

*Identificação da proposta*

**Citogenética molecular em peixes Neotropicais**

<Marcelo Ricardo Vicari>

Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética  
Laboratório de Citogenética e Evolução  
Professor Adjunto –B  
Credenciado nos Programas de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva-UEPG  
e Pós-Graduação em Genética-UFPR

Endereço:

Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari  
Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética  
Av. Carlos Cavalcanti, 4748  
Uvaranas  
Ponta Grossa, PR  
84030-900  
fone (42) 3220-3739  
(42) 9966-2771  
vicarimr@yahoo.com.br  
vicarimr@pq.cnpq.br

## Citogenética molecular em peixes Neotropicais

### *Descrição Detalhada*

#### **Resumo:**

O projeto apresenta uma proposta de estudo em DNAs repetitivos de peixes Neotropicais. Ainda, busca a fixação de novas tecnologias no laboratório de Citogenética e Evolução da Universidade Estadual de Ponta Grossa. Por fim, em consonância com a parte científica, buscar-se-á a formação de alunos de iniciação científica, mestrado e doutorado, além de aprofundar o nível de investigação destes DNAs em peixes.

Os peixes compreendem mais da metade dos vertebrados vivos, ultrapassando 32.500 espécies conhecidas, constituindo um grupo extremamente diverso, habitando os mais diferenciados ambientes aquáticos. Grande parcela desta diversidade de espécies está na região Neotropical. Nesse grupo, são conhecidos eventos cariotípicos correlacionados aos DNAs satélites, mas ainda pouco compreendidos, justificando um aprofundamento no tocante a esta classe de DNA, como: (1) o significado de extensivos domínios heterocromáticos em algumas espécies, (2) a origem e a diversificação de sistemas recorrentes de cromossomos sexuais entre famílias ou gêneros e (3) a origem, manutenção e possíveis funções de cromossomos B heterocromáticos. Estudos mais pormenorizados em famílias de DNA satélite poderiam ainda contribuir com a citotaxonomia e a sistemática em diversas famílias, gêneros e espécies que apresentam taxonomia confusa e pobres relações filogenéticas. Neste sentido, este trabalho procura aprofundar o nível do conhecimento dos DNAs satélites em alguns grupos de peixes Neotropicais, com enfoque especial no cromossomo B de *Astyanax scabripinnis*, cromossomos sexuais de Parodontidae e Crenuchidae, e nas relações filogenéticas e citotaxonomias dos Loricariidae.

Com isto espera-se implementar novas tecnologias no laboratório de Citogenética e Evolução da Universidade Estadual de Ponta Grossa. Aumentar o número e impacto dos artigos publicados. Buscar por novas estratégias que sejam mais resolutivas no entendimento do (s) possível (eis) mecanismo (s) de diferenciação e funções dos DNAs repetitivos em algumas famílias, gêneros ou espécies de peixes Neotropicais. Atuar na orientação de alunos de mestrado nos Programas de Pós Graduação de Biologia Evolutiva da UEPG, e de Genética da UFPR. Desta forma, este projeto poderá contribuir com a formação social e científica de alunos de graduação e dos Programas de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da UEPG e Genética da UFPR. Com isto, contribuir para o entendimento das características biológicas e de diversificação dos genomas e evolução cariotípica dos peixes regionais.

## JUSTIFICATIVA AO IAP

Essa solicitação é parte de um projeto maior em andamento na Universidade Estadual de Ponta Grossa para a diversidade e conhecimento da evolução cariotípica em peixes Neotropicais. Neste processo participam alunos de iniciação científica, mestrado e doutorado, dos quais sou orientador. Especificamente no caso do Parque Estadual de Vila Velha estamos solicitando a possibilidade de realizar 3 a 4 coletas/ano no córrego Quebra Perna, local com acesso pelo aceiro localizado atrás da Igreja, longe da visitação. Temos conhecimento que neste local ocorrem os seguintes gêneros e espécies de interesse neste estudo:

- Família Crenuchidae – *Characidium gomesi* e *Characidium zebra*.
- Família Trychomictoridae – *Trychomicterus* sp. (espécies ainda não descritas ao nível específico). Com o tombamento destas espécies em Museu de Ictiologia pode ser realizada estas identificações.

