onde acontece o contrário do *drive* (*lag*) onde um elemento genômico não tem segregação preferencial durante as divisões celulares.

1.5 CROMOSSOMOS B EM *P. scabripinnis*

Este complexo de espécies apresenta o maior número de cromossomos B estudados dentro do gênero *Psalidodon*, e possui desde macro a microcromossomos B (Silva *et al.*, 2022), e podem variar entre as diferentes populações (Vicari *et al.*, 2011). Porém, um cromossomo B metacêntrico grande (BM) é o mais frequente em *P. scabripinnis* e em outras populações do gênero *Psalidodon* (Silva *et al.*, 2022).

Em termos gerais, os cromossomos B se originam a partir dos cromossomos do complemento A (Camacho, Sharbel e Beukeboom, 2000; Houben *et al.*, 2014; Johnson e Reifová, 2021). Em *P. scabripinnis* (por vezes nomeado *Astyanax scabripinnis* em trabalhos anteriores a revisão de Terán, Benitez e Mirande (2020)), estudos sugerem que o cromossomo B é um isocromossomo do par 24, devido ao padrão de banda C similar que apresentam (Vicente, Moreira Filho e Camacho, 1996). Essa hipótese é reforçada com o estudo de Mestriner *et al.* (2000) pela análise do complexo sinaptonêmico (SC), onde encontraram que o cromossomo B estabelece um univalente em forma de anel que persiste até a metáfase I na meiose. O mesmo padrão também pode ser encontrado em *P. paranae*, o que sugere que esse comportamento do cromossomo B no gênero *Psalidodon* permite uma meiose regular e indivíduos férteis e, por tanto, a manutenção do cromossomo B ao longo das gerações (Silva e Araya-Jaime, *et al.*, 2021).

No estudo de Silva *et al.* (2022), uma revisão completa em relação aos cromossomos B em *P. scabripinnis*, os autores propõem uma hipótese sobre o modelo de especiação tendo em consideração a contribuição do cromossomo B no “paquíteno *checkpoint*” durante a meiose. Os autores descrevem dois cenários: no cenário 1 onde não há presença do cromossomo B, o paquíteno *checkpoint* faz um bloqueio e impede a perpetuação de cromossomos rearranjados, devido a seus mecanismos de controle. No entanto, no cenário 2 a presença do cromossomo B permite a fixação na população daqueles cromossomos rearranjados devido a que esses indivíduos com cromossomo B tem sobre expressão do gene *msh4*, que confere a habilidade a aqueles cromossomos de manipular o paquíteno checkpoint e assim eles podem se perpetuar em uma população Silva *et al.* (2022).

1.6 DNA REPETITIVO COM ÊNFASE NO GÊNERO *Psalidodon* e cromossomos B

O DNA repetitivo corresponde a padrões de sequências de nucleotídeos que se repetem centenas ou milhares de vezes no genoma (Biscotti, Olmo e Heslop-Harrison, 2015). Esses elementos estão presentes desde bactérias até mamíferos (Treangen e Salzberg, 2012), e podem

representar mais da metade do DNA nuclear em muitas espécies e não está totalmente compreendido sua função no genoma (Biscotti, Olmo e Heslop-Harrison, 2015). Nos eucariotos, os DNAs repetitivos podem ser classificados em dois grandes grupos: sequências em tandem e sequências dispersas, onde no primeiro grupo encontra-se, por exemplo, os satélites, microssatélites e minissatélites, e no segundo grupo estão os transposons, retrotransposons, retrogenes, entre outros (López-Flores e Garrido-Ramos, 2012). Ressalta-se que o DNA repetitivo constitui uma grande parte das regiões centroméricas e heterocromáticas (Novák, Neumann e Macas, 2020).

O termo “satelitoma”, usado pela primeira vez por Ruiz-Ruano *et al.* (2016) faz referência a todo o conjunto de DNA satélite encontrado no genoma (SatDNA). O primeiro satélite descrito para o gênero *Psalidodon* foi o As51 no estudo de Mestriner *et al.* (2000) em *P. scabripinnis* mediante o uso da enzima de restrição KpnI, onde esse satélite também foi achado, além nos cromossomos padrão, distribuído simetricamente em ambos braços do cromossomo B desta espécie. Anos depois, com o uso das novas tecnologias do sequenciamento de nova geração (NGS), foram descobertas mais famílias de satélites no gênero *Psalidodon* como, por exemplo, 45 em *P. paranae* com um deles somente presente no cromossomo B (ApaSat44-21) (Silva *et al.*, 2017). Além disso, foram encontrados no mesmo gênero 57 em *P. fasciatus* e 50 em *P. bockmanni* (Goes *et al.*, 2022). Portanto, o SatDNA também podem ser encontrados nos cromossomos B, e está comumente distribuído em posições pericentroméricas, subteloéricas e intersticiais (Rajpal *et al.*, 2023).

O DNA repetitivo mais abundante nos cromossomos B de muitas espécies é o SatDNA, onde vários desses satélites aparentemente são específicos e somente localizados nos cromossomos B, e outros satélites podem estar presentes nos cromossomos A e nos cromossomos B ao mesmo tempo (Camacho *et al.*, 2021). Esse acúmulo de SatDNA, além de outros tipos de DNA repetitivo, é favorecido pelo fato de que os cromossomos B não se recombinam com os cromossomos A durante a meiose, é também porque esses cromossomos supranumerários sofrem baixa pressão seletiva devido a sua natureza dispensável (Houben *et al.*, 2014; Marques, Klemme e Houben, 2018). O estudo do SatDNA nos cromossomos B conseguiram ajudar na compreensão sobre sua origem e evolução em diversas espécies (Garrido-Ramos, 2017).

No caso dos microssatélites, que também são chamados de “sequências simples repetitivas (SSR's)”, são cadeias de DNA curtas de um até seis nucleotídeos (Avvaru *et al.*, 2019; Gao *et al.*, 2013). Os microssatélites apresentam trechos de DNA com um alto grau de variação no genoma (Gao *et al.*, 2013), são codominantes, apresentam herança mendeliana, têm

um alto grau de polimorfismo e, por esses fatos, são usados no campo da genética de populações, biologia da conservação e biologia evolutiva (Abdul-Muneer, 2014).

No estudo de Piscor e Parise-Maltempo (2016b) foram testados diferentes microssatélites em espécies do gênero *Psalidodon* e *Astyanax*. Os microssatélites (CA)₁₅, (GA)₁₅, (CG)₁₅ e (GACA)₄ estavam dispersos nos cromossomos em *P. fasciatus*, *P. marionae* e *P. schubarti*, mas também (CA)₁₅ foi achado como aglomerados em *P. fasciatus* e, nas últimas duas espécies, (CA)₁₅ e (GA)₁₅ foram observados com o mesmo padrão e coincidentes com regiões heterocromáticas dos cromossomos. Os autores também testaram o microssatélite (GATA)₈, onde o encontraram colocalizado com o rDNA 5S, e nos cromossomos B, enquanto os microssatélites (CA)₁₅, (GA)₁₅ e (GACA)₄ apresentaram diversos padrões de sinais onde o (GA)₁₅ foi aquele com sinais mais fortes.

Microssatélites, junto com o DNA mitocondrial, também foram usados em *P. scabripinnis* para medir a sua diversidade genética na região da Serra da Mantiqueira (Limeira *et al.*, 2022). Além disso, já foram encontradas no cromossomo B desses peixes regiões heterogêneas dos microssatélites CA, CAC e GA, e também sinais dispersos deles em outros cromossomos do complemento A, onde a localização do microssatélite CA pode ser encontrada preferencialmente em regiões teloméricas (Barbosa *et al.*, 2017). Em *P. paranae* também foi testado o microssatélite CA, e a localização dos sinais no cromossomo B foi verificada também nas regiões teloméricas (Silva e Araya-Jaime, *et al.*, 2021).

1.7 INFLUÊNCIA DO CROMOSSOMO B NA RAZÃO SEXUAL E REPRODUÇÃO EM *P. scabripinnis*

Se assume que há uma quase paridade entre a proporção de fêmeas e machos em organismos onde se produz os dois tipos de gametas (Schacht *et al.*, 2022). Com relação a esse aspecto, em *P. scabripinnis* estudos mostraram que populações dessa espécie apresentam distorção da razão sexual, onde a tendência é que as fêmeas tenham uma maior proporção (Abilhoa, 2007; Cornelio *et al.*, 2017; Vicente, Moreira Filho e Camacho, 1996), sugerindo que a presença do cromossomo B em *P. scabripinnis* pode influir na distorção da proporção sexual (Vicente, Moreira Filho e Camacho, 1996), como acontece no caso de diversos peixes da África onde a presença do cromossomo B está associada ao sexo feminino (Yoshida *et al.*, 2011).

Enquanto as épocas de reprodução, Cornelio *et al.* (2017) verificou que *Psalidodon scabripinnis* tem atividade reprodutiva ao longo do ano, com um pico entre os meses de julho e dezembro, destacando-se que as fêmeas com cromossomo B tem maior atividade reprodutiva

durante o verão. Já Abilhoa (2007) encontrou um pico de reprodução entre os meses de outubro e março, que coincidia com a época de maiores chuvas, e Pereira Filho *et al.* (2011) em um estudo em condições de cativeiro acharam que o período reprodutivo ocorreu durante todo o ano. Em vista destas evidências, sugere-se que *P. scabripinnis* apresenta desova parcelada (Melo *et al.*, 2005; Pereira Filho *et al.*, 2011), onde as gônadas femininas podem exibir ovócitos em diferentes estágios de desenvolvimento ao mesmo tempo (Cornelio *et al.*, 2017).

Em adição, os cromossomos B tem um papel fundamental no período reprodutivo de *P. scabripinnis* (Castro *et al.*, 2018; Castro *et al.*, 2019). A sobreexpressão do gene *dmrt1* em machos com cromossomos B faz que se estenda seu período de reprodução de julho até fevereiro (Castro *et al.*, 2018). No caso das fêmeas, a subexpressão de *foxl2a*, em animais com cromossomo B provoca um desenvolvimento tardio dos ovários fazendo que elas tenham um período reprodutivo curto entre dezembro e fevereiro (Castro *et al.*, 2019). Esses fatos permitiriam que coincidam os períodos reprodutivos de indivíduos com cromossomo B, o que assegura a sua manutenção na população, além do que o próprio ciclo reprodutivo da espécie é ampliado e garante mais descendentes (Castro *et al.*, 2018; Castro *et al.*, 2019).

1.8 MEIOSE E MATURAÇÃO DOS OVÓCITOS EM PEIXES

A meiose é um tipo de divisão celular fundamental para a fertilidade dos eucariotos que têm reprodução sexuada, porque permite a redução do número de cromossomos na produção de gametas ou esporos haploides (Bomblies, Higgins e Yant, 2015), além de reorganizar a informação genética ao longo das gerações (Mercier *et al.*, 2015). A meiose compartilha mecanismos e regulação com a mitose, no entanto entre eles há diferenças como, por exemplo, na regulação do ciclo celular, recombinação, segregação cromossômica entre outros (Ohkura, 2015).

Duas divisões celulares sucessivas acontecem durante a meiose (meiose I e II), onde em cada uma se produz cinco fases principais na seguinte ordem: prófase, metáfase, anáfase e telófase. A prófase I tem uma grande importância porque ali ocorre a reorganização do genoma (Grey e De Massy, 2021). Na meiose, a prófase I pode ser dividida em leptóteno, zigóteno, paquíteno, diplóteno e diacinese (Subramanian e Hochwagen, 2014).

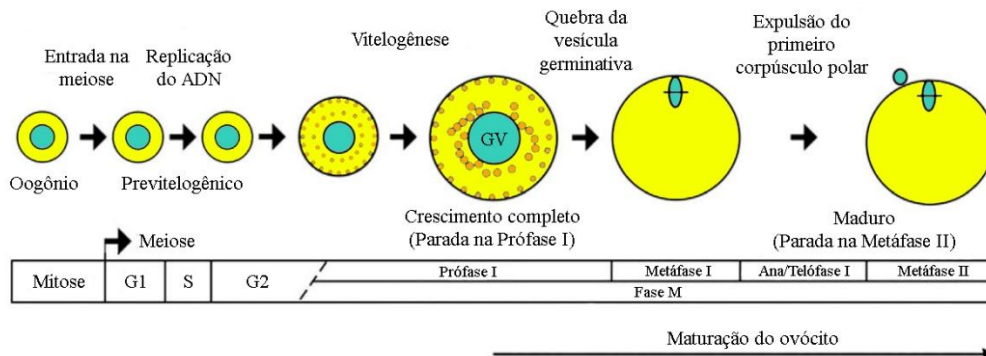
Durante a prófase I de muitos eucariotos acontece a sinapse ou pareamento dos cromossomos homólogos com o estabelecimento de uma estrutura proteica chamada complexo sinaptonêmico, e recombinação meiótica, ou seja, a quebra da cadeia dupla do DNA que leva à formação de trocas entre homólogos (Zhang *et al.*, 2014). Quando não acontece a sinapse entre os cromossomos homólogos ou sucede com erros, o ponto de verificação do paquíteno detecta

essas células, o que leva geralmente a destruição dessas células produtoras de gametas (Foe, 2022). Este fenômeno é chamado de “paquíteno *checkpoint*”, e pode contribuir para a formação de novas espécies em simpatria devido a presença de elementos genéticos, como os cromossomos B, que facilitam a manipulação desse controle na prófase e facilita a fixação na população de rearranjos cromossômicos (Foe, 2022; Silva *et al.*, 2022).

