

ANA PAULA ALVES SILVA

HETEROMORFISMO CROMOSSÔMICO EM POPULAÇÕES DE *Geophagus
brasiliensis* (QUOY & GAIMARD, 1824)(TELEOSTEI: CICHLIDAE) DA BACIA
DO RIO DOCE, BRASIL.

Dissertação apresentada a
Universidade Federal de Viçosa, como
parte da exigência do Programa de
Pós-Graduação em Genética e
Melhoramento, para obtenção do título
de *Magister Scientiae*

VIÇOSA
MINAS GERAIS- BRASIL
2012

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

S586h
2012

Silva, Ana Paula Alves, 1987-
Heteromorfismo cromossômico em populações de
Geophagus brasiliensis (Quoy & Gaimard, 1824) (Teleostei:
Cichlidae) da Bacia do Rio Doce, Brasil / Ana Paula Alves
Silva. – Viçosa, MG, 2012.
ix, 27f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui anexo.

Orientador: Jorge Abdala Dergam dos Santos.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 17-22

1. *Geophagus brasiliensis*. 2. Peixe de água doce.
3. Citogenética. 4. Polimorfismo (Genética). I. Universidade
Federal de Viçosa. II. Título.

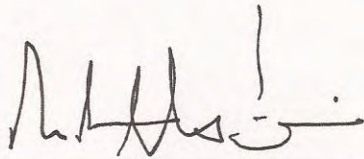
CDD 22. ed. 639.3774

ANA PAULA ALVES SILVA

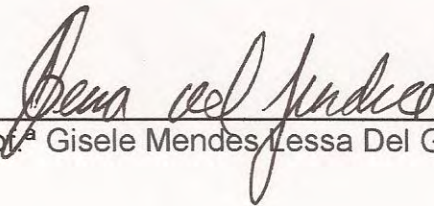
HETEROMORFISMO CROMOSSÔMICO EM POPULAÇÕES DE *Geophagus
brasiliensis* (QUOY & GAIMARD, 1824)(TELEOSTEI: CICHLIDAE) DA BACIA
DO RIO DOCE, BRASIL.

Dissertação apresentada a
Universidade Federal de Viçosa, como
parte da exigência do Programa de
Pós-Graduação em Genética e
Melhoramento, para obtenção do título
de *Magister Scientiae*

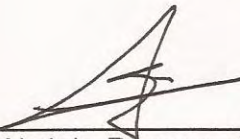
APROVADA: 23 de Julho de 2012



Prof. Renato Neves Feio



Prof.ª Gisele Mendes Lessa Del Giudice



Prof. Jorge Abdala Dergam dos Santos
(Orientador)

*“Nunca se afaste de seus sonhos, pois se eles se forem, você continuará vivendo,
mas terá deixado de existir.”*
(Charles Chaplin)

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me iluminar durante todo o caminho dessa conquista;

À minha família, por me apoiar e me compreender quando não pude passar as férias com eles;

Ao meu namorado, pelo apoio, carinho e incentivo;

Aos meus amigos, por estarem ao meu lado durante todos os momentos;

Ao meu orientador, Jorge Dergam, por ajudar-me na formação acadêmica;

Aos meus colegas do Beagle (Laboratório de Sistemática Molecular), os atuais e os antigos, pelas ajudas nas técnicas, discussões e pelos momentos de descontração;

Ao Anderson Fernandes, pela ajuda nas técnicas e interpretação dos dados;

Aos órgãos financiadores de pesquisa;

Aos *Geophagus brasiliensis*, que deram suas vidas pra que esse trabalho fosse realizado;

Aos membros da banca, pela gentileza de participar dessa árdua tarefa;

À Prof.^a Sílvia Pompolo, por permitir o uso do foto-microscópio;

E a todos que me ajudaram direto e indiretamente na produção desse trabalho.

SUMÁRIO

Lista de Tabela	v
Lista de Figura	v
Resumo	vi
Abstract	viii
Introdução.....	1
Material e métodos	2
Resultados.....	4
Discussão.....	9
Referências.....	17
Anexo: Detalhamento dos Protocolos.....	23

LISTA DE TABELAS

- Tabela I:** Resumo de dados e resultados de *Geophagus brasiliensis* para este trabalho (CG=coordenadas geográficas; NORs=regiões organizadoras de nucléolo; GL= grau de liberdade).....3
- Tabela II:** Resumo de resultados encontrados para o primeiro par cromossômico de *G. brasiliensis* da bacia do rio Doce..... 8

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Bacia do rio Doce e locais de coletas: 1 - Candonga, 2 – Córrego Latão, 3 – Lagoa Aguapé, 4 – Lagoa Cristal, 5 – Lagoa Lingüiça, 6 – Rio Santo Antônio.....4
- Figura 2:** Coloração convencional com Giemsa dos cariótipos 1 (A), cariótipo 2 (B), cariótipo 3 (C) e cariótipo (D) encontrados em *G. brasiliensis* na bacia do Rio Doce6
- Figura 3:** Bandeamento C dos cariótipos 1 (A), cariótipo 2 (B), cariótipo 3 (C) e cariótipo (D) encontrados em *G. brasiliensis* na bacia do Rio Doce.....7
- Figura 4:** Idiogramas do primeiro par cromossômico encontrado em *G. brasiliensis* da bacia do rio Doce8
- Figura 5:** Número máximo de regiões organizadoras de nucléolos e sítios de 18S e 5S encontrados em cada ponto coletado na bacia do rio Doce para *G. brasiliensis*.....9
- Figura 6:** Esquema da formação do Cromossomo A, a partir de rearranjos no cromossomo D em *G. brasiliensis* da bacia do rio Doce.....11
- Figura 7:** Esquema da formação do Cromossomo E, onde a catraca de Muller e a seleção de fundo causam a degeneração cromossomal em *G. brasiliensis* da bacia do rio Doce.....12
- Figura 8:** Esquema da formação do Cromossomo B, a partir do cromossomo A já afetado pela compensação de dosagem em *G. brasiliensis* da bacia do rio Doce.....13
- Figura 9:** Esquema da formação dos cromossomos C e F em *G. brasiliensis* da bacia do rio Doce. Consequência de um crossing-over desigual e a formação de gametas aneuploides e diploides para determinados alelos.....15

RESUMO

SILVA, Ana Paula Alves, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2012. **HETEROMORFISMO CROMOSSÔMICO EM POPULAÇÕES DE *Geophagus brasiliensis* (QUOY & GAIMARD, 1824) (TELEOSTEI: CICHLIDAE) DA BACIA DO RIO DOCE, BRASIL.** Orientador: Jorge Abdala Dergam dos Santos. Coorientador: Rubens Pazza e Karine Frehner Kavalco

A análise cariotípica de *Geophagus brasiliensis* (Quoy & Gaimard, 1824) foi realizada em 81 espécimes de seis localidades da bacia do rio Doce. Foram usadas as técnicas de coloração convencional com Giemsa, bandeamento NORs, bandeamento C e hibridização *in situ* (FISH) com sondas rDNA 18s e rDNA 5S. O número diplóide foi de $2n=48$ cromossomos, com variação do número fundamental entre 50-52. Foram observados quatro diferentes cariótipos, com base em heteromorfismos apresentados pelo primeiro par cromossômico e não foram associados ao sexo, à NOR nem ao local de coleta. Esse heteromorfismo está relacionado com diferenças de razão de braços, o que acarretou variações nas fórmulas cariotípicas encontradas ($3sm+18st+26t$; $2sm+20st+26t$; $4sm+18st+26t$). Este heteromorfismo pode estar relacionado com rearranjos cromossômicos, como inversões pericentroméricas, deleções, e crossing-over desiguais, as quais, associadas a outros processos, como catraca de Muller, seleção de fundo e compensação de dosagem, determinaram a alteração do tamanho de alguns cromossomos. O número de NORs observadas teve variações intra e inter-individuais, contudo a maioria dos indivíduos apresentou marcações em mais de um par cromossômico, uma característica única das populações de *G. brasiliensis* da bacia do rio Doce. A sonda de rDNA 18S confirmou a presença de NORs em mais de dois cromossomos. A localização da sonda de rDNA 5S manteve-se conservada em todas as amostras, marcando par de cromossomos telocêntricos. Os blocos de heterocromatina ocorreram predominantemente nas regiões centroméricas/pericentromérica, sendo essa uma característica da família Cichlidae. Blocos de heterocromatina em regiões intersticiais foram observados em dois pares de cromossomos. A presença de dois subtlocêntricos apresentando seus braços menores totalmente heterocromáticos é uma característica diagnóstica das populações da bacia do rio Doce. Conclui-se que as populações de *G. brasiliensis* da bacia do rio Doce apresentam

características únicas, associadas à existência de quatro configurações do primeiro par cromossômico e aos diferentes resultados obtidas nas técnicas de bandeamento realizadas. Os resultados também sugerem uma viabilidade diferenciada das variáveis cromossômicas descritas nesse trabalho.