- Família Callichthyidae: *Corydoras ehardti*
- Família Glandulocaudinae: *Mimagoniates microlepis*
- Família Characidae: *Astyanax paranae* e *Hyphesobricon* sp.
- Outras: Há relatos da ocorrência de pequenos bagres da família Pimelodidae.

Além dos estudos citogenéticos, todo o material amostrado será fixado e enviado para Museus de Ictiologia especializados.

Dessa forma, além da formação de alunos de iniciação científica, mestrado e doutorado, esse projeto viabilizará o conhecimento específico da evolução cromossômica de alguns grupos de peixes. Ainda, com a citogenética molecular há a possibilidade do reconhecimento de novas espécies endêmicas da região dos Campos Gerais.

## 1. INTRODUÇÃO

A investigação de DNAs satélites em peixes Neotropicais, embora relativamente recente e ainda escassa diante da grande diversidade dessa fração da ictiofauna, tem proporcionado avanços importantes na análise do componente heterocromático do genoma e sua relação com estruturas cromossômicas, origem e diversificação de cromossomos B e sexuais, bem como inferências sobre a relação de parentesco entre espécies. Assim, alguns estudos recentes têm sido conduzidos e são alvos principais da presente investigação, buscando um melhor entendimento sobre a origem e composição do cromossomo B de *Astyanax scabripinnis*, a diversificação do sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW na família Crenuchidae, o agrupamento filogenético associado à diversificação dos cromossomos sexuais ZW na família Parodontidae e a evolução do genoma em representantes Neotropicais de Tetraodontiformes.

***Astyanax scabripinnis*** - No gênero *Astyanax*, Mestriner et al. (2000) identificaram um DNA satélite 59% rico em AT no genoma de *A. scabripinnis*, com unidades monoméricas de 51pb, denominado As51. Análises por hibridação *in situ* fluorescente (FISH) mostraram que este DNA está localizado principalmente nas heterocromatinas distais, em alguns sítios de regiões organizadoras de nucléolo (RONs) e no cromossomo B da população analisada (Mestriner et al., 2000). Essa sequência apresentou 58,8% de similaridade com uma porção do retrotransposon RT2 de *Anopheles gambiae* e menor homologia com o gene da transposase do transposon TN4430 do *Bacillus thuringiensis*, sugerindo que sua origem possa ter ocorrido a partir de um elemento transponível de DNA.

Recentemente, Kantek et al. (2009), realizaram um mapeamento comparativo por FISH, com sondas do DNA satélite As51, entre algumas espécies de *Astyanax*: *A. scabripinnis*, *A. paranae*, *A. janeiroensis*, *Astyanax* sp. D, *A. altiparanae* e *A. fasciatus*. *A. altiparanae* foi a única espécie entre as analisadas que não apresentou sítios de DNA satélite em nenhuma das populações. Por outro lado, as demais espécies apresentaram extensas variações no número de cromossômicos marcados (1 a 16 sítios As51). Esta família de DNA mostra-se basal para *A. scabripinnis*, *A. paranae*, *A. janeiroensis*, *Astyanax* sp. D, *A. fasciatus*, constituindo assim um grupo de espécies mais relacionadas quanto a esta característica, do que as outras espécies do gênero que não apresentam o satélite As51, como *A. altiparanae* (Kantek et al., 2009). Assim, a grande variação em número e posição de sítios As51 entre diferentes populações de uma mesma espécie deve ser decorrente do isolamento geográfico existente entre elas. Considerando ser o DNA satélite As51 derivado de um elemento transponível, cada população ou espécie poderia seguir vias evolutivas independentes, quer seja para o acúmulo e invasão de outros sítios cromossômicos, ou eliminação de sequências no genoma, acentuando assim as divergências cariotípicas entre as populações/espécies. Neste sentido, não se pode descartar um papel potencial do DNA satélite As51 nos processos de especiação do gênero *Astyanax*.

Da mesma forma, a população de *A. scabripinnis* da região de Campos de Jordão, SP, Brasil, é caracterizada por apresentar uma alta frequência intra e interindividual de um macrocromossomo B totalmente heterocromático. As populações com maiores frequências deste cromossomo são aquelas isoladas por quedas da água em altitudes geralmente acima de 1920 m em relação ao nível do mar (Néo et al., 2000). Estas populações endêmicas, mostraram que este cromossomo B detém o satélite As51 em posições equidistantes em ambos os braços, em conformidade com os resultados e o modelo de origem por isocromossomo proposto por Mestriner et al. (2000).