A formação de gametas é chamada gametogênese, e nos peixes teleósteos o processo é similar aos demais vertebrados, com algumas exceções (Godinho, 2007). Para a formação dos gametas femininos nos ovários é necessário a diferenciação das células germinativas primordiais em oogônios (Lubzens *et al.*, 2010), onde eles proliferam mediante divisões mitóticas antes de entrar em meiose (Lubzens *et al.*, 2010; Suwa e Yamashita, 2007). Para a produção de ovócitos, no caso dos vertebrados, incluindo os peixes, ocorrem duas paradas na meiose: na prófase I e metáfase II (Fig. 4), onde a primeira parada serve para preparar a célula para a produção de substâncias como vitelo (vitelogênese) e mRNA, que são necessários para o desenvolvimento embrionário (Suwa e Yamashita, 2007). O acúmulo de RNA (que é chamado de RNA materno) é usado pelo ovócito para a produção dos envelopes celulares e não celulares (Lubzens *et al.*, 2010). O vitelo é usado pelo peixe na etapa de embrião como fonte de alimento e também no início da etapa larval (Godinho, 2007).

Quando finaliza a produção de vitelo, o ovócito está totalmente desenvolvido e, dependendo das condições ambientais e hormonais, ele entra na etapa de maturação (Godinho, 2007). Durante o processo de maturação dos ovócitos ocorre a condensação cromossômica, a quebra da vesícula germinativa e a expulsão do primeiro corpúsculo polar, além disso, o núcleo do ovócito, que é chamado também de vesícula germinativa (GV por suas siglas em inglês), movimenta-se do centro do ovócito até o polo animal por estimulação hormonal (Suwa e Yamashita, 2007) (Fig. 4).

FIGURA 4 - Crescimento, maturação e meiose nos ovócitos de teleósteos.



Fonte: Adaptado de Suwa e Yamashita (2007).

O processo da meiose segue até a metáfase II onde a divisão celular é novamente interrompida, e aqui termina a etapa de maturação com a formação do ovócito secundário (Lubzens *et al.*, 2010; Suwa e Yamashita, 2007) e a subsequente ovulação (Godinho, 2007; Lubzens *et al.*, 2010). O ovócito secundário é chamado de óvulo nesta fase, e termina sua divisão meiótica quando faz a expulsão do segundo corpúsculo polar para assim torna-se haploide, e depois se fundir com o núcleo haploide do espermatozoide durante a fertilização e formar um ovo diploide (Lubzens *et al.*, 2010).

Conforme avança a meiose, as gônadas femininas mudam sua morfologia e aparência e, por isso, é possível falar de etapas de desenvolvimento gonadal. As etapas vão desde um estágio imaturo até abundante presença de vitelo nos ovócitos (Carvalho *et al.*, 2009; Elkouby e Mullins, 2017).

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Psalidodon scabripinnis, considerado um complexo de espécies, são teleósteos abundantes no Brasil, e formam populações isoladas em cabeceiras de riachos. Esses peixes são tidos como um modelo para estudos evolutivos e genéticos devido a presença de cromossomos B no genoma.

Os cromossomos B são elementos genéticos dispensáveis e adicionais ao complemento padrão (cromossomos A) no genoma de uma ampla variedade de organismos. Como eles são, geralmente, ricos em heterocromatina e sequências de DNA repetitivo, há alguns anos esses elementos eram considerados “geneticamente inertes”. No entanto, estudos recentes demonstraram que esses cromossomos são capazes de interferir em algumas funções nos organismos que carregam esses elementos, por tanto, influenciar nos mecanismos de sobrevivência e na história evolutiva dos mesmos.

Há estudos que descrevem casos onde os cromossomos B de diversos organismos são capazes de aumentar sua frequência de transmissão ao longo das gerações, ao interferir nos mecanismos de segregação durante a meiose, processo conhecido como impulso genético ou “*drive*”. Deste modo, há necessidade de realizar estudos transgeracionais para conhecer com mais detalhes os mecanismos de transmissibilidade dos cromossomos B, e que as evidências sejam interpretadas em relação ao modelo proposto por Camacho, Sharbel e Beukeboom (2000) (Fig. 3).

Na literatura estão descritos diversos aspectos concernentes ao cromossomo B em *P. scabripinnis* como a frequência deles no genoma, expressão de genes, origem e evolução, diversidade morfológica, comportamento na meiose, distorção da frequência na ocorrência dele entre os sexos, entre outros. No entanto, não há conhecimento se o cromossomo B possui a capacidade de ter segregação preferencial.

Diante disto, se estabeleceram os seguintes objetivos:

2.1 OBJETIVO GERAL

- Estabelecer ferramentas para a determinação do *drive* meiótico do cromossomo B em fêmeas de *P. scabripinnis* de uma população do sudeste do Brasil.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Criar um protocolo para a obtenção de núcleos de ovócitos de *P. scabripinnis* no estágio III de desenvolvimento gonadal.
- Identificar um marcador exclusivo para cromossomo B para procedimentos de citogenética molecular em *P. scabripinnis*.
- Comparar as marcações de sondas dos núcleos de ovócitos de fêmeas com e sem cromossomo B em *P. scabripinnis*.
- Determinar a ploidia de núcleos de ovócitos de fêmeas com e sem cromossomo B em *P. scabripinnis*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAL DE COLETA E AMOSTRAS

Os exemplares de *P. scabripinnis* foram coletados do Ribeirão Grande, bacia do Rio Paraíba do Sul (22°43'22,744" S e 45°27'06,638" W; altitude: 1870 m), município de Pindamonhangaba no Estado de São Paulo. Os espécimes foram coletados nos meses de maio e setembro de 2022, e foram usadas diversas técnicas tais como pesca elétrica, malha de arrasto, puçás, redes de arrasto e armadilhas. Os peixes foram armazenados em sacolas com oxigênio sob pressão e levados até o Laboratório de Citogenética e Evolução da Universidade Estadual de Ponta Grossa para a posterior condução dos ensaios.

Os animais foram coletados e transportados com autorização do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio (Licença SISBIO 15115-1) (Anexo A). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com boas práticas de experimentação animal, com autorização da Comissão de Ética em Pesquisa Animal da UEPG (Processo CEUA: 0769342/2021) (Anexo B). O acesso ao genoma da espécie está de acordo com o número de cadastro SISGEN A6F96AE.

3.2 ANÁLISE CITOGENÉTICA CONVENCIONAL

Para a obtenção de cromossomos mitóticos foi implementada uma metodologia baseada no trabalho de Bertollo, Cioffi e Moreira-Filho (2015). Os animais foram eutanasiados e posteriormente retirou-se os rins posteriores e colocados em cubas de vidro com 10 ml de KCl 0,075M com 5 gotas de colchicina ao 0,025%, onde o tecido foi fragmentado com ajuda de seringas hipodérmicas até obter uma suspensão celular homogênea que foi incubada por 40 min a 37°C. Após, foram colocadas 10 gotas de solução Carnoy (Metanol: Ácido acético 3:1), a suspensão foi centrifugada a 900 rpm por 10 min e foi descartado o sobrenadante. Logo, foram adicionados 7 ml de solução Carnoy e centrifugado a 900 rpm por 10 min e descartado o sobrenadante; esse procedimento foi feito duas vezes. Após a última centrifugação, foram adicionados 1,5 ml de solução Carnoy e a suspensão celular foi colocada em tubos tipo Eppendorf e armazenada no freezer a -20°C. Finalmente, para visualização das metáfases, foram gotejadas 50 µl da suspensão em lâminas aquecidas a 37°C e coradas com solução Giemsa 5% diluída em tampão fosfato pH 6,8 (KH₂PO₄ + Na₂PO₄) por 10 minutos, secas ao ar e visualizadas ao microscópio.

3.3 ISOLAMENTO DE NÚCLEOS DOS OVÓCITOS

Para este procedimento foram considerados os ovários no estágio III de desenvolvimento, onde era visível a presença de ovócitos maduros (Carvalho *et al.*, 2009). Os ovários íntegros foram retirados com microtesouras e pinças, e colocados em placas de Petri plásticas contendo 1 ml de solução tampão (MgCl₂.7H₂O 9,53 mM; KCl 47,67 mM; Tris 15 mM; Sacarose 74 mM; Triton X-100 0,6%) (Xavier *et al.*, 2017) e foram retirados tecidos diferentes das gônadas e outras impurezas. Após, os preparados foram colocados em tubos de 2 ml com beads de zircônio e submetidos ao disruptor de células por 165 s a 280 rpm, e a suspensão resultante foi filtrada em peneiras de nylon de 50 e 30 µm. O filtrado foi misturado com solução Carnoy e armazenado no freezer a -20°C. Para a avaliação do isolamento, foram gotejadas 50 µl da suspensão em lâminas aquecidas a 37°C e coradas com solução de Giemsa 2% em tampão fosfato pH 6,8 (KH₂PO₄ + Na₂PO₄) por 15 minutos, secas ao ar e visualizadas ao microscópio.

3.4 PREPARAÇÃO DAS SONDAS

Para a obtenção de sondas do satélite As51 (Mestriner *et al.*, 2000) foi usado DNA clonado e amplificado a partir do plasmídeo pGEM®T (Promega), usando os primers sp6 5'-ATTTAGGTGACACTATAG-3' e T7 5'-TAATACGACTCACTATAGGG. O mix de reação consistiu em um volume total de 50 µl contendo 1× buffer PCR, 1,25 mM MgCl₂, 600 µM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 0,2 µM de cada primer, 100 ng de DNA molde e 1 U de Taq polimerase. As condições de corrida foram 5 min de desnaturação inicial 94°C; seguidas de 35 ciclos de 1 min a 94°C, 45 s a 51°C, 2 min e 20 s a 72°C; e extensão final de 5 min a 72°C. Posteriormente, a sonda As51 obtida foi marcada em PCR com digoxigenina 11-dUTP (Roche Applied Science).

Além disso, foi empregada uma sonda específica obtida a partir de cromossomos B microdissectados (sonda B) de acordo com Vicari *et al.* (2011) que foi marcada usando a técnica de DOP-PCR com digoxigenina 11-dUTP (Roche Applied Science). No caso do microssatélite CA₍₁₅₎ foi usada uma sonda comercial Sigma marcada com Cy5 durante a síntese (Kubat *et al.*, 2008).

3.5 ANÁLISE CITOGENÉTICA MOLECULAR

A Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH) foi feita em cromossomos mitóticos e núcleos isolados dos ovócitos seguindo os procedimentos gerais usados por Pinkel, Straume e Gray (1986) e Yano, Bertollo e Cioffi (2017), com modificações (Anexo C). Para as FISH de uma sonda foram empregados por separado as sondas As51, sonda B e CA₍₁₅₎. Para a hibridação da sonda do satélite As51, foi usado o mix de hibridação contendo 150 ng/lâmina, 50% formamida, 2× SSC, 10% sulfato de dextrano, 5 mM buffer fosfato; no caso da sonda B, a concentração foi de 1000 ng/lâmina e da sonda do microssatélite CA₍₁₅₎ 100 ng/lâmina. Para a dupla FISH foram empregadas o satélite As51 e a sonda B usando 150 e 800 ng/lâmina respectivamente. Posteriormente, as lâminas foram incubadas em câmara úmida e escura a 37°C *overnight*.

Finalizado o tempo de hibridação, foram feitas lavagens de alta estringência com formamida 50% em 2×SSC, 2×SSC e 4×SSC/0,05% Tween durante 25 min cada a 42°C. As sondas foram detectadas usando o anticorpo Antidigoxigenina-Rodamina (Roche) e Estreptavidina-Alexa flúor 488; os cromossomos e núcleos foram contracolorados com 4',6'-diamino-2-fenil-indol (DAPI) (1,5 µg/mL) diluído em solução *Antifade* (VECTASHIELD®). As lâminas foram analisadas em microscópio de epifluorescência Olympus BX41 acoplado ao sistema de captura de imagens DP 71 (Olympus). Finalmente as imagens foram processadas no programa Adobe Photoshop® CS6 versão 13.0.

3.6 CITOMETRIA DE FLUXO

As amostras de gônadas de fêmeas de *P. scabripinnis* do procedimento de obtenção de núcleos de ovócitos preservados em solução Carnoy foram lavadas 3 vezes com solução PBS 1×, centrifugadas a 2000 rpm durante 5 min cada e retirado o sobrenadante. Posteriormente, foi adicionado solução corante com DAPI CyStain® UV Ploidy e submetidas a leitura no citômetro de fluxo Ploid Analyser SYSMEX.

4 RESULTADOS

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

4.1 AVALIAÇÃO CITOGENÔMICA DO CROMOSSOMO B EM *Psalidodon scabripinnis* (TELEOSTEI: CHARACIDAE): IMPLICAÇÕES PARA O DRIVE MEIÓTICO

RESUMO

Os cromossomos B são elementos supranumerários no genoma que ocorrem em uma ampla variedade de organismos eucariotos. Peixes do complexo *Psalidodon scabripinnis* possuem cromossomos B, no entanto, não se conhece se esse cromossomo possui a capacidade de *drive*. Por tanto, o objetivo deste estudo foi estabelecer ferramentas para a determinação do drive meiótico do cromossomo B em fêmeas de *P. scabripinnis*. Para isso, foram analisadas 10 fêmeas (2 B+ e 8 B-) do Ribeirão Grande, Pindamonhangaba-SP. Os indivíduos foram submetidos a extração dos núcleos de ovócitos, e também obtenção de células metafásicas. Foram testados três marcadores: SatDNA As51, sonda B e microsatélite CA₍₁₅₎ para análise de citogenética molecular nas preparações metafásicas e de núcleos de ovócitos. A citometria de fluxo foi usada para avaliar a quantidade de DNA em amostras de tecido de gônada de fêmeas com cromossomo B. A dupla FISH com as sondas B e As51 foram aquelas que apresentaram os melhores resultados na marcação do cromossomo B em núcleos de ovócitos e também em metafases mitóticas. Além disso, o marcador As51 ajudou na identificação de núcleos haploides e diploides, que foram corroborados pela citometria de fluxo. Os resultados obtidos no presente estudo apresentam ferramentas úteis para a determinação da existência ou não de *drive* no cromossomo B. Alguns avanços são ainda necessários para aprimorar esse método inovador, por exemplo, na diferenciação dos corpúsculos polares dos ovócitos maduros e na manutenção dos ovócitos por mais tempo em condições de análise.

Palavras chave: meiose, ovócitos, inovação metodológica, herança não mendeliana, elementos genéticos egoístas.