ABSTRACT

SILVA, Ana Paula Alves, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2012. **CHROMOSOME HETEROMORPHISM IN *Geophagus brasiliensis* (QUOY & GAIMARD, 1824) (TELEOSTEI: CICHLIDAE) POPULATION FROM DOCE RIVER BASIN, BRAZIL.** Adviser: Jorge Abdala Dergam dos Santos. Co-Adviser: Rubens Pazza and Karine Frehner Kavalco

Karyological analysis of *Geophagus brasiliensis* (Quoy and Gaimard, 1824) was performed on 81 specimens from six localities, three geologically recent lakes and three stream collection sites. Techniques included conventional staining with Giemsa, NOR banding, C-banding and *in situ* hybridization (FISH) with 5S rDNA and 18s rDNA probes. The diploid number was $2n = 48$ chromosomes, and fundamental number varied between 50-52. We observed four different karyotypes, based on heteromorphisms presented by the first chromosome pair and were not related to sex, NOR location or collection site. This heteromorphism is related to differences in the ratio arms, which led to variations in the karyotypic formulae (3sm +18 st +26 t; 2sm +20 st +26 t; 4sm +18 st +26 t). This heteromorphism may be related to chromosome rearrangements, such as pericentromeric inversions, deletions, and unequal crossing-over, which together with other processes, such as Muller's ratchet, background selection and dosage compensation caused size alterations in some chromosomes. The number of NORs varied within and between specimens, however most individuals had NOR bands in more than one chromosome pair, a distinctive feature of the Doce River populations. The 18S rDNA probe confirmed the presence of NORs in more than two chromosomes. The location of the 5S rDNA probe remained conserved in all samples, marking a pair of chromosomes. The heterochromatin blocks occurred predominantly in the centromeric / pericentromeric chromosomes, and this a characteristic of the Cichlidae family. Heterochromatin blocks in interstitial regions were observed in two pairs of chromosomes. The presence of two subtelocentric chromosomes, with fully heterochromatic small arms is a diagnostic feature of the populations of the Doce River Basin. We conclude that the populations of *G. brasiliensis* of the Rio Doce Basin present unique characteristics, as evidenced by four configurations of the first pair of chromosomes and different results obtained by

banding techniques. Results suggest differential viability of the chromosomal variations described in this study.

HETEROMOSFISMO CROMOSSÔMICO EM POPULAÇÕES DE *Geophagus brasiliensis* (QUOY & GAIMARD, 1924) (TELEOSTEI: CICHLIDAE) DA BACIA DO RIO DOCE, BRASIL.

Introdução

Com mais de 1300 espécies, a família Cichlidae é uma das mais ricas famílias de vertebrados, somente Gobiidae (com 1875 espécies) e Cyprinidae (com 2010 espécies) competem pela posição de maior família (Kullander, 2003; Kullander, 1998). Sua distribuição é ampla, ocorrendo na América do Sul e Central, parte da Ásia e América do Norte, África (Madagascar) e Índia (Kullander, 2003; Moyle & Junior Cech, 2000).

Os ciclídeos neotropicais não apresentam a mesma diversidade em relação aos africanos, todavia possuem grandes variações morfológicas, comportamentais e ecológicas (Nelson, 2006). Hoje, existem 450 espécies descritas para o neotrópico, mas somente 106 espécies tem sido citogeneticamente analisadas (Feldberg *et al.*, 2003).

Uma das espécies de ciclídeo que possui ampla distribuição nas bacias hidrográficas brasileiras é o *Geophagus brasiliensis*, popularmente conhecido como “acará”. A primeira descrição cariotípica dessa espécie foi realizada por Michele e Takahashi (1977). Desde então, outras populações de diferentes localidades foram analisadas, todas elas mostraram número diploide igual a 48 cromossomos, mas as morfologias cromossômicas variaram apresentando número fundamental entre 50 e 56 (Feldberg *et al.*, 2003).

O objetivo do presente estudo é realizar a análise citogenética da população de *G. brasiliensis* da bacia do médio Rio Doce, usando técnica de coloração convencional com Giemsa e de bandeamento. Estudos citogenéticos realizados em populações de traíra *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) do sistema lacustre do médio Rio Doce sugerem que essa bacia pode também ter favorecido a diferenciação genética de *G. brasiliensis*.

Material e Métodos

Oitenta e um espécimes de *G. brasiliensis* foram coletados em 6 diferentes localidades da bacia do rio Doce, sendo três lagoas e três calhas (Figura 1).

A preparação dos cromossomos mitóticos foi obtida a partir do rim anterior de acordo com a técnica convencional de Bertollo *et al.* (1978). A morfologia cromossômica foi baseada na razão dos braços (RB) e os cromossomos foram classificados em metacêntrico (m), submetacêntrico (sm), subtelocêntricos (st) e telocêntricos (t) segundo Levan *et al.* (1964). O número fundamental foi estimado considerando os metacêntricos e submetacêntricos com dois braços e os subtelocêntricos e telocêntricos com um braço.

Regiões organizadoras de nucléolos (NORs) foram identificadas por impregnação por nitrato de prata de acordo com Howell e Black (1980). Regiões de heterocromatina constitutiva foram localizadas utilizando hidróxido de bário, seguindo Sumner (1972). A localização cromossomal de cistrons ribossomais foram realizadas através da hibridização *in situ* (FISH) (PINKEL, *et al.* 1986), usando sonda de rDNA 18S (HATANAKA and GALETTI JR., 2004) e 5S (MARTINS and GALETTI JR., 1999). Todas as técnicas realizadas foram ajustadas para a espécie estudada.

As metáfases foram fotografadas em microscópio Olympus™ BX60 com uma objetiva de 100x, ligado à uma câmera CCD (Optronics, modelo DEI-470) e os cariótipos montados e tratados em Adobe Photoshop® CS5. Foi utilizado o Image-Pro® Plus Versão 3.1 (Media Cybernetics, 1998), para a aferição das medidas dos cromossomos para sua classificação.

Tabela I: Resumo de dados e resultados de *Geophagus brasiliensis* para este trabalho (CG=coordenadas geográficas; NORs=regiões organizadoras de nucléolo; GL= grau de liberdade);

Localidades	CG	Número amostral	Composição Cariotípica	Frequência Cariotípica (%)	Varição das NORs (mais Frequente)	rDNA 18S	P-valor (GL)
Candongá	20°12'17,97"S 42°50'42,81" W	8 machos/ 16 fêmeas	Cariótipo 1 Cariótipo 2 Cariótipo 3	14,29 57,14 28,57	2-4 (2)	5	0,021 (10)
Córrego Latão	20°51'32,78"S 42°47'51,63" W	5 machos/ 4 fêmeas	Cariótipo 1 Cariótipo 2 Cariótipo 3 Cariótipo 4	12,5 25 25 37,5	Sem variação (3)	4	0,0064 (15)
Lagoa Aguapé	19°50'44,27"S 42°38'45,58"W	4 machos/ 5 fêmeas	Cariótipo 1 Cariótipo 2 Cariótipo 3 Cariótipo 4	16,67 16,67 50,0 16,67	3-5 (3)	6	0,022 (15)
Lagoa Cristal	19°45'32,44"S 42°37'15,54"O	3 machos/ 2 fêmeas	Cariótipo 1 Cariótipo 2 Cariótipo 4	0,2 0,2 0,6	Sem variação (2)	2	0,1 (6)
Lagoa Linguíça	19°33'16,97"S 42°29'44,49"W	14 machos/ 7 fêmeas	Cariótipo 1 Cariótipo 3 Cariótipo 4	9,1 45,45 45,45	2-4 (3)	4	7,39 x 10 ⁻⁸ (6)
Rio Santo Antônio	19°13'55,05"S 43°01'16,21"W	9 machos/9 fêmeas	Cariótipo 1 Cariótipo 2 Cariótipo 3 Cariótipo 4	28,57 14,29 28,57 28,57	2-3 (2)	4	0,022 (15)

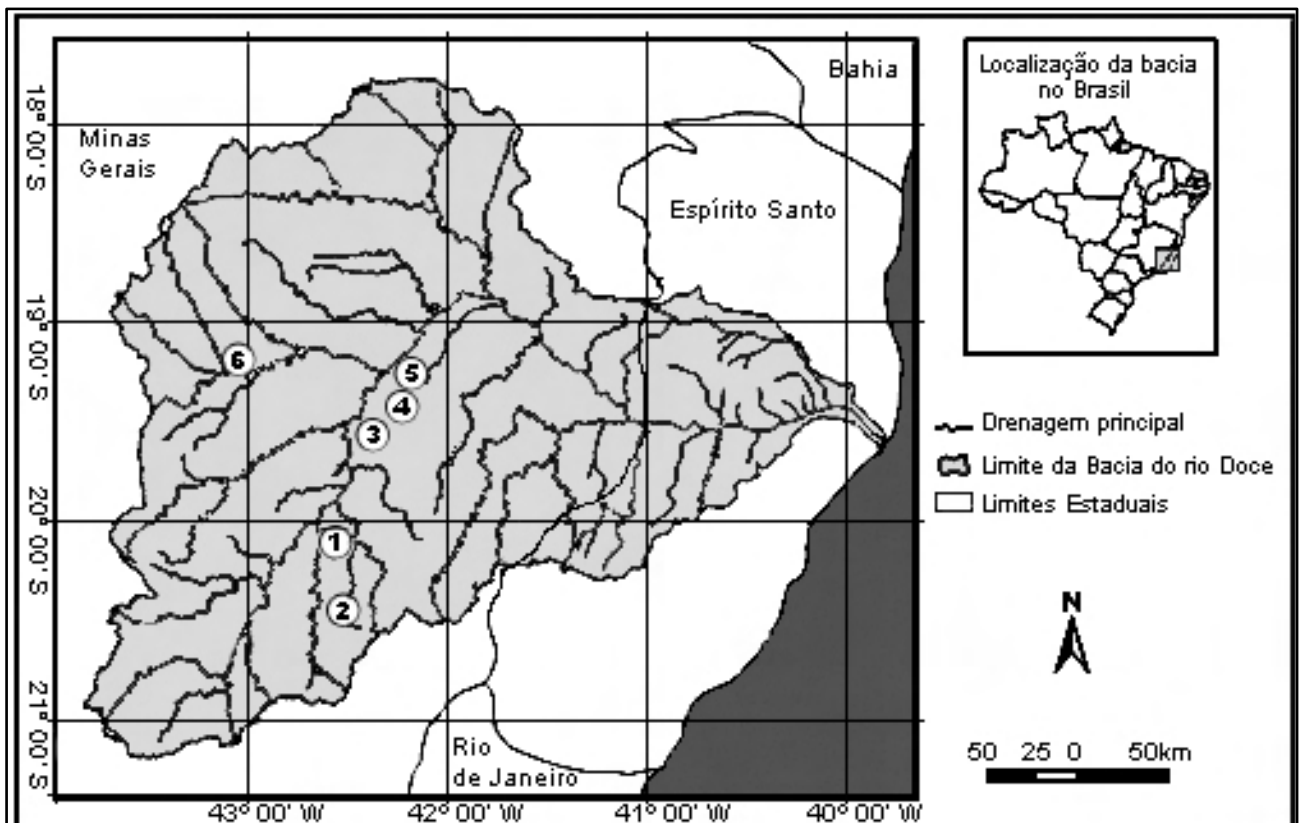


Figura 1: Bacia do rio Doce e locais de coletas: 1 - Candonga, 2 – Córrego Latão, 3 – Lagoa Aguapé, 4 – Lagoa Cristal, 5 – Lagoa Lingüiça, 6 – Rio Santo Antônio;