Para esta população de *A. scabripinnis* VICARI et al. (2010) obtiveram uma sonda cromossomo B, obtida por microdissecção posterior ao bandamento C, a qual mostrou a composição altamente repetitiva do cromossomo B e mantém identidade com pequenas regiões centroméricas ou terminais do complemento A. A dupla FISH sonda B e satélite As51 evidenciou que o cromossomo B tem enormes sítios As51, a exceção das regiões terminais e centromérica. Esta dupla FISH evidenciou a correspondência sonda B e As51 na região terminal do par acrocêntrico 20, entre outros sítios menores. No entanto, em cinco cromossomos foi possível observar que a sonda B e As51 são localizadas no mesmo cromossomo, porém em sítios distintos. Um destes cromossomos foi o acrocêntrico 24, o qual apresenta As51 em região intersticial do braço longo e sonda cromossomo B em região pericentromérica. Ainda, a obtenção da sonda C<sub>0</sub>t-1 do DNA genômico de espécime sem cromossomo B e, posterior localização *in situ* desta sonda sobre os cromossomos de *A. scabripinnis* evidenciou sinais pericentroméricos e terminais em vários cromossomos, entre eles o acrocêntrico 24 e o cromossomo B (PISTUNE, 2010). A localização destas sondas repetitivas corroboram a hipótese da origem do cromossomo B a partir do elemento do complemento A 24 a partir de formação de isocromossomos (MESTRINER et al., 2000; NÉO et al., 2000a). Ainda, demonstram que o macrocromossomo B de *A. scabripinnis* tem sequências compartilhadas do satélite As51 e de DNAs repetitivos centromérico e terminais em relação ao complemento A. No entanto, devido a baixa identidade da sonda B com o complemento padrão demonstram que este cromossomo B vem sofrendo mecanismos de diferenciação molecular.

Além da origem, a localização destas sondas cromossômica e repetitivas sobre células meióticas paquitênicas permitem elaborar inferências sobre a diversificação molecular do cromossomo B. A localização das sondas cromossomo B e As51 em paquíteno mostraram o cromossomo B pareado braço a braço em uma estrutura semelhante a um bivalente (PISTUNE, 2010). Entretanto, ao contrário do relatado por Mestriner et al. (2000), no presente estudo não foram encontradas evidências de ocorrências de quiasmas no cromossomo B autopareado. Gray (2000) descreveu um mecanismo de recombinação ectópica entre cópias de elementos repetitivos dispersos em cromossomos não homólogos, dessa forma, não dependentes de *crossing-over*. Esse mesmo mecanismo foi utilizado por Vicari et al. (2008b) para explicar a co-localização dos DNAs repetitivos As51 e do rDNA 18S em 14 grandes domínios heterocromáticos da espécie *Astyanax janeiroensis*. Dessa forma, esse mesmo mecanismo pode ser utilizado para explicar a heterocromatinização por dispersão de sequências de DNAs repetitivos, principalmente o As51, entre os braços autopareados do cromossomo B, sem a necessidade de *crossing-over*. Ainda, é possível inferir que o cromossomo B de *A. scabripinnis* se mantém em populações endogâmicas incorporando as taxas mutacionais e consequente divergência molecular em relação aos cromossomos do complemento A, com os quais, realiza pouca ou nenhuma troca.

**Família Crenuchidae** - Na família Crenuchidae, a ocorrência de sistemas de cromossomos sexuais heteromórficos ZZ/ZW em alguns representantes do gênero *Characidium* propicia um bom modelo para estudos da diversificação dos cromossomos sexuais em peixes. Nesse gênero, os cromossomos Z e W podem variar em forma e tamanho (VICARI et al., 2008). Várias as espécies de *Characidium* já estudadas apresentaram sistemas de cromossomos sexuais diferenciados (MAISTRO et al., 1998; 2004; CENTOFANTE et al., 2001; 2003; VICARI et al., 2008; NOLETO et al., 2009a; PANSONATO et al., 2010). Na espécie *C. lanei*, os sítios de rDNA maior encontram-se localizados nos cromossomos sexuais (NOLETO et al., 2009a), enquanto que em *C. gomesi* e *C. allipioi* estes sítios estão em cromossomos independentes (CENTOFANTE

et al., 2001; 2003; VICARI et al., 2008). Considerando que nestas espécies os cromossomos surgiram a partir de um par ancestral homólogo, eventos estruturais tem atuado tanto na diferenciação dos cromossomos Z e W, quanto na dispersão dos rDNA nos genomas das espécies.