ABSTRACT

B chromosomes are supernumerary elements in the genome that occur in a wide variety of eukaryotic organisms. Fishes from the *Psalidodon scabripinnis* complex have B chromosomes, however, it is not known whether this chromosome has the drive capacity. Therefore, the objective of this study was to establish tools for determining the meiotic drive of the B chromosome in female *P. scabripinnis*. For this, 10 females (2 B+ and 8 B-) from Ribeirão Grande, Pindamonhangaba-SP, were analyzed. The individuals underwent extraction of oocyte nuclei, and also obtained metaphase cells. Three markers were tested: SatDNA As51, probe B and microsatellite CA₍₁₅₎ for molecular cytogenetic analysis in metaphase preparations and oocyte nuclei. Flow cytometry was used to evaluate the amount of DNA in gonad tissue samples from females with a B chromosome. Double FISH with probes B and As51 were those that showed the best results in marking the B chromosome in oocyte nuclei and also in mitotic metaphases. Furthermore, the As51 marker helped in the identification of haploid and diploid

nuclei, which were corroborated by flow cytometry. The results obtained in the present study present useful tools for determining the existence or not of a drive on the B chromosome. Some advances are still necessary to improve this innovative method, for example, in the differentiation of the polar bodies of mature oocytes and in the maintenance of oocytes by more time under analysis conditions.

Key words: meiosis, oocytes, methodology innovation, non-Mendelian inheritance, selfish genetic elements.

INTRODUÇÃO

Psalidodon scabripinnis (por vezes nomeado *Astyanax scabripinnis* em trabalhos anteriores a revisão de Terán, Benitez e Mirande (2020)), são teleósteos abundantes na América do Sul (Castro *et al.*, 2018), e no Brasil sua distribuição vai desde o estado do Espírito Santo até o Rio Grande do Sul (Moreira Filho, Galetti Jr e Bertollo, 2004). Considerado como um complexo de espécies tendo em conta dados morfológicos e cariotípicos (Moreira Filho e Bertollo, 1991) *P. scabripinnis* formam populações isoladas em cabeceiras de riachos (Limeira *et al.*, 2019).

P. scabripinnis é um reconhecido modelo de estudos evolutivos e genéticos em peixes devido a ocorrência de cromossomos B em algumas populações (Barbosa *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2022). Os cromossomos B são elementos dispensáveis encontrados no genoma de uma ampla variedade de táxons (Cardoso *et al.*, 2022; Chen, Birchler e Houben, 2022; Jones, 2018; Lee *et al.*, 2023). Eles são um exemplo de cromossomos supranumerários ou acessórios que podem ser encontrados em aproximadamente 3000 espécies que inclui 185 famílias de animais, 7 famílias de fungos e 119 famílias de plantas (D'ambrosio *et al.*, 2017). O equilíbrio da frequência dos cromossomos B nas populações depende da vantagem adaptativa que eles oferecem aos hospedeiros, os efeitos adversos na reprodução e da capacidade de *drive* (Feldman e Levy, 2023; Houben, 2017; Rajpal *et al.*, 2023).

O complexo *P. scabripinnis* apresenta o maior número de cromossomos B estudados dentro do gênero *Psalidodon*, e possui desde macro a microcromossomos B (Silva *et al.*, 2022), e podem variar entre as diferentes populações (Vicari *et al.*, 2011). Porém, o grande cromossomo B metacêntrico (BM) é o mais frequente em *P. scabripinnis* e encontrado em outras espécies do gênero *Psalidodon* (Silva *et al.*, 2022). Além disso, o cromossomo B durante a meiose estabelece um univalente que persiste até a metáfase I (Mestriner *et al.*, 2000), encontrando-se o mesmo padrão em *P. paranae*, o que sugere que esse comportamento do cromossomo B no gênero *Psalidodon* permite uma meiose regular e indivíduos férteis e,

consequentemente, sua manutenção ao longo das gerações (Silva e Araya-Jaime, *et al.*, 2021). Em adição, os cromossomos B tem um papel fundamental no período reprodutivo de *P. scabripinnis* com a sobreexpressão do gene *dmrt1* em machos e a subexpressão de *foxl2a* em fêmeas, possibilitando que coincidam os períodos reprodutivos de indivíduos com cromossomo B, o que assegura a sua manutenção na população, além do que o próprio ciclo reprodutivo da espécie é ampliado e favoreça a obtenção de um maior número de descendentes (Castro *et al.*, 2018; Castro *et al.*, 2019).

Um aspecto que é muito explorado em relação aos cromossomos B na atualidade diz respeito ao fenômeno de “*Drive*”. Se conhece como impulso genético ou “*drive*” a aquele fenômeno onde um elemento genômico não segue a lei de segregação de Mendel e a sua taxa de transmissão é superior a 0,5 (Chen, Birchler e Houben, 2022; Houben, 2017; Rajpal *et al.*, 2023; Silva *et al.*, 2022). De acordo com o tipo de divisão celular onde ocorre, existem três tipos de *drive*: aquele que sucede na meiose (*drive* meiótico), antes da meiose nas divisões mitóticas (*drive* pre-meiótico) e nas divisões mitóticas posteriores a meiose (*drive* post-meiótico) (Camacho, 2022; Chen, Birchler e Houben, 2022; Houben, 2017; Rajpal *et al.*, 2023). A produção de gametas femininos em algumas plantas e vertebrados é um evento ideal para a ocorrência de *drive* meiótico, devido a assimetria da divisão celular e porque somente uma célula filha das quatro resultantes da meiose (o óvulo) contribuem geneticamente para a próxima geração (Chen, Birchler e Houben, 2022).

O *drive* em cromossomo B tem sido estudado nos últimos anos em plantas como o milho (*Zea mays*) (Blavet *et al.*, 2021; Brennan *et al.*, 2023), *Festuca pratensis* (Ebrahimzadegan *et al.*, 2023), *Aegilops speltoides* (Wu *et al.*, 2019), e insetos como *Drosophila melanogaster* (Hanlon e Hawley, 2023), e peixes como *Astatotilapia latifasciata* (Cardoso *et al.*, 2022) e *A. mexicanus* (Imarazene *et al.*, 2021). Cabe ressaltar que nem todos os organismos que possuem cromossomo B tem a capacidade de ter *drive* (Houben, 2017).

Apesar dos avanços sobre diferentes aspectos biológicos dos cromossomos B, ainda é essencial a realização de mais trabalhos para compreender os aspectos comportamentais mecanicistas relacionados à sua presença distintiva, transmissão e manutenção nas populações (Rajpal *et al.*, 2023). Deste modo, há necessidade de realizar estudos transgeracionais para conhecer com mais detalhes os mecanismos de transmissibilidade dos cromossomos B, e que as evidências sejam interpretadas em relação ao modelo parasítico do cromossomo B proposto por Camacho, Sharbel e Beukeboom (2000).

Na literatura estão descritos diversos aspectos concernentes ao cromossomo B em *P. scabripinnis* como a frequência deles no genoma, expressão de genes, origem e evolução,

diversidade morfológica, comportamento na meiose, distorção da frequência na ocorrência dele entre os sexos, entre outros. No entanto, não há conhecimento se o cromossomo B possui a capacidade de ter segregação preferencial nesses peixes. Diante disto, o objetivo do presente estudo é estabelecer ferramentas para a determinação do *drive* meiótico do cromossomo B em fêmeas de *P. scabripinnis* utilizando uma amostra de população do sudeste do Brasil.

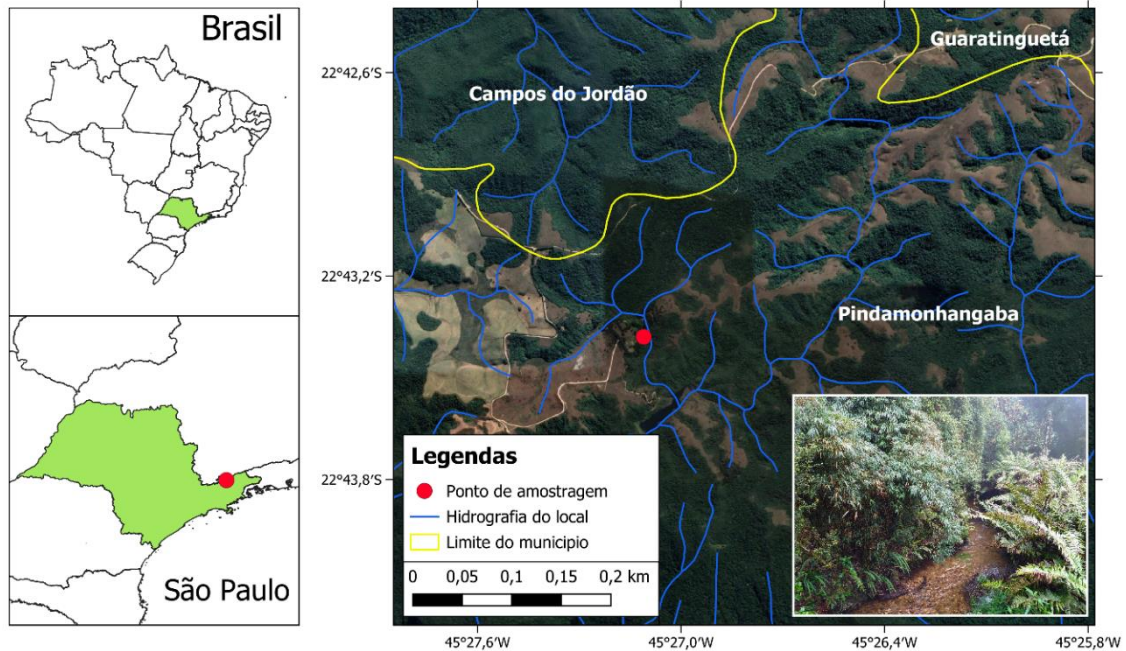
MATERIAL E MÉTODOS

Local de coleta e amostras

Os exemplares de *P. scabripinnis* foram coletados do Ribeirão Grande, bacia do Rio Paraíba do Sul (22°43'22,744" S e 45°27'06,638" W; altitude: 1870 m), município de Pindamonhangaba no Estado de São Paulo (Fig. 5). Os espécimes foram coletados nos meses de maio e setembro de 2022. Os peixes foram armazenados em sacolas com oxigênio sob pressão e levados até o Laboratório de Genética e Evolução da Universidade Estadual de Ponta Grossa para a posterior condução dos ensaios.

Os animais foram coletados e transportados com autorização do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio (Licença SISBIO 15115-1). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com boas práticas de experimentação animal, com autorização da Comissão de Ética em Pesquisa Animal da UEPG (Processo CEUA: 0769342/2021). O acesso ao genoma da espécie está de acordo com o número de cadastro SISGEN A6F96AE.

FIGURA 5 - Localização geográfica do ponto de amostragem.



Fonte: O autor

Análise citogenética convencional

Os animais coletados foram eutanasiados e posteriormente retirou-se os rins posteriores e submetidos ao protocolo para obtenção de cromossomos mitóticos baseada no trabalho de Bertollo, Cioffi e Moreira-Filho (2015). Para visualização das metáfases, foram gotejadas 50 μ l da suspensão em lâminas aquecidas a 37°C e coradas com solução Giemsa 5% diluída em tampão fosfato pH 6,8 ($\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{PO}_4$) por 10 minutos, secas ao ar e visualizadas ao microscópio.

Isolamento de núcleos dos ovócitos

Para este procedimento foram considerados os ovários no estágio III de desenvolvimento, onde era visível a presença de ovócitos maduros (Carvalho *et al.*, 2009), além de ovários imaturos. Os ovários íntegros foram retirados com microtesouras e pinças, e colocados em placas de Petri plásticas contendo 1 ml de solução tampão de lise ($\text{MgCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 9,53 mM; KCl 47,67 mM; Tris 15 mM; Sacarose 74 mM; Triton X-100 0,6%) (Xavier *et al.*, 2017), sendo retirados tecidos diferentes das gônadas e outras impurezas. Após, os preparados foram colocados em tubos de 2 ml com *beads* de zircônio e submetidos ao disruptor de células por 165 s a 280 rpm, e a suspensão resultante foi filtrada em peneiras de nylon de 50 e 30 μ m. O filtrado foi misturado com solução Carnoy e armazenado no freezer a -20°C. Para a avaliação

do isolamento, foram gotejadas 50 µl da suspensão em lâminas aquecidas a 37°C e coradas com solução de Giemsa 2% em tampão fosfato pH 6,8 (KH₂PO₄ + Na₂PO₄) por 15 minutos, secas ao ar e visualizadas ao microscópio.

Preparação das sondas

Para a obtenção de sondas do satélite As51 (Mestriner *et al.*, 2000) foi usado DNA clonado e amplificado a partir do plasmídeo pGEM®T (Promega), usando os primers sp6 5'-ATTAGGTGACACTATAG-3' e T7 5'-TAATACGACTCACTATAGGG. O mix de reação consistiu em um volume total de 50 µl contendo 1× buffer PCR, 1,25 mM MgCl₂, 600 µM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 0,2 µM de cada primer, 100 ng de DNA molde e 1 U de Taq polimerase. As condições de corrida foram 5 min de desnaturação inicial 94°C; seguidas de 35 ciclos de 1 min a 94°C, 45 s a 51°C, 2 min e 20 s a 72°C; e extensão final de 5 min a 72°C. Posteriormente, a sonda As51 obtida foi marcada em PCR com digoxigenina 11-dUTP e biotina 11-dUTP (Roche Applied Science).

Além disso, foi empregada uma sonda específica obtida a partir de cromossomos B microdissectados (sonda B) de acordo com Vicari *et al.* (2011) que foi marcada usando a técnica de DOP-PCR com digoxigenina 11-dUTP (Roche Applied Science). No caso do microssatélite CA₍₁₅₎ foi usada uma sonda comercial Sigma marcada com Cy5 durante a síntese (Kubat *et al.*, 2008).