Foram realizados testes de χ^2 em todas as localidades estudadas para verificar se as populações estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg, em relação aos diferentes cromossomos encontrados no primeiro par cromossômico. Foi utilizado o valor de $\alpha=5\%$. As hipóteses testadas foram às seguintes:

H_0 : A população está em equilíbrio de Hardy-Weinberg, em relação aos diferentes cromossomos encontrados no primeiro par cromossômico;

H_1 : A população não está em equilíbrio de Hardy-Weinberg, em relação aos diferentes cromossomos encontrados no primeiro par cromossômico;

Resultados

Todos os espécimes de *G. brasiliensis* apresentaram número diplóide constante e igual a 48 cromossomos. O número fundamental variou entre 50 e 52, com base nas diferenças morfológicas encontradas no par cromossômico 1 (Tabela I e II). Assim, foram observadas três fórmulas cariotípicas que diferem no número de submetacêntricos presentes (2 – 4) (Figura 2).

Foram identificados quatro cariótipos, com base na morfologia do par cromossômico 1 (Figura 3). Dentro do primeiro par, o primeiro cromossomo apresentou quatro diferentes morfologias, uma delas foi o cromossomo subtelocêntrico denominado cromossomo B, com relação de braços 5,6. As três restantes foram classificadas como submetacêntricas e representadas pelos cromossomos A, C e D. Apesar de serem submetacêntricos, estes cromossomos diferem quanto aos valores das razões de braços (1,82; 2,85 e 2,44, respectivamente). Dentro do primeiro par, o segundo cromossomo apresentou menor número de variação, mostrando três morfologias distintas. O cromossomo E foi classificado como subtelocêntrico, sendo seu RB igual à 4,33 e o F foi um submetacêntrico com RB igual à 2,27(Figura 3). O teste de χ^2 mostrou que todas as localidades estudadas não estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg, exceto para a lagoa Cristal (Tabela I).

As NORs apresentaram variação numéricas intra e inter-populacional, mas ocorreram somente nas regiões terminais dos braços curtos de cromossomos subtelocêntricos, com ausência de heteromorfismo (Figuras 4). A hibridização *in situ* com a sonda 18S mostrou a presença de cistrons ribossomais no braço curto de cromossomos subtelocêntricos, de forma coincidente com as NORs, exceto em duas localidades que apresentaram o número de marcações de 18S maior que o número de NORs (Figura2). Os sítios de rDNA 5S foram localizadas na região intersticial de um par de cromossomos subtelocêntrico em todos os indivíduos analisados (Figura 4).

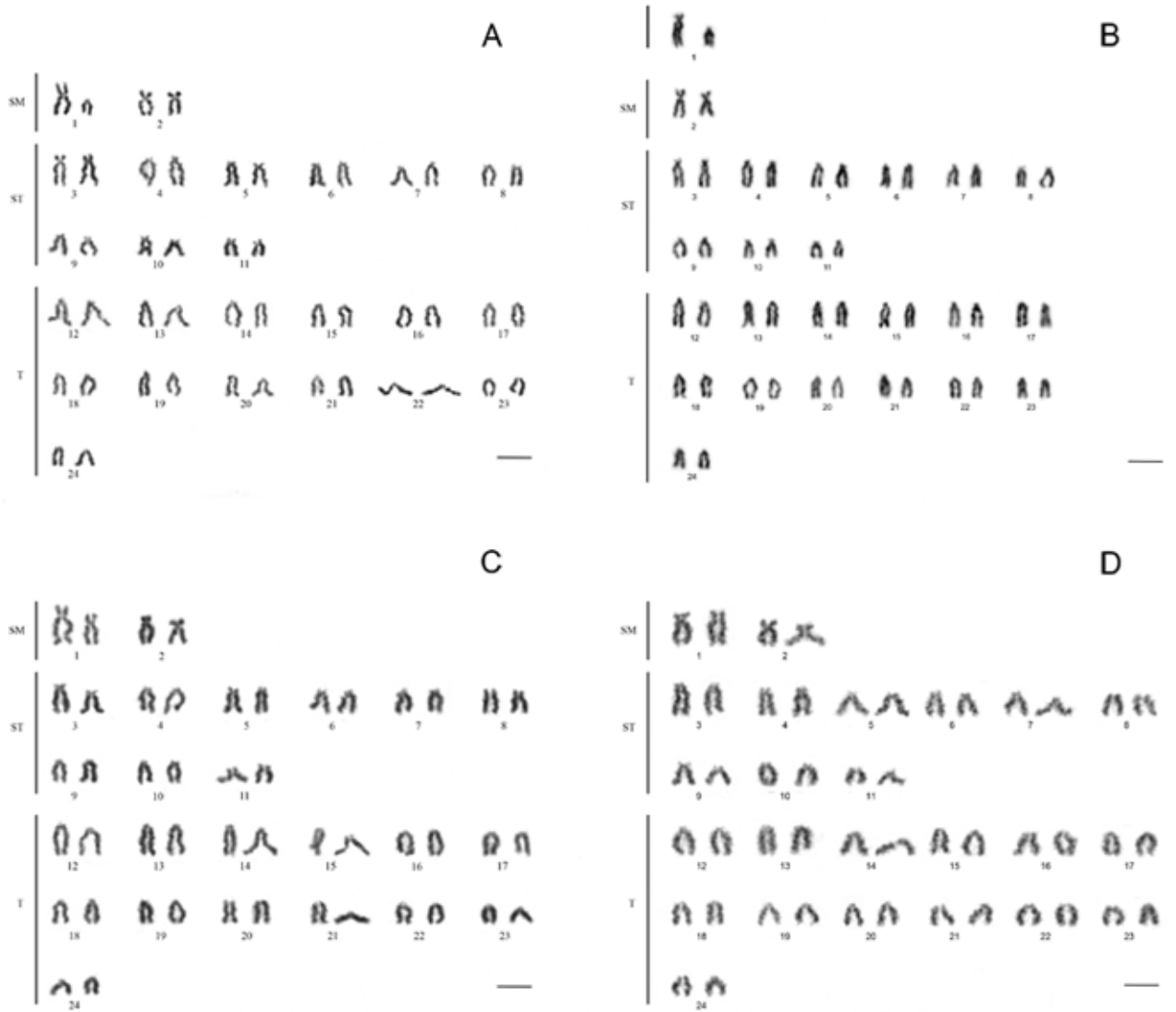


Figura 2: Coloração convencional com Giemsa dos cariótipos 1 (A), cariótipo 2 (B), cariótipo 3 (C) e cariótipo (D) encontrados em *G. brasiliensis* na bacia do Rio Doce;

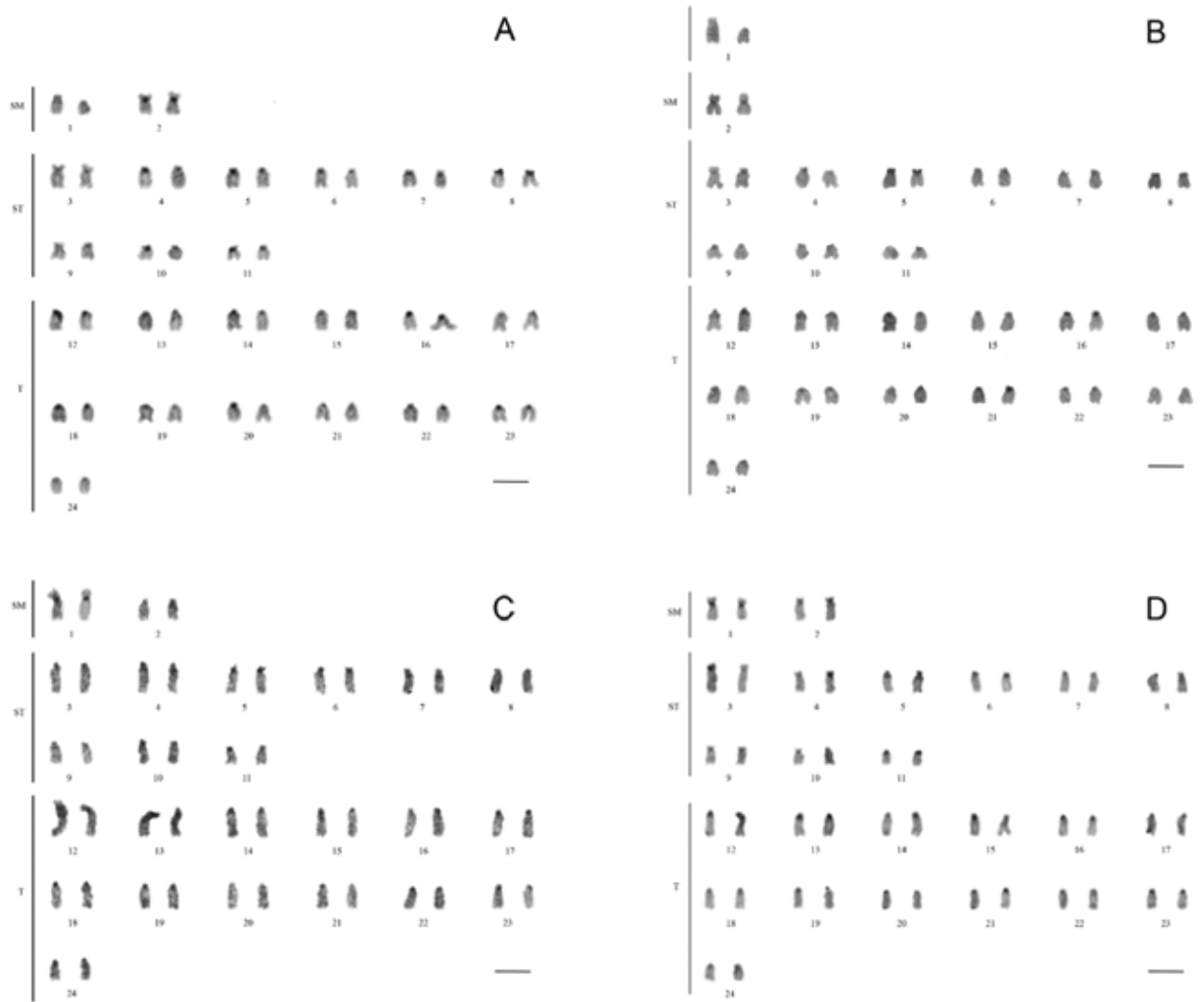


Figura 3: Bandeamento C dos cariótipos 1 (A), cariótipo 2 (B), cariótipo 3 (C) e cariótipo (D) encontrados em *G. brasiliensis* na bacia do Rio Doce;