Em *C. gomesi* o cromossomo W, totalmente heterocromático, foi microdissectado e amplificado por DOP-PCR. O DNA amplificado foi utilizado como sonda para hibridização fluorescente *in situ* nos cromossomos de *C. gomesi* e *C. lanei* (VICARI et al., 2010). Em *C. gomesi* foi evidenciado o cromossomo W totalmente marcado, além de um pequeno sítio homólogo proximal no braço longo do cromossomo Z, e de pequenos sítios terminais na grande maioria dos cromossomos. Já em *C. lanei* a sonda W foi detectada nos braços curtos dos cromossomos Z e W, além de vários sítios terminais de outros pares cromossômicos (VICARI et al., 2010). Embora ainda parciais, os resultados obtidos demonstram que os cromossomos sexuais de diferentes espécies de *Characidium* possuem regiões com sequências similares de DNA, indicando uma provável origem comum.

Buscando uma caracterização molecular dos cromossomos sexuais de Crenuchidae, o cromossomo microdissectado W foi amplificado por DOP-PCR e submetido ao processo de microclonagem para posterior sequenciamento nucleotídico. A análise de um destes clones, aqui denominando de CgW1, demonstrou alta identidade com DNAs satélites dos mais diversos organismos no BLASTn. A hibridização *in situ* fluorescente com a sonda CgW1 demonstrou sítios em região terminal do braço longo de 3 pares autossômicos, além de estar presente em sítios terminais do braço longo dos cromossomos Z e W (VICARI et al., em preparação). Estes resultados demonstram uma composição molecular heterogênea, no que diz respeito a DNAs repetitivos, para os cromossomos sexuais de *C. gomesi*. Ainda, a ocorrência de sítios CgW1 em pares autossômicos e no par sexual evidenciam que o cromossomo W compartilha DNAs repetitivos com demais pares do complemento. Assim, a obtenção de novas classes de DNAs repetitivos dos cromossomos sexuais, sua caracterização molecular e localização *in situ* nos cromossomos, bem como, uma análise comparativa em demais espécies da família serão extremamente úteis na compreensão dos mecanismos evolutivos da diversificação e estrutura molecular dos cromossomos sexuais de Crenuchidae.

**Família Parodontidae** - A família Parodontidae apresenta graves problemas de agrupamento filogenético, sendo o gênero *Apareiodon* Eigenmann, 1916 considerado recentemente como sinônimo júnior de *Parodon* Valenciennes, 1850 (INGENITO, 2008). As espécies desta família estudadas citogeneticamente apresentam um número diplóide conservado de  $2n=54$  cromossomos. No entanto, apesar da aparente conservação, muitas são as divergências interespecíficas em relação ao cariótipo (MOREIRA-FILHO et al. 1980; 1984, JESUS & MOREIRA-FILHO 2000a,b), assim como intraespecíficas associadas a um acentuado polimorfismo cromossômico estrutural (JORGE & MOREIRA-FILHO 2000; 2004). Embora a maior parte das espécies estudadas na família sejam cromossomicamente homomórficas em relação ao sexo, dois sistemas de cromossomos sexuais distintos foram descritos: (1) *A. affinis*, com um sistema de cromossomos sexuais múltiplos com heterogametia feminina do tipo ZZ/ZW<sub>1</sub>W<sub>2</sub> (MOREIRA-FILHO et al., 1980; JESUS et al., 1999; JORGE & MOREIRA-FILHO, 2000), e (2) *P. hilarii*, *Parodon moreirai* (citado como *Parodon* sp.), *Apareiodon vladii* (citado como *Apareiodon* sp.); uma segunda população de *Apareiodon* sp. (rio Verde-PR) e *A. ibitiensis*, com um sistema de cromossomos sexuais simples do tipo ZZ/ZW (MOREIRA-FILHO et al., 1993; JESUS & MOREIRA-FILHO, 2000; CENTOFANTE et al., 2002; VICENTE, et al., 2003; ROSA et al., 2006; VICARI et al., 2006; BELLAFRONTE et al.,

2009). Vicari et al. (2006) já consideravam a hipótese que as espécies que possuem cromossomos sexuais ZZ/ZW diferenciados, duas do gênero *Parodon*: *P. hilarii* e *P. moreirai* e, duas de *Apareidon*: *A. vladii* e *Apareidon* sp. formariam um grupo mais estritamente relacionado em relação às espécies homomórficas.