Análise citogenética molecular

A Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH) foi feita em cromossomos mitóticos e núcleos isolados dos ovócitos seguindo os procedimentos gerais usados por Pinkel, Straume e Gray (1986) e Yano, Bertollo e Cioffi (2017), com modificações. Para as FISH de uma sonda foram empregados por separado as sondas As51, sonda B e CA₍₁₅₎. Para a hibridação da sonda do satélite As51, foi usado o mix de hibridação contendo 150 ng/lâmina, 50% formamida, 2× SSC, 10% sulfato de dextrano, 5 mM buffer fosfato; no caso da sonda B, a concentração foi de 1000 ng/lâmina e da sonda do microssatélite CA₍₁₅₎ 100 ng/lâmina. Para a dupla FISH foram empregadas o satélite As51 e a sonda B usando 150 e 800 ng/lâmina respectivamente. Posteriormente, as lâminas foram incubadas em câmara úmida e escura a 37°C *overnight*.

Finalizado o tempo de hibridação, foram feitas lavagens de alta estringência com formamida 50% em 2×SSC, 2×SSC e 4×SSC/0,05% Tween durante 25 min cada a 42°C. As sondas foram detectadas usando o anticorpo Antidigoxigenina-Rodamina (Roche) e

Estreptavidina-Alexa flúor 488; os cromossomos e núcleos foram contracorados com 4',6'-diamino-2-fenil-indol (DAPI) (1,5 µg/mL) diluído em solução *Antifade* (VECTASHIELD®). As lâminas foram analisadas em microscópio de epifluorescência Olympus BX41 acoplado ao sistema de captura de imagens DP 71 (Olympus). Finalmente as imagens foram processadas no programa Adobe Photoshop® CS6 versão 13.0.

Citometria de fluxo

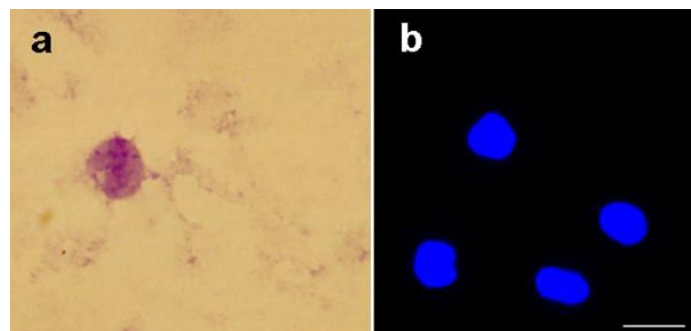
As amostras de gônadas de fêmeas de *P. scabripinnis* do procedimento de obtenção de núcleos de ovócitos preservados em solução Carnoy foram lavadas 3 vezes com solução PBS 1×, centrifugadas a 2000 rpm durante 5 min cada e retirado o sobrenadante. Posteriormente, foi adicionado solução corante com DAPI CyStain® UV Ploidy e submetidas a leitura no citômetro de fluxo Ploid Analyser SYSMEX.

RESULTADOS

Isolamento de núcleos dos ovócitos

No total foram coletadas 18 fêmeas, das quais 9 exibiram gônadas no estágio maduro apresentando ovócitos visíveis. Além disso, 9 fêmeas apresentaram ovários imaturos, onde somente uma dessas amostras foi usada para as análises de citometria. O protocolo desenvolvido e implementado no presente estudo para o isolamento de núcleos dos ovócitos permitiu obter quantidades significativas de núcleos que ajudaram na realização das análises de citogenética molecular. A morfologia dos núcleos obtidos apresentou-se desde formas redondas até ovaladas ao nível da microscopia ótica 2D (Fig. 6). Em todas as preparações apareceram resto de vitelo dos ovócitos processados (Fig. 6a).

FIGURA 6 - Núcleos de ovócitos obtidos de fêmeas de *P. scabripinnis*. (a) Coloração com Giemsa, (b) coloração com DAPI. Escala: 10µm.



Detecção do cromossomo B em células metafásicas

As fêmeas de *P. scabripinnis* analisadas da população do Ribeirão Grande apresentaram um total de $2n=50$ cromossomos, onde duas delas mostraram um número diploide igual a 51 pela presença do cromossomo B metacêntrico. A presença do cromossomo supranumerário foi verificada mediante FISH com o uso de diversas sondas que conseguem marcar o cromossomo B (Fig. 7, 8 e 10).

Na FISH com o emprego de um marcador, a sonda B (B probe) evidenciou o cromossomo B totalmente marcado em amostras que possuíam esse elemento supranumerário (Fig. 7a). No entanto, apareceram sinais mais fracos em diversas regiões dos cromossomos do complemento A. Nas amostras sem cromossomo B, há evidentes marcações situadas principalmente em regiões teloméricas de vários cromossomos (Fig. 7b).

Com relação as hibridações do DNA microssatélite, a sonda $CA_{(15)}$ foi evidente nas duas regiões teloméricas do cromossomo B (Fig. 7c). No entanto, outros sinais individuais foram encontrados em vários cromossomos do complemento A, principalmente localizados nas regiões teloméricas. Sinais com o mesmo padrão foram observados também em amostras que não apresentaram cromossomo B (Fig. 7d).

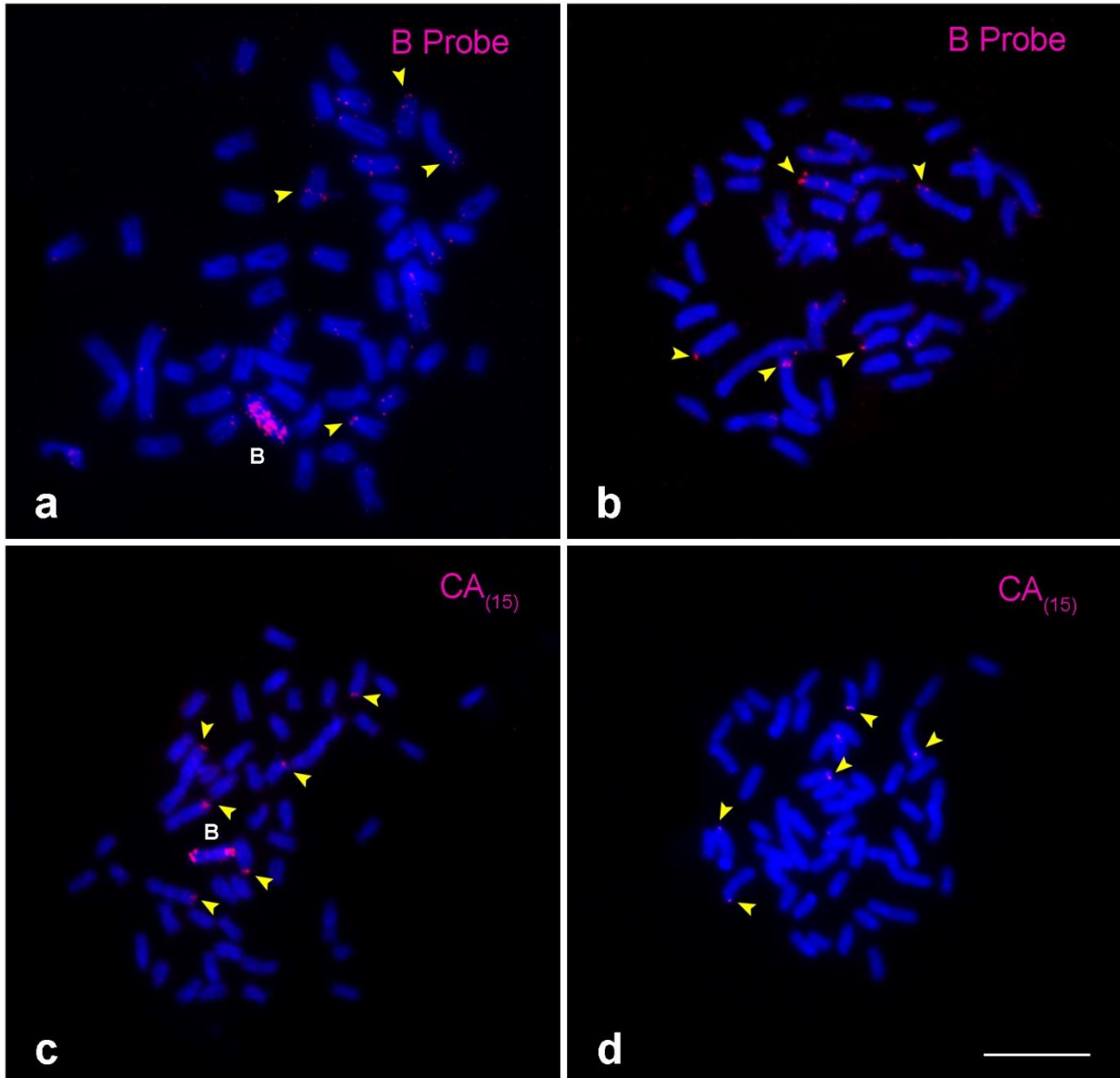
O DNA satélite As51 em amostras com cromossomo B apresentou marcações evidentes nas regiões pericentroméricas (Fig. 8a e 8c). No complemento A, independente da presença do cromossomo B, em algumas amostras destaca a presença de dois sinais maiores e muito fortes nas regiões teloméricas de um par de cromossomos acrocêntricos (Fig. 8a e 8g), enquanto outras amostras apresentaram esse sinal somente em um dos cromossomos do mesmo par acrocêntrico (Fig. 8c e 8e). Outras marcações mais fracas e pouco evidentes foram evidenciadas em alguns cromossomos do complemento A.

Detecção das sondas B, As51 e $CA_{(15)}$ em núcleos de ovócitos

Na FISH o emprego da sonda B, da $CA_{(15)}$ e da sonda do DNA satélite As51, apresentaram padrões de marcação diferentes entre os núcleos dos ovócitos de fêmeas com e sem cromossomo B (Fig. 9).

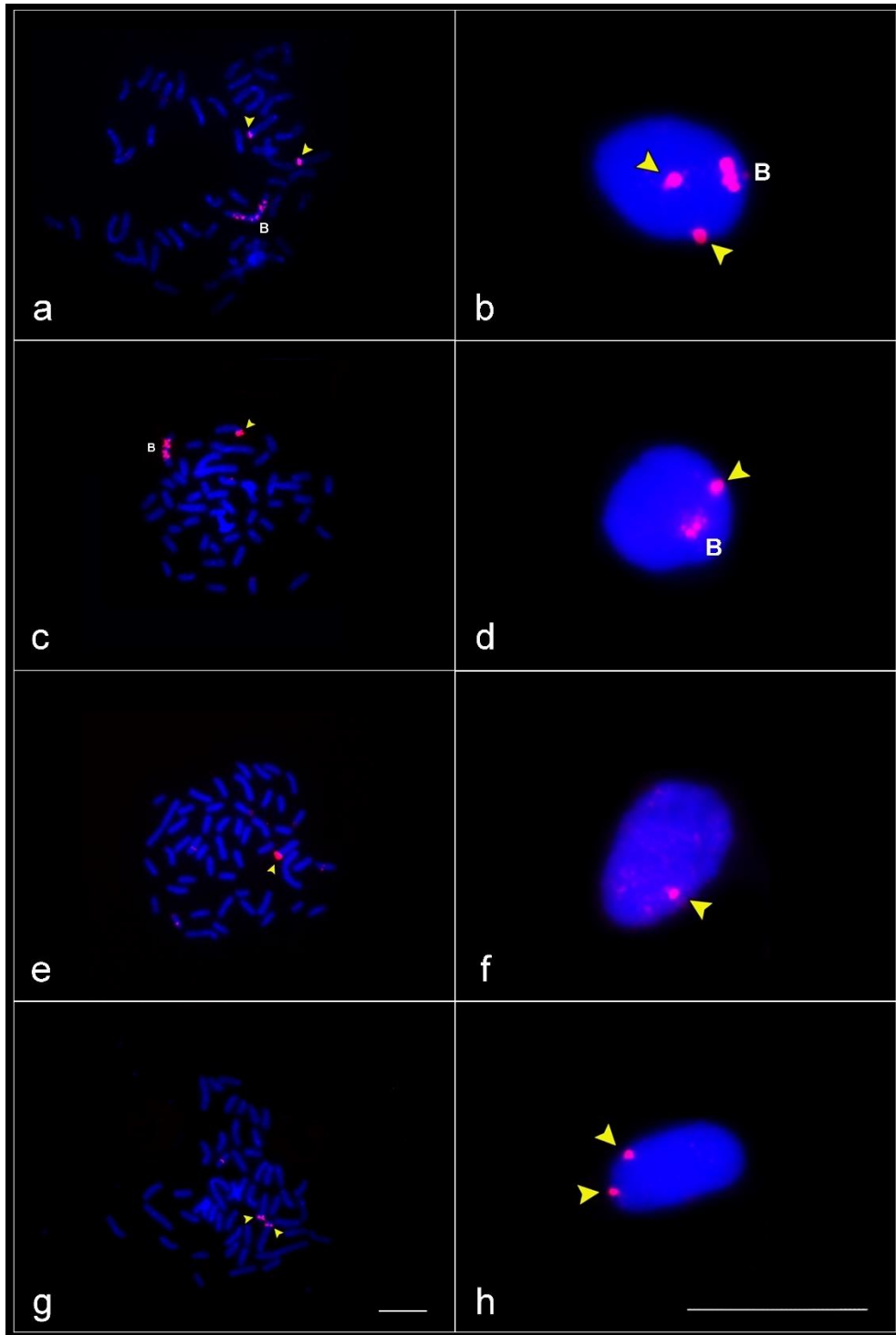
Em relação as marcações com a sonda B, elas não seguiram um padrão de diferenciação definido. Em núcleos de ovócitos de indivíduos com e sem B apareceram sinais localizados na periferia e outras regiões no núcleo (Fig. 9). Enquanto que o DNA do satélite $CA_{(15)}$, mostrou muitos sinais pequenos distribuídos em todos os núcleos dos ovócitos de indivíduos com e sem cromossomo B, sem mostrar algum padrão de distinção entre eles (imagens não mostradas).