Tabela II: Resumo de resultados encontrados para o primeiro par cromossômico de *G. brasiliensis* da bacia do rio Doce;

Cariótipos	Composição do 1º par	Fórmula Cariotípica	NF	Frequência Total (%)
Cariótipo 1 (AE)	sm + st	3 sm + 18 st + 26 t	51	16,28
Cariótipo 2 (BE)	st + st	2 sm + 20 st + 26 t	50	20,93
Cariótipo 3 (CF)	sm + sm	4 sm + 18 st + 26 t	52	30,23
Cariótipo 4 (DD)	sm + sm	4 sm + 18 st + 26t	52	32,56

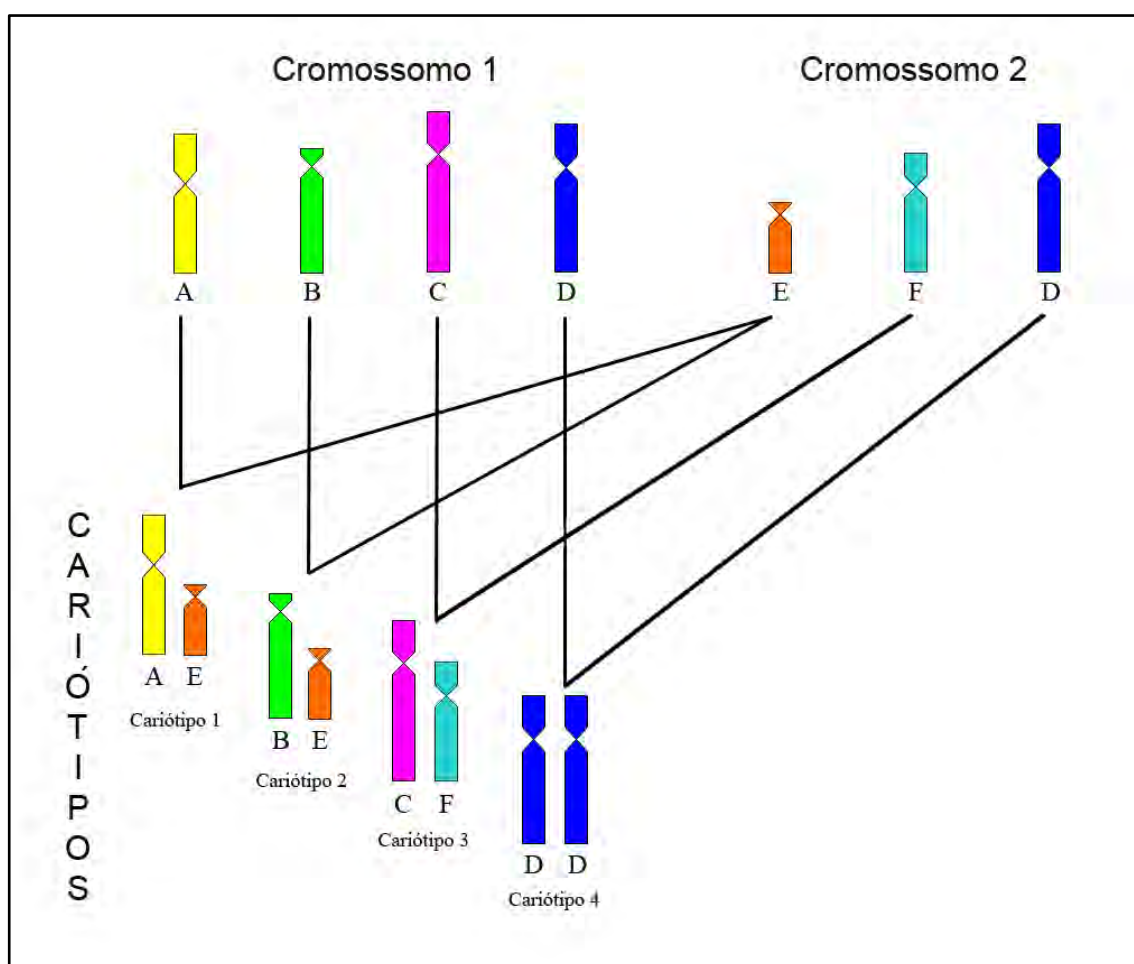


Figura 4: Idiogramas do primeiro par cromossômico encontrado em *G. brasiliensis* da bacia do rio Doce;

A heterocromatina evidenciada pelo bandeamento C ocorreu preferencialmente nas regiões centroméricas/pericentroméricas de todos os

cromossomos. Dois pares de subtelocêntricos apresentaram uma banda heterocromática em sua região intersticial e todo o braço curto de outro par de subtelocêntricos se mostrou heterocromático (Figura 2).

	NORs	18S	5S
Lagoa Aguapé			
Candonga			
Córrego Latão			
Lagoa Linguíça			
Rio Santo Antônio			
Lagoa Cristal			

Figura 5: Número máximo de regiões organizadoras de nucléolos e sítios de 18S e 5S encontrados em cada ponto coletado na bacia do rio Doce para *G. brasiliensis*;

Discussão

Dentro da família Cichlidae, a distribuição geográfica do número diplóide é considerada bimodal: os ciclídeos africanos apresentam moda $2N=44$ cromossomos com variação entre 32 a 48, enquanto que os ciclídeos neotropicos apresentam o número diplóide modal $2n = 48$ cromossomos, com variação entre 38 a 60 (Feldberg *et al.*, 2003). O cariótipo apresentando $2n=48$ cromossomos telocêntricos, conseqüentemente $NF=48$, é considerado como uma característica basal dessa família (Galetti Jr. *et al.*, 2000). De acordo com o número cromossômico a população de *G. brasiliensis*, aqui estudada pode ser considerada conservada. A variação do NF (50-52) na população em estudo foi coerente com o descrito para outras populações de *G. brasiliensis* (Feldberg *et al.*, 2003). Variações de NF diferentes a 48 em *G. brasiliensis* e em outros ciclídeos neotropicos são consideradas como consequência de

inversões pericentroméricas (Thompson, 1979; Feldberg & Bertollo, 1985, Feldberg *et al.*, 2003).

As fórmulas cariotípicas elucidadas neste trabalho já foram descritas para outras populações (Feldberg & Bertollo, 1985; Thompson, 1979; Michele e Takahashi, 1977). A fórmula $3\ m/sm + 43\ st/t$, descrita por Michele e Takahashi (1977) foi considerada por aqueles autores como evidência de um sistema de cromossomos sexuais. Porém, essa interpretação não foi aceita, por ser considerado um artefato dado pela sobreposição de cromossomos na foto original (Thompson, 1979) ou por um heteromorfismo no tamanho das NORs (Feldberg & Bertollo, 1985).

A ocorrência de mais de um cariótipo dentro de uma mesma bacia nunca foi descrita para outras bacias. Entretanto, para outras espécies da bacia do rio Doce já foi indicada a ocorrência de simpatria de diferentes cariótipos, como em *Hoplias malabaricus*, a qual apresenta dois citótipos em simpatria nas lagoas Carioca (Ferreira *et al.*, 1989) e Marola (Jacobina *et al.*, 2011). A origem desses citótipos ainda não foi elucidada, embora o papel da heterocromatina na diferenciação dos cromossomos sexuais foi esclarecido (Cioffi *et al.*, 2012).

Na bacia do rio Doce, a diferenciação cromossômica encontrada no par 1 de *G. brasiliensis* não foi relacionada com o sexo, com heteromorfismo de NORs, com heterocromatina, nem com a distribuição geográfica. O cariótipo 4 apresenta a maior frequência dentro da população estudada, é o único que aparece em homozigose e assemelha-se ao par equivalente em outras populações neotropicais de *G. brasiliensis* (Feldberg *et al.*, 2003). Por esses motivos, é assumido neste estudo como a configuração mais primitiva. Consequentemente, as outras morfologias do primeiro par cromossômico teriam surgido por rearranjos ocorridos em cromossomo D. A análise estatística das frequências dos quatro cariótipos nos locais de coleta e na bacia mostrou que elas não estão em equilíbrio Hardy-Weinberg (Tabela I), exceto para a lagoa Cristal. As causas prováveis desse desequilíbrio podem estar relacionadas com uma série de fatores associados à origem dos diferentes configurações cromossômicas. Essa exceção dada à lagoa Cristal pode ter ocorrido devido ao baixo número amostral dessa lagoa. Em trabalhos envolvendo grandes números de classes a realização de uma amostragem satisfatória é um desafio (Baverstock e Moritz, 1996).