Vicente et al. (2003), isolaram e identificaram uma família de DNA satélite utilizando o método de restrição genômica do DNA de *P. hilarii*. Este DNA, denominado pPh2004, foi identificado como uma sequência monomérica de 200pb e 60% rico em bases AT. A hibridação *in situ* fluorescente, utilizando sonda deste satélite, evidenciou 14 sítios em autossomos, além de um sítio na região terminal do braço longo do cromossomo Z e um sítio na região terminal do braço curto do cromossomo W de *P. hilarii* (VICENTE et al., 2003). A sonda pPh2004 também foi localizada sobre os cromossomos de *Parodon moreirai* (CENTOFANTE et al., 2002), onde foram evidenciados os mesmos sítios encontrados nos cromossomos Z e W de *P. hilarii*, além de dois pequenos sítios adicionais nos autossomos.

Todas as espécies de Parodontidae com um sistema ZW apresentam, aparentemente, o mesmo mecanismo de diferenciação do cromossomo W. Um bloco heterocromático presente no braço curto do cromossomo Z, parece ter sofrido uma amplificação em tamanho, a partir do seu homólogo ancestral (primitivo W), originando o braço longo do cromossomo W atual, o qual se mostra acentuadamente maior que o cromossomo Z (CENTOFANTE et al., 2002; VICENTE, et al., 2003; ROSA et al., 2006; VICARI et al., 2006; BELLAFRANTE et al., 2009; VICARI et al., 2010). Assim sendo, este processo explicaria a localização do satélite pPh2004 no braço curto do cromossomo Z e no braço longo do cromossomo W nas espécies *P. hilarii*, *Parodon moreirai*. Entretanto, *Apareidon vladii*, *Apareidon* sp. e *A. ibitiensis* não apresentam o DNA satélite pPh2004 (BELLAFRANTE et al., 2009). Dessa forma, considerando que as espécies de Parodontidae que possuem cromossomos sexuais diferenciados ZW formam um grupo derivado em relação as espécies homomórficas, é possível inferir que: (1) o DNA satélite pPh2004 não é o único componente do genoma implicado na diferenciação do cromossomo W dessas espécies, e (2) este DNA satélite teve, provavelmente, uma origem posterior à diferenciação do sistema ZW nos Parodontidae. Assim, para o entendimento da origem e da diversificação dos cromossomos sexuais na família necessitam ainda de estudos para a identificação do DNA repetitivo que diferenciou o cromossomo W. Ainda, Bellafrente et al. (submetido para publicação) mostraram utilizando a FISH com a sonda pPh2004 a ausência de sítios deste DNA satélite nos cromossomos das espécies *A. ibitiensis*, *Apareidon* sp., *A. vladii*, *A. piracicabae* e *A. vittatus*. Já as espécies *A. affinis*, *P. nasus*, *P. pongoensis*, *P. moreirai* e *P. hilarii* apresentaram sítios de hibridação positivos com a sonda pPh2004. Desta forma, com o marcador cromossômico de DNA satélite pPh2004 é possível inferir que as espécies *A. affinis*, *P. moreirai*, *P. hilarii*, *P. nasus* e *P. pongoensis* formam um clado diferenciado em Parodontidae em relação as demais espécies de *Apareidon* estudadas.