FIGURA 7 - Metáfases mitóticas de *P. scabripinnis* sometidas a FISH com sonda única: sonda B (B probe) e CA₍₁₅₎ marcadas com antidigoxigenina rodamina e contracolorados com DAPI (azul). As marcações estão sinalizadas com uma seta amarela. Metáfases com cromossomo B (a, c) e sem cromossomo B (b, d). Escala: 10 µm.



Fonte: O autor

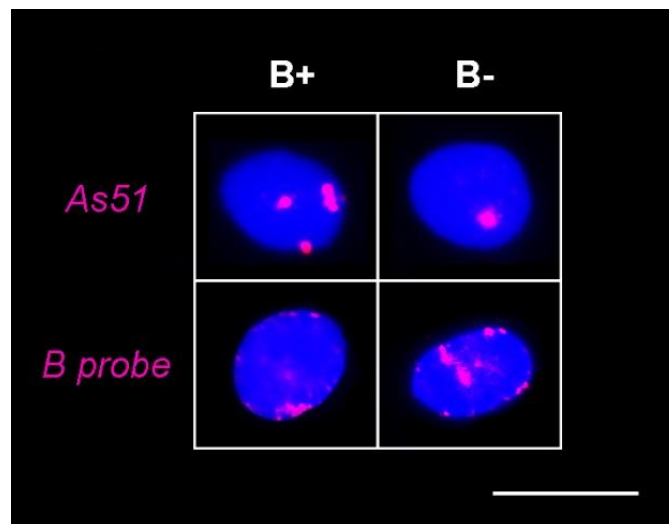
FIGURA 8 – Metáfases e núcleos de ovócitos diploides obtidos de fêmeas de *P. scabripinnis* com a sonda As51 marcada com antidigoxigenina rodamina (vermelho) e contracorados com DAPI (azul). As marcações estão sinalizadas com uma seta amarela. As amostras foram classificadas em quatro grupos distintos com base na presença ou ausência de cromossomo B e no número de sinais de As51. Os grupos incluem (a, b) configurações com cromossomo B e dois sinais, (c, d) com cromossomo B e um sinal, (e, f) sem cromossomo B e um sinal, e (g, h) sem cromossomo B e dois sinais. Escala: 10µm.



Fonte: O autor

No entanto, a FISH com a sonda As51 em núcleos de ovócitos mostrou um padrão mais definido em comparação com a sonda B e CA₍₁₅₎. Em núcleos de ovócitos de indivíduos com e sem cromossomo B observou-se vários sinais claramente diferenciados, onde aquele de maior tamanho, forma não circular e preferencialmente localizado na periferia do núcleo pode ser atribuído ao cromossomo B, identificando os núcleos de amostras com esse elemento supranumerário. Os sinais detectados do satélite As51 nos ovócitos corroboram as marcações encontradas nas metáfases de amostras de indivíduos com e sem cromossomo B (Fig. 8).

FIGURA 9 - Comparativa de núcleos de ovócitos de fêmeas de *P. scabripinnis* com (B+) e sem cromossomo B (B-) submetidas a FISH com as sondas As51 e sonda B (B probe), ambas marcadas com antidigoxigenina rodamina e contracolorados com DAPI. Escala: 10 µm.

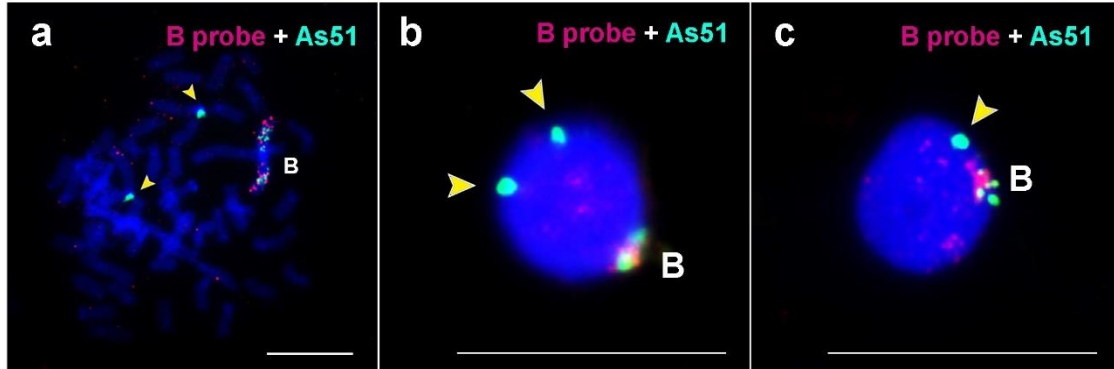


Fonte: O autor

Detecção do cromossomo B em núcleos de ovócitos haploides e diploides

A dupla FISH com o emprego das sondas B e As51 em preparações metafásicas e núcleos de ovócitos conseguiu revelar o cromossomo B pela sobreposição dos sinais (Fig. 10). Além disso, foi possível identificar a ploidia dos núcleos pela quantidade de marcações individuais da sonda As51 não sobrepostas com a sonda B naquelas amostras que apresentaram o acúmulo deste satélite em um par acrocêntrico, considerando núcleos diploides aqueles que apresentaram dois sinais (Fig. 10b) e haploides com somente um sinal (Fig. 10c).

FIGURA 10 - Comparativa de metáfase e núcleos de ovócitos de fêmeas de *P. scabripinnis* com cromossomo B submetidas a dupla FISH com a sonda B (B probe) marcada com antidigoxigenina rodamina e As51 com estreptavidina Alexa flúor 488 e contracolorados com DAPI. Os sinais estão indicados com setas amarelas. (a) metáfase com presença do cromossomo B; (b) ovócito diploide; (c) ovócito haploide. Escala: 10 μ m.



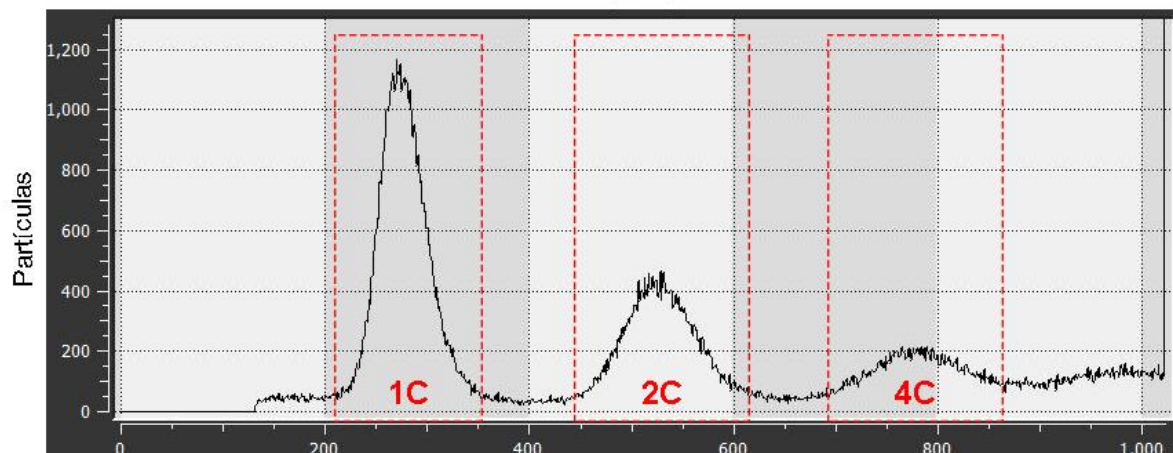
Fonte: O autor

Baseado nisso, se estabelece uma proposta para inferir sobre a existência ou não de *drive* meiótico do cromossomo B em fêmeas de *P. scabripinnis* (Fig. 12).

Determinação da ploidia em gônadas de fêmeas de *P. scabripinnis*

O tecido gonadal de fêmeas no estágio imaturo de desenvolvimento apresentou três ploidias diferentes, desde células haploides (1C) até células diploides em divisão celular (4C) (Fig. 11). Pelo alto grau de degradação das amostras, não foi possível analisar as gônadas de fêmeas no estágio maduro de desenvolvimento.

FIGURA 11 – Gráfico de citometria de fluxo de ovário de *P. scabripinnis* no estágio imaturo de desenvolvimento gonadal.



Fonte: O autor

DISCUSSÃO

Isolamento de núcleos dos ovócitos

O protocolo de isolamento de ovócitos disponibilizou núcleos íntegros e estáveis para a realização das análises de citogenética molecular. Atribuímos essa propriedade aos componentes usados no tampão de lise empregado, assim como o detergente não iônico Triton-X, que performa na ruptura da membrana celular dos ovócitos mantendo os núcleos intactos (Xavier *et al.*, 2017). Já Yamaguchi *et al.* (2001) conseguiu resultados similares empregando o mesmo detergente. Outras substâncias como a sacarose também são requeridas na manutenção da estabilidade dos núcleos (Marie e Brown, 1993). Contudo, a junção das reações de lise proteica em membrana e ação detergente sobre o vitelo dos ovócitos é o procedimento inovador que viabilizou o isolamento dos ovócitos com características preservadas para a finalidade de análises em citogenética molecular. Essas amostras de núcleos isolados serão ainda testadas em relação ao possível emprego em análises quali-quantitativas.

Detecção do cromossomo B em células metafásicas e núcleos de ovócitos

O número diploide das amostras de *P. scabripinnis* e a presença do cromossomo B aqui observados coincide com aqueles reportados em trabalhos anteriores na mesma região de amostragem (Barbosa *et al.*, 2015; Barbosa *et al.*, 2021; Castro *et al.*, 2018; Cornelio *et al.*, 2017; Salvador e Moreira Filho, 1992; Schemczssen-Graeff *et al.*, 2020).

A hibridação da sonda B nos cromossomos supranumerários mostrou resultados similares a estudos anteriores (Castro *et al.*, 2019; Cornelio *et al.*, 2017; Vicari *et al.*, 2011) sendo, portanto, uma sonda ideal para a identificação deste elemento supranumerário de células em metáfase. No entanto, o emprego da sonda B nos núcleos não ajudou na distinção daqueles que tinham ou não o cromossomo B, portanto, esses resultados são contrários aos achados por Castro *et al.* (2019) no emprego da sonda B em núcleos interfásicos, do mesmo modo que no trabalho de Cornelio *et al.* (2017), que empregou essa sonda concomitante a marcadores teloméricos. Destaque-se que estes autores utilizaram de amostras de núcleos de células mitóticas em suspensão, enquanto no presente trabalho foram empregados núcleos de células meióticas e isto pode explicar o nível diferente de resolução da sonda B. É fato que as marcações da sonda B não são específicas e também são encontradas no complemento A. Isto se deve ao grande acúmulo e dispersão de sequências repetitivas encontradas no cromossomo B heterocromático e compartilhado em algumas regiões dos cromossomos do complemento A. Em termos gerais, os cromossomos B se originam a partir dos cromossomos do complemento

A (Camacho, Sharbel e Beukeboom, 2000; Houben *et al.*, 2014; Johnson e Reifová, 2021), o que explica a aparição dessas marcações adicionais. Devido ao desconhecimento das sequências do DNA que possui a sonda B, a informação que ela fornece é limitada (Silva *et al.*, 2016).

Com respeito ao microssatélite CA₍₁₅₎, ele hibrida no cromossomo B nas duas regiões teloméricas, como sucede nos cromossomos B dos lambaris *P. paranae*, *P. bockmanni* e *P. fasciatus* o que ajuda a reforçar a hipótese que o cromossomo B é um isocromossomo (Silva *et al.*, 2016). Semelhante a sonda B, o marcador CA₍₁₅₎ não consegue distinguir os ovócitos que contem ou não o cromossomo B, principalmente porque o microssatélite também hibrida em regiões terminais dos cromossomos do complemento A como verificado na população de *P. scabripinnis* do lago do Pedalinho (Barbosa *et al.*, 2017). Portanto, a alta quantidade desse microssatélite nos cromossomos A estabelece a CA₍₁₅₎ como um marcador pouco informativo em nosso objetivo de identificar núcleos meióticos com cromossomos B.

Por outro lado, a localização simétrica do SatDNA As51 nos dois braços do cromossomo B coincide com os achados de Mestriner *et al.* (2000) e Vicari *et al.* (2011), que estabeleceram que esse elemento supranumerário é um isocromossomo. Como acontece com a sonda B, o As51 é um marcador ideal para a identificação do cromossomo B em preparações metafásicas mitóticas. A quantidade dos sinais de As51 em outras regiões nos cromossomos do complemento A neste estudo foram discretas e em menor número que em trabalhos anteriores (Castro *et al.*, 2019; Kantek *et al.*, 2009; Vicari *et al.*, 2011) que pode ser explicado pelo emprego de lavagens adicionais para o aumento da estringência durante a FISH, aumentando a especificidade (Cabral-De-Mello e Marec, 2021), e também pelo emprego de uma menor quantidade de sonda. O acúmulo do SatDNA As51 no cromossomo B pode ser favorecido pelo fato de que eles não se recombinam com os cromossomos A durante a meiose, e também porque esses cromossomos supranumerários sofrem baixa pressão seletiva devido a sua natureza dispensável (Houben *et al.*, 2014; Marques, Klemme e Houben, 2018). Contudo, essa última é uma afirmativa que deve ainda ser bastante contestada dado o acúmulo de atribuições e associações fisiológicas propostas para *P. scabripinnis* com cromossomos B, flagradas por diferentes métodos de análise de expressão gênica diferencial.

A presença do satélite As51 na região telomérica de dois cromossomos homólogos acrocêntricos coincide com o achado por Mestriner *et al.* (2000) e Vicari *et al.* (2011) nas populações de *P. scabripinnis* do Córrego das Pedras, Barbosa *et al.* (2017) na população de Ribeirão das Perdizes e Barbosa *et al.* (2021) do córrego Lavrinhas. Pela variação do acúmulo do satélite As51 na região terminal dos dois cromossomos homólogos deste par acrocêntrico,

onde há indivíduos com dois ou somente um dos cromossomos com essa alta quantidade do satélite em menção, podemos concluir que em *P. scabripinnis* há heterozigose para essa característica. Esse fato, e inclusive a variação da posição do acúmulo de As51 em cromossomos homólogos acrocêntricos já foi reportado para *P. scabripinnis*, *P. paranae* e *P. fasciatus* (Kantek *et al.*, 2009), e pode ser explicado pela organização do satDNA que é resultado de uma recombinação desigual dos cromossomos homólogos durante a meiose, conversão gênica e transposição (Palacios-Gimenez *et al.*, 2017).