O cromossomo A teria surgido a partir de uma inversão pericentromérica, somada a uma pequena deleção (Figura 4). Esses rearranjos resultaram numa razão de braço (RB) diferente do ancestral (D), mantendo a mesma classificação morfológica (metacêntrico). Os indivíduos heterozigotos, por um ou mais tipos de rearranjos, podem ter um desbalanceamento no sistema meiótico e perda de fertilidade (White, 1973; King, 1987, Rieseberg, 2001), embora existam mecanismos de compensação (Navarro e Barton, 2003). Mas provavelmente, o pareamento dos cromossomos A e D, assim com a homozigose de A, era possível no passado, tornando-se, atualmente, inviável em decorrência da compensação de dosagem ocorrida durante a formação do cromossomo E (Marín *et al.*, 2000; Charlesworth, 1996; Kaiser e Charlesworth, 2010).

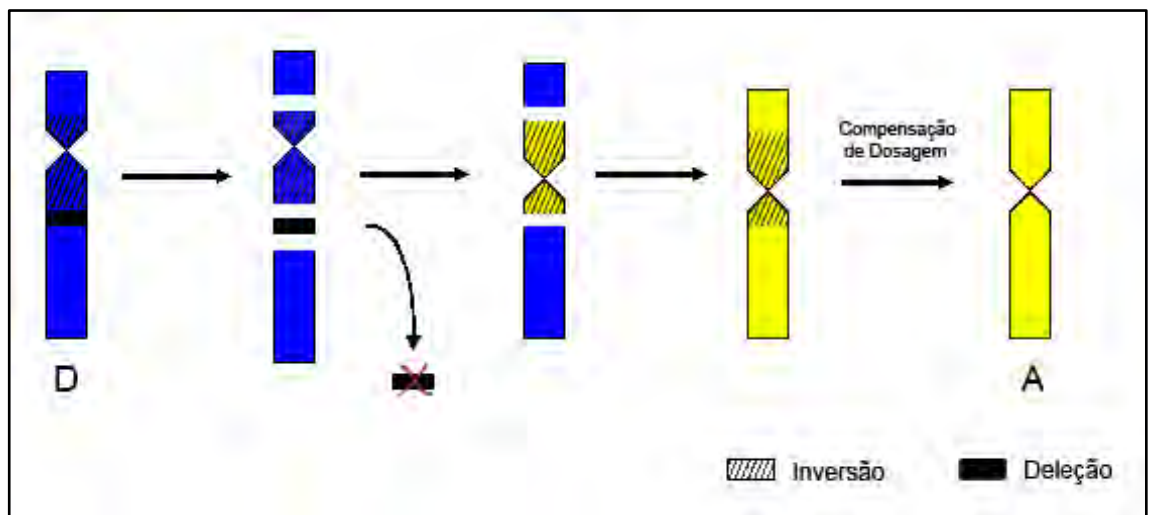


Figura 6: Esquema da formação do Cromossomo A, a partir de rearranjos no cromossomo D em *G.brasiliensis* da bacia do rio Doce;

O cromossomo E, presente nos cariótipos 1 e 2, apresenta um tamanho muito inferior aos demais descritos para o par cromossômico 1, indicando perda de uma grande parte de seus genes, considerando que todos eles apresentaram um padrão estável de Banda C. O encurtamento do cromossomo pode ter ocorrido de forma semelhante ao processo de diferenciação dos cromossomos Y e W dos sistemas sexuais (Charlesworth and Charlesworth, 2000; Kaiser and Charlesworth, 2010). O efeito mais relevante das inversões é a diminuição ou eliminação das recombinações (crossing-over) nas regiões afetadas (Coyne, 1993). A eliminação posterior de fragmentos cromossômicos poderia ocorrer através da catraca de Muller (*Muller's ratchet*) e seleção de

fundo (*Background selection*) (Muller, 1964; Charlesworth *et al.* 1993; Charlesworth and Charlesworth, 2000) (Figura 5).

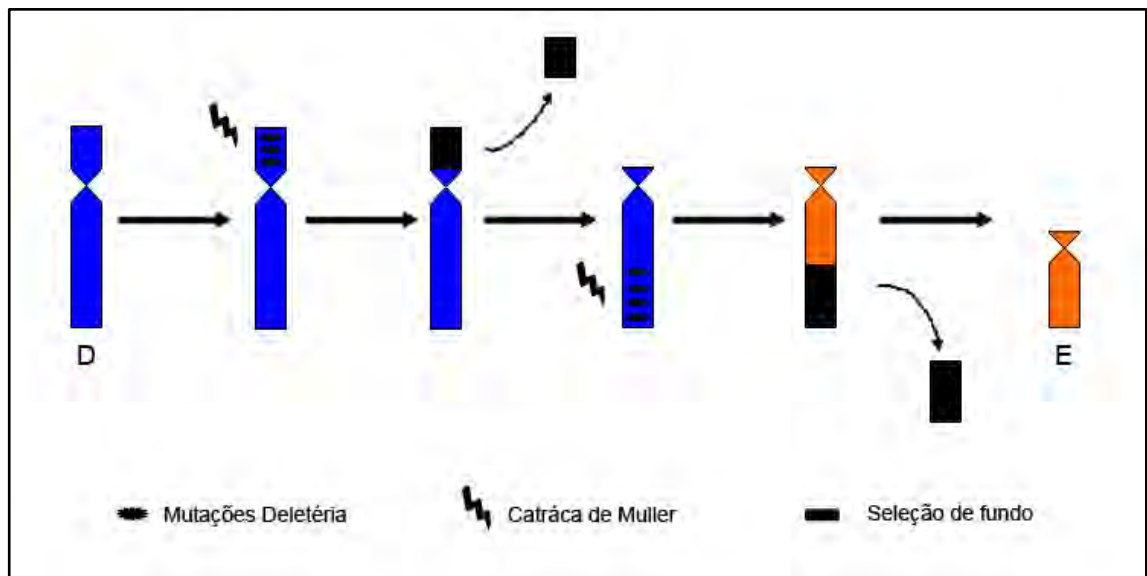


Figura 7: Esquema da formação do Cromossomo E, onde a catraca de Muller e a seleção de fundo causam a degeneração cromossomal em *G. brasiliensis* da bacia do rio Doce;

Na sua formulação original, a catraca de Muller consiste no acúmulo de mutações deletérias que podem conduzir a extinção de populações assexuadas (Butcher, 1995), por outro lado, o acúmulo de mutações pode ser revertido devido à ocorrência do processo de recombinação em espécies com reprodução sexuada (Charlesworth and Charlesworth, 2000). A existência deste processo poderia ser também aplicada aos efeitos de isolamento de regiões cromossômicas rearranjadas. Com isso, podemos concluir que os rearranjos ocorridos na formação do cromossomo A teve como consequência a interrupção de sua recombinação com seu antigo par, cromossomo D. A falta de recombinação pode resultar no acúmulo de pseudogenes, permitindo a ação da seleção de fundo, sendo aquela região rapidamente eliminada da população (Charlesworth *et al.* 1993). Simultaneamente à degeneração do cromossomo E, acontece um processo chamado compensação de dosagem. No cariótipo AE o encurtamento do cromossomo E poderia estar associado ao aumento do nível de expressão dos genes ligados ao cromossomo A. Esse processo também é proposto na formação dos sistemas sexuais heterogaméticos (Marín *et al.*, 2000; Charlesworth, 1996; Kaiser and Charlesworth, 2010).

A ausência de homozigotos EE no primeiro par sugere que o processo de encurtamento e perda de material genético tornou letal a ocorrência deles.

Da mesma forma, a ausência de homozigotos AA poderia ser explicado por um excesso de atividade transcricional no homozigoto e a ausência de um sistema de inativação de um dos membros do par, semelhante ao observado no cromossomo X do sistema sexual de mamíferos (Goto e Monk, 1998; Puck e Willard 1998; Nguyen e Disteché, 2006; Augui et al., 2011). As características transcricionais do cromossomo A permitiriam sua combinação apenas com o cromossomo E.

O cromossomo B é, provavelmente, o único que não derivou diretamente do cromossomo ancestral (D), tendo surgido a partir de novos rearranjos (inversão pericentromérica e deleção) no cromossomo A (Figura 7). Conseqüentemente, o cromossomo B também possui efeitos da compensação de dosagem nas suas taxas transcricionais. A chance que a segunda inversão acontecesse no cromossomo A poderia ser muito alta se a seleção estivesse favorecendo a inversão (Kirkpatrick e Barton, 2000). A ocorrência de várias inversões em um mesmo cromossomo é encontrada em outras espécies, por exemplo, em uma população natural de *Drosophila melânica*, onde foram encontradas 22 inversões, sendo 16 delas presentes no cromossomo II (Ward, 1952). Como consequência da compensação de dosagem, assim como acontece no cromossomo A, o cromossomo B é letal quando em homozigose ou combinado com outro cromossomo morfologicamente diferente do E.