Em outro estudo, Schemberger et al. (em preparação) localizou nas espécies *P. hilarii*, *P. moreirai*, *Apareidon* sp., *A. vladii* e *A. ibitiensis* a presença de sítios da sonda do cromossomo W obtida por microdissecção, denominada de WAp, em região proximal do braço curto de um par metacêntrico em machos, e em fêmeas este sítio apresenta um heteromorfismo de tamanho desta região para o mesmo par cromossômico (cromossomo W). Este modelo está de acordo com o acúmulo de sequências repetitivas para a derivação do cromossomo W de Parodontidae (CENTOFANTE et al., 2002; VICENTE et al., 2003; ROSA et al., 2006; VICARI et al., 2006). Ainda, a sequência WAp também foi verificada na mesma região do par cromossomo metacêntrico em *P. nasus* e *P. pongoensis*, porém sem nenhum heteromorfismo de tamanho aparente entre

machos e fêmeas nestas espécies. Por sua vez, *A. piracicabae* e *A. vittatus* não apresentaram sítios WAp em região proximal de cromossomos metacêntricos (SCHEMBERGER et al., em preparação).

Ainda, Schemberger et al. (em preparação) verificaram diante dos resultados obtidos pelos marcadores pPh2004 e WAp nos cromossomos das espécies *P. hilarii*, *P. moreirai*, *P. nasus*, *P. pongoensis* e *A. affinis* que é possível hipotetizar que o sistema de cromossomos sexuais múltiplos ZZ/ZW1W2 de *A. affinis* deve ter origem por translocação cromossômica entre os elementos cromossômicos de um par autossômico grande portador de sítios WAp terminal, possivelmente o primeiro par do cariótipo, e o cromossomos sexuais Z e W portadores de sítios pPh2004 e WAp, a partir de uma forma ancestral semelhante à encontrada em *P. hilarii*. Somente nestas duas espécies, o satélite pPh2004 é encontrado também em um par metacêntrico homeólogo com marcações em ambos os telômeros (par cromossômico 2). Nesse modelo, uma translocação recíproca entre os cromossomos autossômicos e os cromossomos sexuais originaria um par de cromossomos portadores de sítios de DNA satélite pPh2004 na região terminal, sendo correspondente ao par 13 metacêntrico de *A. affinis*, e o outro par corresponderiam aos cromossomos Z e W sem a presença de sequências de DNA satélite pPh2004. Este W ancestral por sua vez sofreria rearranjos do tipo fissão cêntrica, seguido de inversão pericêntrica originando os cromossomos W1 e W2, como proposto por MOREIRA-FILHO et al. (1993), porém de acordo com a origem de sistemas múltiplos a partir de sistemas simples

**Família Loricariidae** – A superfamília Loricarioidea é um dos grupos de Siluriformes mais bem estudado, onde encontramos três das famílias mais especiosas desta ordem, Loricariidae (785 espécies), Callichthyidae (194 espécies) e Trichomycteridae (207 espécies), entre outras (de PINNA, 1998; BRITTO, 2003; REIS, 2003; FERRARIS, 2007; ESCHMEYER e FRICKE, 2010). Os Loricariidae estão distribuídos por toda a região Neotropical, estendendo-se da Costa Rica à Argentina (REIS et al., 2003). São comumente reconhecidos por possuírem o corpo recoberto por placas dérmicas (o que lhes confere o nome popular de “cascudos”) e a boca em forma de ventosa localizada na região ventral. No entanto, a classificação das subfamílias de Loricariidae e o agrupamento dos gêneros tem sido alvo de constantes reformulações (ISBRÜCKER, 1980; ARMBRUSTER, 2004; REIS et al., 2006). Armbruster (2004) considera as subfamílias: Hypoptopomatinae, Hypostominae, Lithogeneinae, Loricariinae e Neoplecostominae válidas para este grupo. Nesta revisão, a antiga subfamília Ancistrinae foi considerada como sinônima de Hypostominae, a qual passou a ser constituída por cinco tribos: Corymbophanini, Rhinelepini, Hypostomini, Pterygoplichthini e Ancistrini. Adicionalmente, os gêneros *Hemipsilichthys*, *Isbrueckerichthys*, *Kronichthys* e *Pareiorhina* foram alocados na subfamília Neoplecostominae (ARMBRUSTER, 2004). Posteriormente, Reis et al. (2006) criaram uma nova subfamília, Delturinae incorporando os gêneros *Delturus* e *Upsilonodus*, os quais apresentam duas sinapomorfias irreversíveis. REIS et al. (2006) também mantiveram Neoplecostominae, no entanto, com a necessidade de reavaliar a relação de parentesco entre cada um de seus gêneros propostos por Armbruster (2004) e com a subfamília Hypoptomatinae. Mais recentemente, Cramer (2009) usando dados moleculares nucleares e mitocondriais e dados morfológicos alocou o gênero *Hemipsilichthys* dentro da subfamília Delturinae.