A citometria de fluxo confirma a presença de núcleos de ovócitos haploides

A presença de três níveis de conteúdo de DNA corrobora a presença de células com diferentes ploidias nas gônadas de fêmeas no estágio imaturo de desenvolvimento, ou seja, células diploides (2C), células diploides em divisão celular (4C) (em meiose) e haploides (ovócitos maduros e corpúsculos polares). Em vista destas evidências, se pode reforçar a hipótese da desova parcelada em *P. scabripinnis* sugerida por Pereira Filho *et al.* (2011) e Melo *et al.* (2005). Esta evidência também foi corroborada por Cornelio *et al.* (2017) que encontrou gônadas com ovócitos em diferentes estágios de desenvolvimento ao mesmo tempo. Deste modo, o desenvolvimento dos ovários de *P. scabripinnis* podem ser confirmados do tipo assíncrono, com a coexistência de ovócitos de diversos estágios de desenvolvimento, sem a predominância de uma única população de células (Lubzens *et al.*, 2010).

A sonda B + As51 identificam o cromossomo B e a ploidia dos núcleos de ovócitos: ferramentas para a determinação de drive meiótico do cromossomo B

Os sinais que apresenta a sonda As51 nos núcleos dos ovócitos de indivíduos com e sem cromossomo B, mostra que o SatDNA As51 serve como um marcador que pode ajudar na identificação do cromossomo B. No entanto, o emprego dessa sonda única não consegue diferenciar totalmente o cromossomo B dos sinais dos cromossomos homólogos acrocêntricos. Dado que o cromossomo B é rico no SatDNA As51 (Mestriner *et al.*, 2000; Schemczssen-Graeff *et al.*, 2020; Vicari *et al.*, 2011), e a sonda B consegue hibridar nele (Castro *et al.*, 2019; Cornelio *et al.*, 2017; Vicari *et al.*, 2011), a sobreposição desses marcadores na dupla FISH, tanto em preparações metafásicas como em núcleos de ovócitos de *P. scabripinnis* permitem detectar com maior precisão o cromossomo B. Isto é reforçado pela localização do sinal do cromossomo B na periferia dos núcleos dos ovócitos, que coincide com o reportado por (Schemczssen-Graeff

et al., 2020) em núcleos de rim de *P. scabripinnis* mediante o uso de microscopia confocal de varredura à laser.

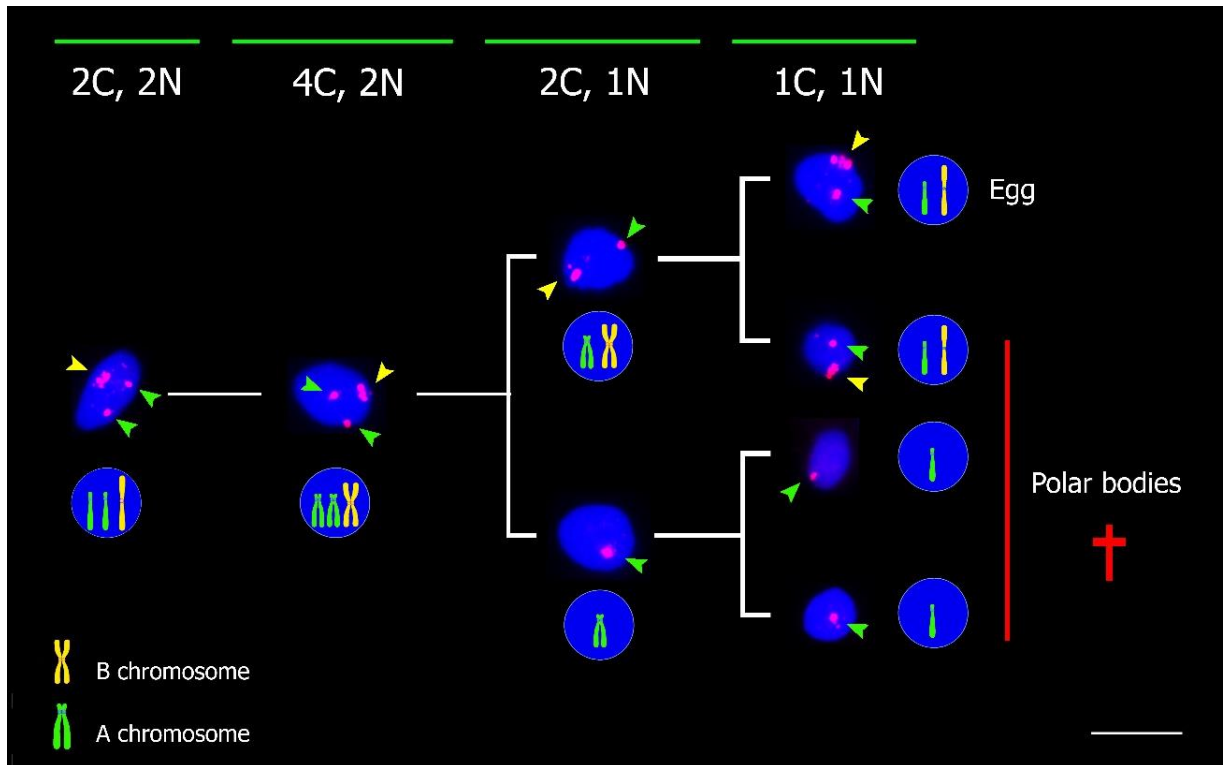
As marcações isoladas de As51 verificadas nos núcleos, ajudaram na identificação de núcleos haploides e diploides de ovócitos de *P. scabripinnis*, sendo um marcador ideal para fazer análises qualitativas, para cada amostra de gônada feminina, dos núcleos haploides e diploides que possuem ou não o cromossomo B. Deste modo, pode ser empregado idealmente para fêmeas que apresentem em dois cromossomos homólogos acrocêntricos os sinais fortes do marcador As51 que possam ser identificados e quantificados nos núcleos de ovócitos para a determinação da sua ploidia (Fig. 12). Semelhante ao que outros autores inferiram utilizando outros marcadores para identificar a ploidia como a histona H3 em peixes (Piscor e Parise-Maltempi, 2016a), ou sondas dos cromossomos X, Y e 18 para detectar anormalidades em gametas humanos (Elnahas *et al.*, 2023).

Por tanto, o uso das sondas B e SatDNA As51 para identificar a presença do cromossomo B e o conhecimento da ploidia dos núcleos de ovócitos analisados se convertem em ferramentas ideais para determinar a existência ou não de *drive* meiótico do cromossomo B em fêmeas de *P. scabripinnis*. Fazendo uma contagem dos núcleos haploides que possuem ou não o cromossomo B, e analisando os dados contrastando-os com a segregação mendeliana de 0,5 mediante o teste Qui-quadrado como outros autores (Cardoso *et al.*, 2022; Oliveira *et al.*, 1997), pode se determinar a existência ou não do *drive* meiótico.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os resultados apresentados neste estudo correspondem a primeira forma de estudar o *drive* meiótico do cromossomo B em fêmeas de peixes analisando diretamente os núcleos dos gametas em diferentes estágios de desenvolvimento gonadal mediante uso de marcadores de citogenética molecular e citometria de fluxo. A estratégia empregada é ideal para espécies que apresentam dificuldades para a sua manutenção e reprodução.

FIGURA 12 - Proposta da determinação de drive meiótico do cromossomo B na meiose em fêmeas de *P. scabripinnis* com o uso da sonda B + SatDNA As51 (seta amarela) e As51 (seta verde). A ideia apresentada é para uma fêmea com dois sinais terminais em um par homólogo acrocêntrico (homozigota para essa característica). Se esquematiza os diferentes conteúdos de DNA dos ovócitos e corpúsculos polares (C), e o número de cromossomos (N) em diversas etapas da divisão celular reducional: Interfase (fase G1) (2C, 2N); Metáfase I (4C, 2N); Metáfase II (2C, 1N) e telófase II (1C, 1N). Para cada etapa se ilustra a presença dos cromossomos A e B, que são indicados pela cor das setas nos núcleos dos ovócitos.



Fonte: O autor

Com base nos resultados apresentados, ainda não pode se determinar a existência ou não do drive do cromossomo B em fêmeas de *P. scabripinnis*. As ferramentas desenvolvidas no presente estudo e a superação das barreiras como a diferenciação dos corpúsculos polares dos ovócitos maduros e a manutenção dos ovócitos por mais tempo em condições de análise, nos permitirão responder a um importante pergunta: existe ou não drive meiótico do cromossomo B em fêmeas de *P. scabripinnis*?

REFERÊNCIAS

- ABDUL-MUNEER, P. M. Application of Microsatellite Markers in Conservation Genetics and Fisheries Management: Recent Advances in Population Structure Analysis and Conservation Strategies. **Genetics Research International**, 2014, p. 691759, 2014.
- ABILHOA, V. Aspectos da história natural de *Astyanax scabripinnis* Jenyns (Teleostei, Characidae) em um riacho de floresta com araucária no sul do Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, 24, n. 4, p. 997-1005, 2007.
- ASHMAN, T.-L. *et al.* Tree of Sex: A database of sexual systems. **Scientific Data**, 1, n. 1, p. 140015, 2014.
- AVVARU, A. K. *et al.* MSDB: a comprehensive, annotated database of microsatellites. **Nucleic Acids Research**, 48, n. D1, p. D155-D159, 2019.
- BANAEI-MOGHADDAM, A. M. *et al.* Nondisjunction in Favor of a Chromosome: The Mechanism of Rye B Chromosome Drive during Pollen Mitosis. **The Plant Cell**, 24, n. 10, p. 4124-4134, 2012.
- BARBOSA, P. *et al.* Identification and chromosome mapping of repetitive elements in the *Astyanax scabripinnis* (Teleostei: Characidae) species complex. **Genetica**, 143, n. 1, p. 55-62, 2015.
- BARBOSA, P. *et al.* Variability and evolutionary implications of repetitive DNA dynamics in genome of *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae). **Comparative Cytogenetics**, 11, n. 1, p. 143-162, 2017.
- BARBOSA, P. *et al.* Silencing of Transposable Elements Mediated by 5-mC and Compensation of the Heterochromatin Content by Presence of B Chromosomes in *Astyanax scabripinnis*. **Cells**, 10, n. 5, p. 1162, 2021.
- BAUMGARTNER, G. *et al.* **Peixes do baixo rio Iguçu**. Eduem, 2012. 203 p. 857628426X.
- BERTOLLO, L.; CIOFFI, M.; MOREIRA-FILHO, O. Direct chromosome preparation from freshwater teleost fishes. *In*: OZOUF-COSTAZ, C.; PISANO, E., *et al.* (Ed.). **Fish Cytogenetic Techniques (Chondrichthyans and Teleosts)**, 2015. p. 21-26.
- BISCOTTI, M. A.; OLMO, E.; HESLOP-HARRISON, J. S. Repetitive DNA in eukaryotic genomes. **Chromosome Research**, 23, n. 3, p. 415-420, 2015.
- BLAVET, N. *et al.* Sequence of the supernumerary B chromosome of maize provides insight into its drive mechanism and evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 118, n. 23, p. e2104254118, 2021.

BOMBLIES, K.; HIGGINS, J. D.; YANT, L. Meiosis evolves: adaptation to external and internal environments. **New Phytologist**, 208, n. 2, p. 306-323, 2015.

BOUDICHEVSKAIA, A. *et al.* Rye B chromosomes differently influence the expression of A chromosome–encoded genes depending on the host species. **Chromosome Research**, 30, n. 4, p. 335-349, 2022.

BRENNAN, V. A. *et al.* Variation for maize B chromosome preferential fertilization: a component of the B chromosome drive mechanism. **The Nucleus**, 66, n. 3, p. 305-310, 2023.

CABRAL-DE-MELLO, D. C.; MAREC, F. Universal fluorescence in situ hybridization (FISH) protocol for mapping repetitive DNAs in insects and other arthropods. **Molecular Genetics and Genomics**, 296, n. 3, p. 513-526, 2021.

CAMACHO, J. P. M. B Chromosomes. *In*: GREGORY, T. R. (Ed.). **The Evolution of the Genome**. Burlington: Academic Press, 2005. p. 223-286.

CAMACHO, J. P. M. Non-Mendelian segregation and transmission drive of B chromosomes. **Chromosome Research**, 30, n. 2, p. 217-228, 2022.

CAMACHO, J. P. M. *et al.* Satellite DNA Is an Inseparable Fellow Traveler of B Chromosomes. *In*: UGARKOVIĆ, Đ. (Ed.). **Satellite DNAs in Physiology and Evolution**. Cham: Springer International Publishing, 2021. p. 85-102.

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

CARDOSO, A. L. *et al.* Meiotic behavior, transmission and active genes of B chromosomes in the cichlid *Astatotilapia latifasciata*: new clues about nature, evolution and maintenance of accessory elements. **Molecular Genetics and Genomics**, 297, n. 4, p. 1151-1167, 2022.

CARVALHO, P. A. D. *et al.* Reproductive biology of *Astyanax fasciatus* (Pisces: Characiformes) in a reservoir in southeastern Brazil. **Journal of Applied Ichthyology**, 25, n. 3, p. 306-313, 2009.

CASTRO, J. P. *et al.* Differential Expression of *dmrt1* in *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae) Is Correlated with B Chromosome Occurrence. **Zebrafish**, 16, n. 2, p. 182-188, 2018.

CASTRO, J. P. *et al.* Differential Expression of Genes Related to Sexual Determination Can Modify the Reproductive Cycle of *Astyanax scabripinnis* (Characiformes: Characidae) in B Chromosome Carrier Individuals. **Genes**, 10, n. 11, p. 909, 2019.