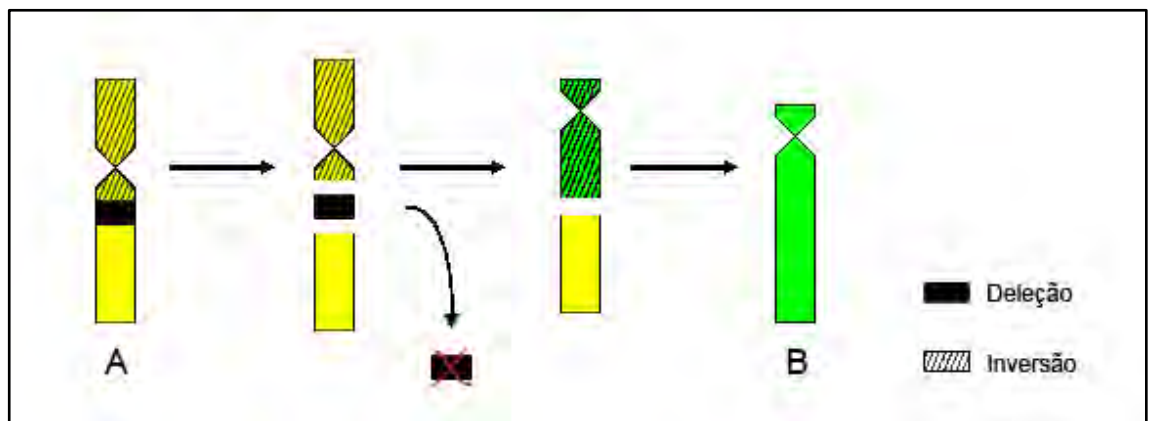


Figura 8: Esquema da formação do Cromossomo B, a partir do cromossomo A já afetado pela compensação de dosagem em *G.brasiliensis* da bacia do rio Doce;

Os cromossomos C e F são os constituintes do par cromossômico 1 do cariótipo 3. Eles podem ter se originado de um crossing-over desigual entre dois cromossomos homólogos D (Figura 8). A ocorrência desse rearranjo causa uma baixa de fertilidade, pois uma das cromátides envolvidas apresenta um conjunto de alelos duplicados, enquanto na outra esse conjunto está

ausente (White, 1954, 1978). Isso explica a ausência de indivíduos adultos apresentando homozigose dos cromossomos C e F, pois os zigotos formados pela união de dois gametas iguais contendo ou a cromátide C ou a cromátide F seriam triploides ou haploides, respectivamente, para alguns alelos e isso seria letal para o zigoto. O mesmo acontece quando existe a fusão desses gametas com os de outros cariótipos. Portanto, é possível que exista uma barreira reprodutiva pós-zigótica entre o cariótipo 3 e os demais presentes na bacia do rio Doce.

Semelhantes às outras drenagens costeiras, a bacia do rio Doce possui uma história geomorfológica relacionada às flutuações eustáticas em eras glaciais e interglaciais, as quais determinaram alterações no seu curso em direção a leste do oceano Atlântico (Bandeira Jr. *et al.*, 1975). No vale do médio rio Doce, as lagoas tiveram origem bastante complexa envolvendo processos de levantamentos de crosta, com formação de montanhas, falhas tectônicas, processos erosivos e deposição de sedimentos, ocasionando a mudança do leito do rio Doce e preenchimento dos paleovales. Isso levou a formação de aproximadamente 160 lagos, e sua finalização é estimada entre 10.000 a 14.000 anos atrás (Pflug, 1969; Meis e Monteiro, 1979).

A distribuição dos quatro cariótipos é independente e anterior à formação do sistema lacustre. Em cada lagoa, as frequências dos cariótipos e ausências de alguns deles podem ser explicadas pela ação do efeito fundador e por fatores seletivos ou por ambos os fatores (Tabela I).

O mapeamento das NORs é muito utilizado na caracterização de espécies, populações e em estudos evolutivos. Espécies de peixe que apresentam apenas um par cromossômico com NORs são considerados mais plesiomórficos com relação à distribuição de rDNA quando comparados com espécies que possui NORs múltiplas (Hsu *et al.*, 1975). Os ciclídeos são

caracterizados por apresentarem NORs simples. A população de *G.*

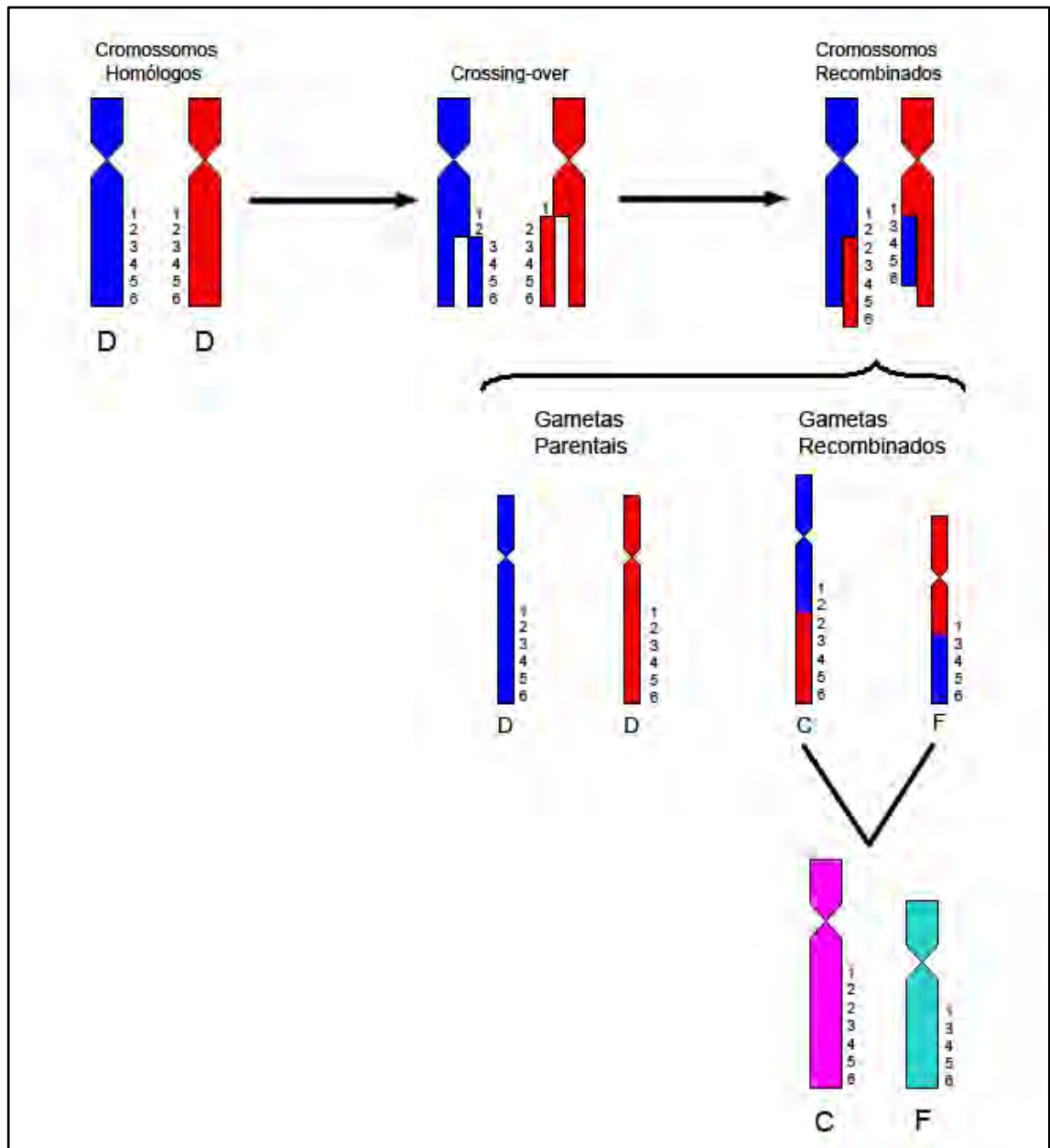


Figura 9: Esquema da formação dos cromossomos C e F em *G. brasiliensis* da bacia do rio Doce. Consequência de um crossing-over desigual e a formação de gametas aneuploides e diploides para determinados alelos;

Brasiliensis da bacia do Rio doce é única ao apresentar um número variável de NORs, já que populações de outras bacias caracterizam-se por ter apenas duas marcações (Feldberg *et al.*, 1985a; Martins *et al.*, 2006; Pires *et al.*, 2008; 2010; Neto *et al.*, 2010). Rearranjos cromossômicos, tal como translocação podem transpor sequências repetidas dessas regiões para outros cromossomos e assim originar NORs múltiplas (Feldberg *et al.*, 1985a;

Feldberg *et al.*, 2003), como as encontradas nas populações de *G. brasiliensis* da bacia do rio Doce.

Variações intra e inter-individual encontradas nessa população pode ser reflexo da atividade transcricional ocorrida na última interfase celular (Pendas *et al.*, 1993). Essa, também, pode ser a causa da diferença entre o número de NORs e as marcações das sondas rDNA 18S, sendo que a última foi observada em maior número em alguns espécimes. Entre Perciformes, existem ainda poucos estudo sobre a localização do rDNA 5S (Vicari *et al.*, 2006). Diferente da sonda rDNA 18S, em *G. brasiliensis* a sonda de rDNA 5S foi detectada no braço longo de um par de cromossomo subtelocêntrico, não apresentando diferença intra-individual. O mesmo resultado foi descrito também para outras populações (Vicari *et al.*, 2006; Neto *et al.*, 2010), mostrando que essa característica é conservada nessa espécie.

A técnica de bandeamento C permite determinar a organização do cromossomo eucarioto, por meio da diferenciação longitudinal dos braços cromossômicos. Atualmente, existem algumas evidências de que a heterocromatina apresenta genes funcionais do DNA, que provavelmente podem ter importantes funções, como as de restabelecer a região telomérica dos cromossomos e funcionar como corpo de guarda protegendo a eucromatina contra agentes mutagênicos (Sumner, 1972).

A presença preferencial de blocos heterocromáticos nas regiões centroméricas/pericentroméricas dos cromossomos é uma característica evidente na ordem Perciformes (Brum *et al.*, 1998), e se mantêm conservada na população de *G. brasiliensis* da bacia do rio Doce. A presença de blocos de heterocromatina em regiões intersticiais do braço maior de dois pares de cromossomos subtelocêntricos foi semelhante à população do rio Jaguariaíva (Vicari *et al.*; 2006), exceto no cariótipo 4, o qual apresentou essa marcação em dois pares de telocêntricos. Os quatro cariótipos apresentaram um par de cromossomos subtelocêntricos com todo braço menor heterocromático, sendo essa mais uma característica diagnóstica das populações da bacia do rio Doce. Associações de heterocromatina com as NORs são frequentemente relatadas em *G. brasiliensis* (Martins *et al.*, 1995; Pires *et al.* , 2008; 2010), mas esse padrão não foi encontrado na população da bacia do rio Doce . Isso indica que os genes ribossomais não estão intercalados com a heterocromatina, mas estão, provavelmente, adjacentes a ela, como encontrado nas populações de

G. brasiliensis estudadas por Vicari *et al.* (2006) e de uma espécie do gênero *Hypostomus* da bacia do rio São Francisco (Artoni e Bertollo, 1999).