Os estudos citogenéticos em Loricariidae demonstram uma ampla diversidade de números, fórmulas e marcadores cromossômicos. Apesar desta grande diversidade, a análise dos cariótipos nas espécies da família têm demonstrado tendências evolutivas bem definidas, possibilitando inferências de agrupamentos (ARTONI & BERTOLLO,

2001; ALVES et al., 2005; KAVALCO et al., 2005). A variação do número diplóide nos representantes estudados da família é de  $2n=34$  em *Ancistrus cuiabae* a  $2n=96$  em *Upsilonodus* sp. No entanto, o  $2n=54$  cromossomos foi considerado basal na família (ARTONI & BERTOLLO, 2001). Mesmo com o grande número de espécies estudadas citogeneticamente em Loricariidae, a grande maioria destes são limitados a descrição de número e fórmula cromossômica. Assim, são poucas as inferências evolutivas a cerca de outros marcadores cromossômicos, como por exemplo, a heterocromatina e a localização física dos rDNAs.

Recentemente, em um estudo de citogenética (Ziemnizack, 2011) comparou três espécies de Neoplecostominae (*Neplecostomus yapo*, *Kronichthys lacerta*, *Isbrueckerichthys duseni*) consideradas de grupos basais em Loricariidae juntamente com *Parotociclus maculicauda* (Hypoptopomatinae) e dados da literatura. Os resultados demonstraram que o  $2n=54$  cromossomos, pouca quantidade de heterocromatina e a sintenia dos rDNAs 18S e 5S podem ser consideradas características primitivas em Loricariidae por estarem presentes no grupo irmão Trichomycteridae e nas subfamílias consideradas basais Delturinae e Neoplecostominae. Desta forma, análises cromossômicas entre os Loricariidae propiciam um melhor entendimento dos processos de evolução cromossômica e das relações filogenéticas nesse grupo de constantes reformulações cladísticas.

Conclusivamente, os resultados disponíveis sobre as distintas classes de DNAs satélites investigadas já permitem inferências importantes no tocante ao entendimento de domínios cromossômicos heterocromáticos, origem de cromossomos B, diversificação de cromossomos sexuais, além de considerações de natureza filogenética, dispersão e biogeografia de populações naturais em diversos grupos de peixes. Assim sendo, esses estudos evidenciam o enorme potencial que a investigação de DNAs satélites apresenta para aprimorar o conhecimento da diferenciação cariotípica e da evolução da ictiofauna Neotropical e, muito provavelmente, desse grupo de vertebrados como um todo.

## 2. OBJETIVOS E METAS A SEREM ALCANÇADOS

A citogenética de peixes Neotropicais vem aprimorando-se nos últimos anos no sentido de buscar respostas mais consistentes para os mecanismos de diversificação dos genomas das espécies. Muitos pesquisadores utilizam da fração heterocromática dos genomas para embasar suas teorias de evolução cariotípica. O método tradicionalmente aplicado para isolar DNAs repetitivos em peixes Neotropicais tem sido a restrição do DNA genômico. No entanto, recentemente duas novas estratégias estão sendo utilizadas com sucesso, (1) a cinética de reassociação baseada no  $C_0t-1$  DNA e (2) a microdissecção de cromossomos submetidos ao bandamento C e a subsequente amplificação de sequências heterocromáticas por DOP-PCR ou por “*Whole Genome Amplification*”. De posse destas metodologias, buscar-se-ão estratégias que possam ser mais resolutivas no entendimento da origem e diferenciação de diferentes classes de DNAs repetitivos em algumas famílias ou gêneros de peixes da nossa região, permitindo a compreensão de mecanismos específicos de diferenciação cariotípica ou contribuindo com a filogenia de grupos de taxonomia confusa.