CASTRO, J. P. *et al.* 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**, 25, n. 1, p. 231-244, 2015.

CHEN, J.; BIRCHLER, J. A.; HOUBEN, A. The non-Mendelian behavior of plant B chromosomes. **Chromosome Research**, 30, n. 2, p. 229-239, 2022.

CORNELIO, D. *et al.* Hermaphroditism can compensate for the sex ratio in the *Astyanax scabripinnis* species complex (Teleostei: Characidae): expanding the B chromosome study model. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, 27, n. 3, p. 681-689, 2017.

D'AMBROSIO, U. *et al.* B-chrom: a database on B-chromosomes of plants, animals and fungi. **New Phytologist**, 216, n. 3, p. 635-642, 2017.

DALLA, E. *et al.* Genome elimination mediated by gene expression from a selfish chromosome. **Science Advances**, 6, n. 14, p. eaaz9808, 2020.

EBRAHIMZADEGAN, R. *et al.* Meiotic segregation and post-meiotic drive of the *Festuca pratensis* B chromosome. **Chromosome Research**, 31, n. 3, p. 26, 2023.

EIGENMANN, C. H. **New characins in the collection of the Carnegie Museum.** Carnegie Museum, 1911.

ELKOUBY, Y. M.; MULLINS, M. C. Methods for the analysis of early oogenesis in Zebrafish. **Developmental Biology**, 430, n. 2, p. 310-324, 2017.

ELNAHAS, R. F. *et al.* Sperm chromosomal abnormalities in infertile men with failed intracytoplasmic sperm injection (ICSI). **Middle East Fertility Society Journal**, 28, n. 1, p. 18, 2023.

FELDMAN, M.; LEVY, A. A. B Chromosomes. *In*: FELDMAN, M. e LEVY, A. A. (Ed.). **Wheat Evolution and Domestication.** Cham: Springer International Publishing, 2023. p. 71-84.

FERNANDES, C. A.; MARTINS-SANTOS, I. C. Sympatric occurrence of three cytotypes and four morphological types of B chromosomes of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characiformes) in the River Ivaí Basin, state of Paraná, Brazil. **Genetica**, 124, n. 2, p. 301-306, 2005.

FOE, V. E. Does the Pachytene Checkpoint, a Feature of Meiosis, Filter Out Mistakes in Double-Strand DNA Break Repair and as a side-Effect Strongly Promote Adaptive Speciation? **Integrative Organismal Biology**, 4, n. 1, p. 1-57, 2022.

GAO, C. *et al.* Revisiting an important component of plant genomes: microsatellites. **Functional Plant Biology**, 40, n. 7, p. 645-661, 2013.

GARRIDO-RAMOS, M. A. Satellite DNA: An Evolving Topic. **Genes**, 8, n. 9, p. 230, 2017.

GODINHO, H. P. Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aquicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 31, n. 3, p. 351-360, 2007.

GOES, C. A. G. *et al.* Revealing the Satellite DNA History in *Psalidodon* and *Astyanax* Characid Fish by Comparative Satellitomics. **Frontiers in Genetics**, 13, p. 884072, 2022. Original Research.

GONEN, R. *et al.* A DAPI-Based Modified C-banding Technique for a Rapid Achieving High Photographic Contrast of Centromeres on Chromosomes. **Cell Biochemistry and Biophysics**, 80, n. 2, p. 375-384, 2022.

GREY, C.; DE MASSY, B. Chromosome Organization in Early Meiotic Prophase. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, 9, p. 688878, 2021. Review.

HANLON, S. L.; HAWLEY, R. S. B chromosomes reveal a female meiotic drive suppression system in *Drosophila melanogaster*. **Current Biology**, 33, n. 11, p. 2300-2306.e2305, 2023.

HOUBEN, A. B Chromosomes – A Matter of Chromosome Drive. **Frontiers in Plant Science**, 8, p. 238635, 2017. Review.

HOUBEN, A. *et al.* Evolution and biology of supernumerary B chromosomes. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 71, n. 3, p. 467-478, 2014.

IMARAZENE, B. *et al.* A supernumerary “B-sex” chromosome drives male sex determination in the Pachón cavefish, *Astyanax mexicanus*. **Current Biology**, 31, n. 21, p. 4800-4809.e4809, 2021.

JOHNSON, M.; REIFOVÁ, R. Evolution of B Chromosomes: From Dispensable Parasitic Chromosomes to Essential Genomic Players. **Frontiers in Genetics**, 12, p. 727570, 2021. Review.

JONES, R. N. B-Chromosome Drive. **The American Naturalist**, 137, n. 3, p. 430-442, 1991.

JONES, R. N. Transmission and Drive Involving Parasitic B Chromosomes. **Genes**, 9, n. 8, p. 388, 2018.

KANTEK, D. L. Z. *et al.* Chromosomal location and distribution of As51 satellite DNA in five species of the genus *Astyanax* (Teleostei, Characidae, Incertae sedis). **Journal of Fish Biology**, 75, n. 2, p. 408-421, 2009.

KUBAT, Z. *et al.* Microsatellite accumulation on the Y chromosome in *Silene latifolia*. **Genome**, 51, n. 5, p. 350-356, 2008.

LEE, H. *et al.* Ability of a selfish B chromosome to evade genome elimination in the jewel wasp, *Nasonia vitripennis*. **Heredity**, 131, n. 3, p. 230-237, 2023.

LIMEIRA, D. M. *et al.* Molecular data reveal a complex population genetic structure for *Psalidodon scabripinnis* (Teleostei: Characidae) in the Atlantic Rainforest, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, 45, p. e20210048, 2022.

LIMEIRA, D. M. *et al.* Genetic variability in a population of *Astyanax scabripinnis*: recent bottleneck and the possible influence of individuals with B chromosomes. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, 41, p. 47323, 2019.

LINDHOLM, A. K. *et al.* The Ecology and Evolutionary Dynamics of Meiotic Drive. **Trends in Ecology & Evolution**, 31, n. 4, p. 315-326, 2016.

LÓPEZ-FLORES, I.; GARRIDO-RAMOS, M. The repetitive DNA content of eukaryotic genomes. **Repetitive DNA**, 7, p. 1-28, 2012.

LUBZENS, E. *et al.* Oogenesis in teleosts: How fish eggs are formed. **General and Comparative Endocrinology**, 165, n. 3, p. 367-389, 2010.

MARIE, D.; BROWN, S. C. A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. **Biology of the Cell**, 78, n. 1-2, p. 41-51, 1993.

MARQUES, A.; KLEMME, S.; HOUBEN, A. Evolution of Plant B Chromosome Enriched Sequences. **Genes**, 9, n. 10, p. 515, 2018.

MELO, F. C. S. A. D. *et al.* Biologia reprodutiva de fêmeas de lambari-prata (*Astyanax scabripinnis*)(Characidae, Tetragonopterinae) em tanques de piscicultura. **Revista Ceres**, 52, n. 304, p. 811-829, 2005.

MERCIER, R. *et al.* The Molecular Biology of Meiosis in Plants. **Annual Review of Plant Biology**, 66, n. 1, p. 297-327, 2015.

MESTRINER, C. A. *et al.* Structural and functional evidence that a B chromosome in the characid fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome. **Heredity**, 85, n. 1, p. 1-9, 2000.

MILANI, D. *et al.* Out of patterns, the euchromatic B chromosome of the grasshopper *Abracris flavolineata* is not enriched in high-copy repeats. **Heredity**, 127, n. 5, p. 475-483, 2021.

MIRANDE, J. M. Phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes): from characters to taxonomy. **Neotropical Ichthyology**, 8, p. 385-568, 2010.

MIRANDE, J. M. Morphology, molecules and the phylogeny of Characidae (Teleostei, Characiformes). **Cladistics**, 35, n. 3, p. 282-300, 2019.

MOLINA, W. F. *et al.* Evidence for meiotic drive as an explanation for karyotype changes in fishes. **Marine Genomics**, 15, p. 29-34, 2014.

MOREIRA FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. *Astyanax scabripinnis* (Pisces; Characidae): a "species complex". **Brazil J. Genet.**, 14, p. 331-357, 1991.

MOREIRA FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C.; GALETTI JR, P. M. Distribution of sex chromosome mechanisms in neotropical fish and description of a ZZ/ZW system in *Parodon hilarii* (Parodontidae). **Caryologia**, 46, n. 2-3, p. 115-125, 1993.

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

NAVARRO-DOMÍNGUEZ, B. *et al.* Gene expression changes elicited by a parasitic B chromosome in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* are consistent with its phenotypic effects. **Chromosoma**, 128, n. 1, p. 53-67, 2019.

NETTO FERREIRA, A. L. *et al.* A New Miniature Characid (Ostariophysi: Characiformes: Characidae), with Phylogenetic Position Inferred from Morphological and Molecular Data. **PLOS ONE**, 8, n. 1, p. e52098, 2013.

NOVÁK, P.; NEUMANN, P.; MACAS, J. Global analysis of repetitive DNA from unassembled sequence reads using RepeatExplorer2. **Nature Protocols**, 15, n. 11, p. 3745-3776, 2020.

OHKURA, H. Meiosis: An Overview of Key Differences from Mitosis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, 7, n. 5, p. a015859, 2015.

OLIVEIRA, C. *et al.* Phylogenetic relationships within the speciose family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive ingroup sampling. **BMC Evolutionary Biology**, 11, n. 1, p. 275, 2011.

OLIVEIRA, C. *et al.* Increased B chromosome frequency and absence of drive in the fish *Prochilodus lineatus*. **Heredity**, 79, n. 5, p. 473-476, 1997.

OLIVEIRA, J. I. N. *et al.* First characterization of PIWI-interacting RNA clusters in a cichlid fish with a B chromosome. **BMC Biology**, 20, n. 1, p. 204, 2022.

OLIVEIRA, M. K. D. *et al.* Hábito alimentar e reprodução de *Astyanax scabripinnis* (Jenyns, 1842) na sub-bacia do Rio Queima-Pé, no município de Tangará da Serra – MT. **Brazilian Journal of Development**, 9, n. 3, p. 10169-10183, 2023.

PALACIOS-GIMENEZ, O. M. *et al.* High-throughput analysis of the satellitome revealed enormous diversity of satellite DNAs in the neo-Y chromosome of the cricket *Eneoptera surinamensis*. **Scientific Reports**, 7, n. 1, p. 6422, 2017.

PAVANELLI, C. S.; OLIVEIRA, C. A. M. A redescription of *Astyanax gymnodontus* (Eigenmann, 1911), new combination, a polymorphic characid fish from the rio Iguaçú basin, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, 7, p. 569-578, 2009.

PAZZA, R.; KAVALCO, K. F. Chromosomal evolution in the neotropical characin *Astyanax* (Teleostei, Characidae). **The Nucleus**, 50, n. 3, p. 519-543, 2007.

PEREIRA FILHO, H. P. *et al.* Biologia reprodutiva de fêmeas de lambari-prata, *Astyanax scabripinnis* Jenyns, 1842 (Characidae; Tetragonopterinae; Teleostei) em condições de cativeiro. **Ciência Animal Brasileira / Brazilian Animal Science**, 12, n. 4, p. 625-634, 2011.

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

PISCOR, D.; PARISE-MALTEMPI, P. P. Chromosomal mapping of H3 histone and 5S rRNA genes in eight species of *Astyanax* (Pisces, Characiformes) with different diploid numbers: syntenic conservation of repetitive genes. **Genome**, 59, n. 3, p. 167-172, 2016a.

PISCOR, D.; PARISE-MALTEMPI, P. P. Microsatellite Organization in the B Chromosome and A Chromosome Complement in *Astyanax* (Characiformes, Characidae) Species. **Cytogenetic and Genome Research**, 148, n. 1, p. 44-51, 2016b.

RAJPAL, V. R. *et al.* Comprehending the dynamism of B chromosomes in their journey towards becoming unselfish. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, 10, p. 1072716, 2023.

RUBAN, A. *et al.* How Next-Generation Sequencing Has Aided Our Understanding of the Sequence Composition and Origin of B Chromosomes. **Genes**, 8, n. 11, p. 294, 2017.

RUBAN, A. *et al.* Supernumerary B chromosomes of *Aegilops speltoides* undergo precise elimination in roots early in embryo development. **Nature Communications**, 11, n. 1, p. 2764, 2020.

RUIZ-RUANO, F. J. *et al.* High-throughput analysis of the satellitome illuminates satellite DNA evolution. **Scientific Reports**, 6, n. 1, p. 28333, 2016.

SALVADOR, L. B.; MOREIRA FILHO, O. B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Heredity**, 69, n. 1, p. 50-56, 1992.

SANTOS, L. P. D. *et al.* Chromosomal Instability and Origin of B Chromosomes in the Amazonian Glass Tetra *Moenkhausia oligolepis* (Günther, 1864) (Characiformes, Characidae). **Cytogenetic and Genome Research**, 161, n. 5, p. 249-256, 2021.

SCHACHT, R. *et al.* Adult sex ratios: causes of variation and implications for animal and human societies. **Communications Biology**, 5, n. 1, p. 1273, 2022.

SCHEMCZSSEN-GRAEFF, Z. *et al.* Dynamics of Replication and Nuclear Localization of the B Chromosome in Kidney Tissue Cells in *Astyanax scabripinnis* (Teleostei: Characidae). **Zebrafish**, 17, n. 2, p. 147-152, 2020.

SHI, X. *et al.* Effect of aneuploidy of a non-essential chromosome on gene expression in maize. **The Plant Journal**, 110, n. 1, p. 193-211, 2022.

SHIBATTA, O. A. *et al.* Diversidade e distribuição de peixes na bacia do rio Tibagi. In: MEDRI, M.; BIANCHINI, E., *et al.* (Ed.). **A bacia do rio Tibagi**. Londrina, 2002. v. 1.

SILVA, D. M. Z. A. *et al.* Meiotic self-pairing of the *Psalidodon* (Characiformes, Characidae) iso-B chromosome: A successful perpetuation mechanism. **Genetics and Molecular Biology**, 44, n. 3, p. e20210084, 2021.