Conclui-se que as populações de *G. brasiliensis* da bacia do rio Doce apresentam características únicas, associadas à existência de quatro configurações do primeiro par cromossômico e aos diferentes resultados obtidas nas técnicas de bandeamento realizadas. Os resultados também sugerem uma viabilidade diferenciada das variáveis cromossômicas descritas nesse trabalho.

Referências

- Artoni RF, Bertollo LAC (1999) Nature and distribution of constitutive heterochromatin in fishes, genus *Hypostomus* (Loricariidae). *Genetica* 106: 209-214.
- Augui S, Nora E P, Heard E (2011) Regulation of X-chromosome inactivation by the X-inactivation centre. *Nature Reviews Genetics* 12: 429-442.
- Bandeira JR. A N, Petri S, Suguio K (1975) Projeto Rio Doce, Relatório Final. Convênio da Petrobrás. Universidade de São Paulo.
- Baverstock PR, Moritz C (1996) Project design. In: Hillis DM, Moritz C, Mable BK (eds). *Molecular Systematics*. 2nd ed. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA pp. 17-27.
- Bertollo LAC, Takahashi CS, Moreira-filho O (1978) Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Brazilian Journal of Genetics* 1:103-120.
- Brum MJ, Oliveira CC, Voigt N, Côrrea MMO (1998) Karyotypic discrepancy between populations of *Geophagus brasiliensis* (Perciformes: Cichlidae), including the topotypical population, with possible taxonomic implications. *J. Comp. Biol.* 2: 177-184.
- Butcher D (1995) Muller's Ratchet, Epistasis and Mutation Effects. *Genetics* 141: 431-437.

- Charlesworth B, Charlesworth D (2000) The degeneration of Y chromosomes. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London: B Biological Sciences* 355(1403): 1563-72.
- Charlesworth B, Morgan M T, Charlesworth D (1993) The effect of deleterious mutations on neutral molecular variation. *Genetics* 134(4): 1289-1303.
- Charlesworth D, Charlesworth B, Marais G (2005) Steps in the evolution of heteromorphic sex chromosomes. *Heredity*. 95(2): 118-28.
- Charlesworth, B (1996) The evolution of chromosomal sex determination and dosage compensation. *Current biology* 6(2): 149:162.
- Cioffi MB, Moreira-Filho O, Almeida-Toledo LF, Bertollo LAC (2012) The contrasting role of heterochromatin in the differentiation of sex chromosomes: an overview from Neotropical fishes. *Journal of Fish Biology* 80: 2125–2139.
- Coyne J A, Meyers W, Crittenden AP, Sniegowski P (1993) The Fertility Effects of Pericentric Inversions in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 134:487-496.
- Dergam JA, Paiva SR, Schaeffer CE, Godinho AL, Vleira F (2002) Phylogeography and RAPD-PCR variation in *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Pisces, Teleostei) in southeastern Brazil. *Genetics and Molecular Biology, Ribeirão Preto – SP* 25(4): 379-387.
- Feldberg E, Bertollo LAC (1985) Karyotypes of 10 species of Neotropical cichlids (Pisces, Perciformes). *Caryologia* 38: 257-268.
- Feldberg E, Bertollo IAC (1985a) Nucleolar Organizing Regions in some Species of Neotropical Cichlid Fish (Pisces, Perciformes). *Caryologia* 38(3-4): 319-324.
- Feldberg E, Porto JIR, Bertollo LAC (2003) Chromosomal changes and adaptation of Cichlid fishes during evolution. *In*: Val, A.L. & Kapoor, B.G., ed., *Fish adaptations*. New Dehli & New York. Pp 285-308.
- Ferreira RHR, Fonseca CG, Bertollo LAC, Foresti F (1989) Cytogenetics of fishes from Parque Florestal do Rio Doce (MG). I. Preliminary study of "*Hoplias malabaricus*" (Pisces, Erythrinidae) from Lagoa Carioca and Lagoa da Patos 13(2): 219-226.

- Galetti Jr. P M, Aguilar CT, Molina W (2000) An overview of marine fish cytogenetics. *Hydrobiologia* 420: 55-60.
- Goto T, Monk M (1998) Regulation of X-Chromosome Inactivation in Development in Mice and Humans. *Microbiology And Molecular Biology Reviews* 62(2): 362-378.
- Hatanaka T, Galetti Jr. PM (2004) Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetica* 122:239-244.
- Howell WM, Black DA (1980) Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36:1014-1015.
- Hsu TC, Spirito SE, Pardue ML (1975) Distribution of 18+28S ribosomal genes in mammalian genomes. *Chromosoma* 53: 25-36.
- Jacobina UPP, Paiva E, Dergam JA (2011) Pleistocene karyotypic divergence in *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Teleostei: Erythrinidae) populations in southeastern Brazil. *Neotropical Ichthyology* 9 (2): 325-333.
- Kaiser V B, Charlesworth B (2010) Muller's Ratchet and the Degeneration of the *Drosophila miranda* Neo-Y Chromosome. *Genetics* 185: 339–348.
- King M (1987) Chromosomal rearrangements, speciation and the theoretical approach. *Heredity* 59: 1-6.
- Kirkpatrick M, Barton N (2006) Chromosome Inversions, Local Adaptation and Speciation. *Genetics* 173: 419–434.
- Kullander SO (1998) A phylogeny and classification of the South American Cichlidae (Teleostei: Perciformes). In: Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZM, Lucena CAS, eds. *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Edipucrs, Porto Alegre, Brasil. pp 461-498.
- Kullander SO (2003) Family Cichlidae. In: Reis RE, Kullander SO, Ferraris-JR. CJ, orgs. *Check list of the freshwater fishes of South and Central America*. EDIPUCRS, Porto Alegre. pp 605-606.
- Levan A, Fredga K, Sandberg AA (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220.

- Marín I, Siegal M L, Baker B S (2000) The evolution of dosage-compensation mechanisms. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 22(12): 1106-1114.
- Martins C, Ferreira AI, Oliveira C, Foresti F, Galetti JR. PM (2006) A tandemly repetitive centromeric DNA sequence of the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) is derived from 5S rDNA. *Genetica* 127: 133-141.
- Martins C, Galetti Jr. PM (1999) Chromosomal localization of 5S rRNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). *Chromosome Res* 7:363-367.
- Martins IC, Portella-Castro ALB, Julio-JR. HF (1995) Chromosome Analysis of 5 Species of the Cichlidae Family (Pisces-Perciformes) from the Parana River. *Cytologia* 60: 223-231.
- Meis MRM, Monteiro AMF (1979) Upper quaternary “rampas”: Doce river valley, southeastern Brazilian plateau. *Zeitschrift für Geomorphologie* 23 (2):132-151.
- Michele JL, Takahashi CS (1977) Comparative cytology of *Tilapia rendalli* and *Geophagus brasiliensis* (Cichlidae, Pisces). *Cytologia*. 42: 535-537.
- Moyle PB, Cech Jr. JJ (2000) *Fishes an introduction to ichthyology*. California - USA. 4: 611.
- Muller HJ (1964) The relation of recombination to mutational advance. *Mutat. Res.* 1: 2-9.
- Navarro A, Barton NH (2003) Accumulating postzygotic isolation genes in parapatry: a new twist on chromosomal speciation. *Evolution* 57(3):447–459.
- Nelson JS (2006) *Fishes of the world*. 4rd Edition. John Wiley & Sons Inc. NY, USA pp 601.
- Neto MF, Oliveira C, Foresti F, Nogaroto V, Almeida MC, Artoni RF, Vicari MR, Moreira-Filho O (2010) Comparative cytogenetic study among three fish species: na analysis from a water divide region. *Publ. UEPG Ci. Biol. Saúde* 16(1): 19-28.

- Nguyen DK, Disteche C M (2006) Dosage compensation of the active X chromosome in mammals. *Nature genetics* 38(1): 47-53.
- Pendás AM, Morán P, Garcia-Vasquez E (1993) Multi-chromosomal location of ribosomal RNA genes and heterochromatin association in brown trout. *Chromosome Research* 1: 63-67.
- Pflug R (1969) Quaternary lakes of Eastern Brazil. *Photogrammetria* 24: 29-35.
- Pinkel D, Straume T and Gray JW (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci* 83:2934-2938.
- Pires LB, Giuliano-Caetano L, Dias AL (2008) Karyotype similarities among two populations of *Geophagus brasiliensis* (Perciformes, Cichlidae) from the Tibagi river basin/PR/Brazil. *Caryologia* 61(2): 135-138.
- Pires LB, Giuliano-Caetano L, Dias AL Cytogenetic characterization of *Geophagus brasiliensis* (Cichlidae: Geophaginae) from Guaíba Lake, RS, Brazil. *Folia biologica (kraków)* 58 (1-2): 29-34.
- Puck JM, Willard HF (1998) X inactivation in females with X-linked disease. *N Engl J Med* 338:325–328.
- Rieseberg L (2001) Chromosomal rearrangements and speciation. *Trends in Ecology & Evolution* 16(7): 351-358.
- Sumner AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research* 75: 304-6.
- Thompson KW (1979) Cytotaxonomy of 41 species of Neotropical Cichlidae. *Copéia* 1979: 679-691.
- Vicari MR, Artoni RF, Moreira-Filho O, Bertollo LAC (2006) Basic and molecular cytogenetics in freshwater Cichlidae (Osteichthyes, Perciformes). Karyotypic conservatism and divergence. *Caryologia* 59(3): 260-266.
- Ward CL, (1952) Chromosomal variation in *Drosophila melanica*. *Univ. Tex. Publ.* 5204: 137-157.
- White MJD (1954) *Animal Cytology and Evolution*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 109.