SILVA, D. M. Z. A. *et al.* B Chromosomes in *Psalidodon scabripinnis* (Characiformes, Characidae) Species Complex. **Animals**, 12, n. 17, p. 2174, 2022.

SILVA, D. M. Z. A. *et al.* Origin of B chromosomes in the genus *Astyanax* (Characiformes, Characidae) and the limits of chromosome painting. **Molecular Genetics and Genomics**, 291, n. 3, p. 1407-1418, 2016.

SILVA, D. M. Z. A. *et al.* Delimiting the Origin of a B Chromosome by FISH Mapping, Chromosome Painting and DNA Sequence Analysis in *Astyanax paranae* (Teleostei, Characiformes). **PLOS ONE**, 9, n. 4, p. e94896, 2014.

SILVA, D. M. Z. A. *et al.* Long-term persistence of supernumerary B chromosomes in multiple species of *Astyanax* fish. **BMC Biology**, 19, n. 1, p. 1-17, 2021.

SILVA, D. M. Z. A. *et al.* High-throughput analysis unveils a highly shared satellite DNA library among three species of fish genus *Astyanax*. **Scientific Reports**, 7, n. 1, p. 12726, 2017.

SUBRAMANIAN, V. V.; HOCHWAGEN, A. The Meiotic Checkpoint Network: Step-by-Step through Meiotic Prophase. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, 6, n. 10, p. a016675, 2014.

SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**, 75, n. 1, p. 304-306, 1972.

SUWA, K.; YAMASHITA, M. Regulatory mechanisms of oocyte maturation and ovulation. *In*: BABIN, P. J.; CERDÀ, J., *et al.* (Ed.). **The Fish Oocyte: From Basic Studies to Biotechnological Applications**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2007. p. 323-347.

TERÁN, G. E.; BENITEZ, M. F.; MIRANDE, J. M. Opening the Trojan horse: phylogeny of *Astyanax*, two new genera and resurrection of *Psalidodon* (Teleostei: Characidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**, 190, n. 4, p. 1217-1234, 2020.

TREANGEN, T. J.; SALZBERG, S. L. Repetitive DNA and next-generation sequencing: computational challenges and solutions. **Nature Reviews Genetics**, 13, n. 1, p. 36-46, 2012.

VALENTE, G. T. *et al.* B chromosomes: from cytogenetics to systems biology. **Chromosoma**, 126, n. 1, p. 73-81, 2017.

VAN DER SLEEN, P.; ALBERT, J. S. **Field guide to the fishes of the Amazon, Orinoco, and Guianas**. Princeton University Press, 2017. 0691170746.

VICARI, M. R. *et al.* New insights on the origin of B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* obtained by chromosome painting and FISH. **Genetica**, 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**, 74, n. 1-2, p. 70-75, 1996.

WEDELL, N.; PRICE, T. A. R.; LINDHOLM, A. K. Gene drive: progress and prospects. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, 286, n. 1917, p. 20192709, 2019.

WU, D. *et al.* Nondisjunction and unequal spindle organization accompany the drive of *Aegilops speltoides* B chromosomes. **New Phytologist**, 223, n. 3, p. 1340-1352, 2019.

XAVIER, P. L. P. *et al.* A Flow Cytometry Protocol to Estimate DNA Content in the Yellowtail Tetra *Astyanax altiparanae*. **Frontiers in Genetics**, 8, p. 131, 2017. Methods.

XU, W. *et al.* Comparative mitogenomes of three species in *Moenkhausia*: Rare irregular gene rearrangement within Characidae. **International Journal of Biological Macromolecules**, 183, p. 1079-1086, 2021.

YAMAGUCHI, A. *et al.* Identification and molecular cloning of germinal vesicle lamin B3 in goldfish (*Carassius auratus*) oocytes. **European Journal of Biochemistry**, 268, n. 4, p. 932-939, 2001.

YANO, C. F.; BERTOLLO, L. A. C.; CIOFFI, M. D. B. Fish-FISH: Molecular Cytogenetics in Fish Species. *In*: LIEHR, T. (Ed.). **Fluorescence In Situ Hybridization (FISH): Application Guide**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2017. p. 429-443.

YOSHIDA, K. *et al.* B Chromosomes Have a Functional Effect on Female Sex Determination in Lake Victoria Cichlid Fishes. **PLOS Genetics**, 7, n. 8, p. e1002203, 2011.

ZHANG, J. *et al.* Molecular Mechanisms of Homologous Chromosome Pairing and Segregation in Plants. **Journal of Genetics and Genomics**, 41, n. 3, p. 117-123, 2014.

ANEXO A- AUTORIZAÇÃO DO INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE - ICMBIO (LICENÇA SISBIO 15115-1)



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

Licença permanente para coleta de material zoológico

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

Observações, ressalvas e condicionantes

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

Táxons autorizados

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

Destino do material biológico coletado

#	Nome 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



Página 1/2

**ANEXO B- AUTORIZAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL
DA UEPG (PROCESSO CEUA: 0769342/2021)**

01/12/2021 11:55 SEI/UEPG - 0769342 - Carta

UEPG
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
Av. General Carlos Cavalcanti, 4748 - Bairro Uvaranas - CEP 84030-900 - Ponta Grossa - PR - <https://uepg.br>

CARTA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
CARTA DE APROVAÇÃO

Processo/ Process CEUA: 0769342/2021
Protocolo UEPG: 21.000060874-2

Título: Citogenética e genômica de peixes neotropicais: investigando questões evolutivas, funcionais e aplicadas à conservação das espécies

Interessado: Roberto Ferreira Artoni
e-mail: rfartoni@gmail.com
Data de Entrada: 29/10/2021
Resultado: Aprovado

Considerações

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Ponta Grossa (CEUA-UEPG) certifica que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa acima especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), estabelecida pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal. Dessa forma, fica autorizada a utilização de peixes teleósteos pertencentes aos grupos taxonômicos: *Astyanax* ou *Psalidodon* (lambaris); *Colossoma macropomum* (tambaqui); *Piaractus mesopotamicus* (pacu); *Loricariidae* (cascudos) dos gêneros *Ancistrus*, *Hypancistrus*, *Rhineloricaria* e *Steindachneridium melanodermatum* (suruvi-do-Iguaçu), sendo 360 peixes por espécie (180 machos e 180 fêmeas), para a execução desse projeto.

https://sei.uepg.br/sei/controlador.php?acao=documento_imprimir_web&acao_origem=arvore_visualizar&id_documento=907229&infra_sistema=... 1/2

ANEXO C - PROTOCOLO HIBRIDAÇÃO *IN SITU* FLUORESCENTE (FISH)

Baseado nos trabalhos de Pinkel; Straume e Gray (1986) e Yano; Bertollo e Cioffi (2017)

Dia 1

1. Coloque as lâminas para envelhecer na estufa por 1h ou mais tempo a 37°C.
2. Pegar 100 µl de 2× SSC, colocar em um tubo ependorphe de 1,5 ml e adicionar 1,5 µl de RNase 10 mg/ml (essa mistura é por lâmina). Homogeneizar e colocar 100 µl dessa mistura em cada lamínula. Em seguida coloque as lâminas sob as lamínulas cuidadosamente para que se formem poucas bolhas. Colocar as lâminas na caixa com papel umedecido em uma estufa a 37°C por 1 h e 30 min.
3. Enquanto as lâminas estão com RNase, colocar 1 ml de H₂O + 10 µl de HCl 0,1M em um ependorphe para aquecer na estufa a 37°C (deixar lá até o uso).
4. Terminado o tempo da RNase lavar as lâminas com 1× PBS por 5 min no shaker. Deixar a câmara úmida na estufa a 37°C. Nesse tempo adicionar 3µl de pepsina na solução de água + HCl, homogeneizar e colocar 100µl dessa solução em cada lamínula.
5. Colocar as lâminas recém saídas do PBS sob as lamínulas com pepsina. Incubar as lâminas na câmara úmida por 10min na estufa à 37°C.
6. Lavar as lâminas em 1× PBS por 5 min no shaker. Depois lave as lâminas com água destilada para remover o excesso de PBS.
7. **Serie alcoólica:** Colocar as lâminas em cada cubeta com álcool 70%, 85% e 100% por 2 min cada (não usar shaker). Deixar secar naturalmente (não usar a estufa a 37°C).
8. Enquanto as lâminas secassem, preparar o mix de hibridação misturando cada sonda (se for para microssatélites marcados, usar 2 µl por lâmina; se for outro tipo de sonda, calcular o volume para que fique 300 ng de sonda por lâmina) com o buffer de hibridação pH 7,0 até completar um volume de 20 µl (essas quantidades são por lâmina). Homogeneizar e desnaturar a 85°C por 10 min. Terminado o tempo, colocar imediatamente em gelo e preservar no escuro (no caso que as sondas já estejam marcadas).
9. Quando as lâminas estejam secas, coloca-las em Formamida 70%/30% 2× SSC (tempo variável segundo o objetivo: 3 min e 15 s se for para microssatélites, 5 min se for para outros tipos de sondas). Terminado o tempo, passar imediatamente para a cubeta com álcool 70% gelado por 2 min e depois segue a serie alcoólica 85%, 100% na temperatura ambiente por 2 min cada (não usar shaker). Deixar secar naturalmente.

10. Finalmente, pegar as lâminas tratadas e coloca-las sob as lâminas brancas. Homogeneizar o mix e colocar gotas sob os pontos de interesse nas lâminas (cuidado de não riscar com as ponteiros), e cobrir com lamínulas limpas. Incubar as lâminas na câmara úmida por um período em torno de 16h a 37°C (o tempo pode variar segundo os objetivos planejados).

Dia 2. Passos finais

OPCIONAL: Lavagens para aumentar a estringência

- A) Colocar duas cubetas com formamida 50%/2×SSC, duas com 2×SSC e duas com 4×SSCTween no banho de maria e esquentar até 42°C.
- B) Quanto atingir a temperatura, pegar a câmara úmida e colocar as lâminas em formamida 50%/2× SSC a 42°C por 30 min. Repetir o passo na outra cubeta.
- C) Colocar as lâminas em 2× SSC a 42°C por 30 min. Repetir o passo na outra cubeta.
- D) Colocar as lâminas em 4×SSCTween a 42°C por 30 min. Repetir o passo na outra cubeta.

De acordo com o tipo de FISH, proceder da seguinte forma:

Se a FISH é indireta:

Nota: se foram feitas lavagens de aumento de estringência, pular para passo 3.

1. Colocar 3 cubetas com 1× SSC no banho a 60°C. Quando atingir a temperatura lavar as lâminas 3 vezes no 1× SSC por 5 min no shaker. Enquanto isso, preparar o tampão 5% NFDM/4×SSC.
2. Lavar em solução 4×SSCTween no shaker a temperatura ambiente durante 5 min.
3. **Bloqueio:** Incubar as lâminas em tampão 5% NFDM/4×SSC por 15 minutos (não usar shaker). **Observação:** Antes de incubar alíquotar um endorphe com 1000 µl do tampão 5% NFDM/4×SSC.
4. Lavar as lâminas 2 vezes em solução 4×SSCTween no shaker a temperatura ambiente durante 5 min cada. Terminado o tempo, lave as lâminas com água destilada para remover o excesso de 4×SSCTween. Deixar secas as lâminas na temperatura ambiente. Durante esse tempo, limpar as lamínulas necessárias para a detecção de sondas.
5. **Detecção de sondas marcadas:** Preparar o mix de detecção (Nota: as quantidades abaixo são para 10 lâminas):

- a. **FISH uma sonda:** Se as marcações são com biotina, misturar 2 µl streptavidina Alexa flúor 488 conjugada + 998 µl NFDm. Se as marcações são com digoxigenina, misturar 5 µl Anti digoxi Rodamina + 995 µl NFDm.
- b. **Double FISH:** misturar 2 µl streptavidina Alexa flúor 488 conjugada + 5 µl Anti digoxi Rodamina + 993 µl NFDm.

Finalmente, colocar 100 µl do mix em cada lamínula, colocar as lâminas sob as lamínulas e incubar em câmara húmida e escura na estufa a 37°C por 1 h.

6. Lavar as lâminas 3 vezes durante 5 min em solução 4×SSCTween no shaker a temperatura ambiente.
7. Lavar as lâminas com 1× PBS por 1 min no shaker. Terminado o tempo, lave as lâminas com água destilada para remover o excesso de PBS.
8. **Serie alcoólica:** Colocar as lâminas em cada cubeta com álcool etílico 70%, 85% e 100% por 2 min cada (não usar shaker). Deixar secar naturalmente (não usar a estufa a 37°C).
9. Finalmente, pegar as lâminas tratadas e coloca-las sob as lâminas brancas. Pegar 20 µl do DAPI + antifade e colocar gotas sob os pontos de interesse nas lâminas, e cobrir com as lamínulas. Colocar as lâminas em uma caixa e armazenar no freezer até que sejam analisadas no microscópio de fluorescência.

Se a FISH é direta:

Nota: se foram feitas lavagens de estringência, pular para passo 3.

1. Colocar uma cubeta com 2× SSC no banho a 37°C. Quando atingir a temperatura pegar a câmara úmida e colocar as lâminas no 2× SSC por 5 min no shaker.
2. Lavar as lâminas com 4×SSCTween por 5 min no shaker.
3. Lavar as lâminas com 1× PBS por 1 min no shaker. Terminado o tempo, lave as lâminas com água destilada para remover o excesso de PBS.
4. **Serie alcoólica:** Colocar as lâminas em cada cubeta com álcool etílico 70%, 85% e 100% por 2 min cada (não usar shaker). Deixar secar naturalmente (não usar a estufa a 37°C).
5. Enquanto as lâminas secassem, limpar bem as lamínulas com álcool etílico 100%.
11. Finalmente, pegar as lâminas tratadas e coloca-las sob as lâminas brancas. Pegar 20 µl do DAPI + antifade e colocar gotas sob os pontos de interesse nas lâminas, e cobrir com as lamínulas. Colocar as lâminas em uma caixa e armazenar no freezer até que sejam analisadas no microscópio de fluorescência.