White MJD (1978) Models of Speciation. W. H. freeman and Compan San Francisco.

ANEXO

Detalhamento dos Protocolos

Preparação dos cromossomos mitóticos (tratamento “*in vivo*”)

O órgão utilizado para análise citogenética em peixes é o rim cefálico, o qual consiste basicamente em tecido linfóide. No presente estudo foi utilizada a técnica de preparação direta para a obtenção de cromossomos mitóticos descritas por EGOZQUE (1971) e adaptada para peixes por BERTOLLO (1978). Antes da extração do material é utilizado agente mitogênico, como o Munolan®, para estimular a divisão celular no tecido renal. Um comprimido do mitogênico é dissolvido em 2 ml de água e injetado na cavidade peritoneal em duas doses, com um intervalo de 24 horas entre elas. A proporção de cada dose é 0,3 mL por 100g do peso total do peixe.

Extração:

- 1- Injetar, intra-abdominalmente, entre as nadadeiras peitorais e ventrais, solução aquosa de colchicina (0,1%) na proporção 1 mL/100 g de peso do animal.
- 2- Deixar o peixe em aquário bem aerado, por um período de 30 min. Decorrido esse tempo, sacrificar o animal e retirar o rim cefálico.
- 3- Lavar rapidamente o rim, em solução hipotônica de KCl (0,075 M).
- 4- Transferir o material para uma pequena cuba de vidro, contendo 8 a 10 mL de solução hipotônica de KCl (0,075 M).
- 5- Fragmentar bem o material, com auxílio de pinças de dissecação, completando este processo com uma seringa hipodérmica, desprovida de agulha, através de leves movimentos de aspiração e expiração do material, facilitando a separação das células, até obter uma suspensão celular homogênea.
- 6- Colocar a suspensão obtida a 36-37 °C, durante 20 min.
- 7- Filtrar a solução em lã de vidro e transferi-la para um tubo Falcon de 15 mL.
- 8- Acrescentar gotas de fixador recém preparado (3 v álcool metílico: 1 v ácido acético) na proporção de uma gota para cada mL de suspensão; ressuspender o material e centrifugar por 10 min a 1000 rpm, descartando o sobrenadante

com pipeta Pasteur. Desagregar o botão celular com vibração produzida por batidas leves do dedo indicador no fundo do tubo Falcon.

9- Adicionar, vagarosamente, 5 a 7 mL de fixador recém preparado, deixando-o escorrer pela parede do tubo.

10- Ressuspender o material cuidadosamente, com auxílio de pipeta Pasteur e centrifugar o material por 10 min a 1000 rpm, descartando o sobrenadante.

11- Repetir os itens 9 e 10. Após a última centrifugação e eliminação do sobrenadante, adicionar 1,5 a 2mL de fixador e ressuspender bem o material. O material pode então ser guardado no refrigerador por um período aproximado de um mês, acondicionado em pequenos frascos plásticos, tipo "Eppendorf", ou trabalhado imediatamente conforme os seguintes passos:

12- Pingar 3 a 4 gotas de suspensão, com pipeta Pasteur, sobre diferentes regiões de uma lâmina bem limpa, aquecida em água destilada a 80 °C .

13- Eliminar o excesso de material e fixador, inclinando um pouco a lâmina sobre um papel de filtro.

14- Secar ao ar.

15- Corar com Giemsa, diluído a 5% em tampão fosfato pH 6,8 (3,4 g KH_2PO_4) durante 7- 10 minutos.

16- Lavar a lâmina com água de torneira e deixar secar ao ar.

Detecções de Regiões Organizadoras de Nucléolo (NORs)

A caracterização das regiões organizadoras será feita seguindo a técnica descrita por HOWELL & BLACK (1980), com algumas modificações:

1- Pingar sobre uma lâmina, preparada conforme a técnica para cromossomos mitóticos, 4 gota de solução aquosa de gelatina 2% (acrescida de ácido fórmico na preparação de 1 parte para 100 mL de solução). A gelatina comercial, sem sabor proporciona resultados satisfatórios.

2- Adicionar sobre a gota de gelatina 4 gotas de solução aquosa de nitrato de prata 50%. Cobrir com lamínula.

3- Incubar em estufa a 60 °C, por um período de 9 a 10 min, monitorando a coloração da lâmina que deve chegar a uma cor marrom - esverdeado.

Detecções de heterocromatina constitutiva (Banda C)

Para o estudo da heterocromatina constitutiva, será utilizada a técnica de SUMNER (1972), com pequenas modificações:

- 1- Tratar o material, preparado segundo a técnica descrita para cromossomos mitóticos, com HCl 0,2N em temperatura ambiente, por 9 min.
- 2- Lavar em água deionizada e secar ao ar.
- 3- Incubar a lâmina por 1min e 40 segundos, em solução de Ba(OH)₂ 8H₂O, a 5%, a 42 °C, recém preparada e filtrada..
- 4- Lavar rapidamente em solução de HCl 0,2 N.
- 5- Lavar várias vezes em água deionizada e secar ao ar.
- 6- Incubar em solução 2X SSC, a 60 °C, por 1 hora.
- 7- Lavar várias vezes em água deionizada e secar ao ar.
- 8-. Corar com Giemsa 5% por 5 min.
- 9- Lavar em água corrente e secar ao ar.

Hibridação fluorescente in situ (FISH) com sondas DNAr 18S e 5S

A hibridação das sondas 18S e 5S serão realizadas segundo PINKEL et al., 1986 e HAMKALO & ELGIN, 1991.

Marcação da sonda

As sondas serão marcadas com Biotina (Kit Bionick Labeling System-Invitrogen).

1. Pipetar em um tubo de 1,5 mL no gelo: 5µL de dNTP mix 10x, 2,5 µL de DNA, 32,5µL de água destilada e 5µL de Enzima mix 10x;
2. Fechar o tubo e centrifugar rapidamente (spin 15000g);
3. Incubar a 16°C por duas horas;
4. Adicionar 5µL de Stop Buffer;
5. Precipitar o DNA com 5µL de acetato de sódio 3M e 110µL etanol absoluto gelado. Misturar inertendo o tubo. Levar a freezer -20°C por duas horas ou overnight;
6. Centrifugar a 15000g por 10 minutos;

7. Cuidadosamente, remover o sobrenadante e secar o pellet;
8. Ressuspender o pellet em 50µL de água destilada;
9. Repetir os passos 5 e 6;
10. Ressuspender em 80µL de TE e armazenar a -20°C.

Preparação das lâminas

Tratamento com RNase

1. Incubar as lâminas em 90µL de RNase 0,4% em 2xSSC, por uma hora, em câmara úmida a 37°C;
2. Lavar três vezes em 2xSSC por 5 minutos cada.
3. Lavar durante 5 minutos em PBS 1x, em temperatura ambiente.

Pós-fixação

1. Fixar em formaldeído 1% em PBS 1x/50nM de cloreto de magnésio durante 10 minutos, em temperatura ambiente;
2. Lavar durante 5 minutos em PBS 1x, em temperatura ambiente.
3. Desidratar material em série alcoólica de etanol 70%, 85% e 100%, sob agitação por 5 minutos cada.

Pré-hibridação

1. Desnaturar o DNA das lâminas em formamida 70% em 2xSSC por 5 minutos a 70°C;
2. Desidratar o material em série alcoólica de etanol 70%, 85% e 100%, por 5 minutos cada;
3. Deixar secar ao ar.

Solução de Hibridação

1. Adicionar aos 80µL de sonda marcada: 200µL de formamida pura, 80µL de sulfato dextrano 50% e 40µL de 20xSSC.

Hibridação

1. Levar a solução de hibridação ao banho fervente por 10 minutos e levar ao gelo imediatamente depois;
2. Colocar 40µL solução de hibridação sobre uma lamínula e inverter a lâmina seca sobre a lamínula;

3. Deixar as lâminas com material voltado para baixo e câmara úmida a 37°C overnight.

Lavagens

1. Lavar as lâminas em 2xSSC à temperatura ambiente por 5 minutos, apenas para soltar as lamínulas;
2. Lavar uma vez em formamida 20% em 0,1xSSC a 42°C durante 15 minutos cada;
3. Lavar duas vezes em 0,1xSSC a 42°C durante 5 minutos cada.
4. Lavar uma vez em 2xSSC a 42°C durante 5 minutos.
5. Lavar em Tween 20/20xSSC durante 5 minutos, em temperatura ambiente.

Detecção de sinal

1. Incubar as lâminas em tampão NFDM por 15 minutos;
2. Lavar duas vezes em Tween 20/20xSSC por 5 minutos cada, em temperatura ambiente;
3. Incubar as lâminas com 90µL de solução de FITC-avidina, durante 30 minutos em câmara úmida e escura, em temperatura ambiente;
4. Lavar 3 vezes em Tween 20/20xSSC por 5 minutos cada, em temperatura ambiente;
5. Incubar as lâminas com 90µL de solução de anti-avidina conjugada com biotina, durante 30 minutos em câmara úmida escura, em temperatura ambiente.
6. Repetir o passo 4;
7. Repetir o passo 3;
8. Repetir o passo 4;
9. Desidratar as lâminas em série alcoólica de etanol 70%, 85% e 100%, por 5 minutos cada, e deixar secar ao ar.

Montagem das lâminas

1. Monte as lâminas com solução de DAPI e antifade, na proporção de 200µL de antifade para 8µL de DAPI, com lamínula longa (60 x 24mm);
2. Guarde as lâminas montadas numa caixa escura, em geladeira, pelo menos um dia antes da análise em microscópio de epifluorescência.