Assim, são objetivos do presente projeto de estudo:

a) obter famílias de DNAs repetitivos em grupos de peixes Neotropicais, os quais possuam situações específicas de diferenciação da fração heterocromática

(cromossomos sexuais, cromossomos B), ou que possuam problemas decorrentes de dificuldades sistemáticas e/ou taxonômicas;

b) estudar a composição, estrutura e localização cromossômica dos DNAs repetitivos obtidos;

c) realizar uma análise comparativa dos DNAs repetitivos obtidos em diferentes espécies do grupo em questão;

d) aprofundar a análise da diferenciação dos DNAs satélites nos cromossomos sexuais de Parodontidae e Crenuchidae, bem como do cromossomo B de *Astyanax scabripinnis*;

d) identificar marcadores cromossômicos que sejam informativos para análises comparativas entre as espécies em estudo, com especial enfoque no estudo das relações filogenéticas de Loricariidae;

Os dados acima obtidos certamente possibilitarão uma melhor compreensão do processo diversificação cariotípica destes grupos de peixes de nossa ictiofauna, possibilitando também o melhor esclarecimento de suas relações filogenéticas.

### ***Metas a serem alcançadas***

Entre as principais metas a serem alcançadas estão:

- esclarecer por meio de marcadores meióticos e mitóticos a origem e diversificação do cromossomo B de *A. scabripinnis*, dos sistemas de cromossomos sexuais ZW de Parodontidae e Crenuchidae, bem como da origem do sistema de cromossomos sexuais múltiplo de *A. affinis*;
- gerar sondas de DNAs repetitivos específicas para os cromossomos sexuais de Parodontidae e Crenuchidae;
- identificar novas famílias de DNA repetitivos nestes grupos de peixes neotropicais para que possam ser resolutivas no entendimento da diversificação dos genomas destas espécies;
- Contribuir com a filogenia e entendimento dos mecanismos de diversificação cromossômica em Loricariidae.
- atuar continuamente na formação de alunos de iniciação científica, mestrado e doutorado.

### **3. JUSTIFICATIVAS COMPLEMENTARES.**

Além dos objetivos já mencionados, a atual proposta visa consolidar o Grupo de Pesquisa Genética, Conservação e Biologia Evolutiva dos Campos Gerais junto ao CNPq e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva. Ainda, o projeto viabiliza a continuidade das orientações de alunos de doutorado e mestrado nos Programas de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva-UEPG e Genética-UFPR. Dessa forma, entendemos contribuir não somente com o desenvolvimento científico no tocante a diversificação de peixes Neotropicais, mas também, com o desenvolvimento humano/científico da região dos Campos Gerais-PR, a qual é considerada ter uns dos menores índices de desenvolvimento humano do Paraná.

Em termos científicos, estudos da organização, estrutura, composição e localização *in situ* de DNA repetitivos têm propiciado avanços consistentes no entendimento da evolução do genoma das espécies, com enfoque especial em amplos domínios heterocromáticos, diversificação de cromossomos sexuais heteromórficos e origem e manutenção de cromossomos B. Nossa linha de investigação tem atuado na localização e identificação de novas famílias de DNAs repetitivos em algumas espécies

de peixes Neotropicais. Já obtivemos alguns pequenos passos na identificação de novas famílias de DNAs repetitivos no cromossomo B de *Astyanax scabripinnis* e dos cromossomos sexuais W de Parodontidae e Crenuchidae (estudos em andamento). Diante destas novas identificações de DNAs repetitivos buscamos contribuir com um melhor entendimento da diversificação cariotípica das espécies em questão. Nesse sentido, embora ainda pequeno, os passos dados motivam o aprofundamento dos estudos nesta área de conhecimento.

## 4. - MATERIAL e MÉTODOS.

### 4.1. Material

Serão estudadas citogeneticamente espécies, gêneros ou famílias de peixes Neotropicais no tocante a diferenciação dos DNAs repetitivos. Em especial interesse será abordado alguns questionamentos específicos da diferenciação dos cromossomos sexuais em Crenuchidae e Parodontidae, do cromossomo B de *Astyanax scabripinnis*, da retração dos genomas de alguns Tetraodontiformes e das relações de diversificação cromossômica de Loricariidae. O material cromossômico será obtido via preparação de espécimes coletados na natureza ou, eventualmente, a partir do banco de preparações cromossômicas do Laboratório de Citogenética e Evolução da Universidade Estadual de Ponta Grossa. Estes procedimentos estão de acordo com o Comitê de Ética do Uso de Animais em Pesquisa da UEPG (Anexo 1). A captura de espécimes na natureza é autorizada pelo Ministério do Meio Ambiente/IBAMA (Licença permanente para coleta de material zoológico MMA/IBAMA/SISBIO: 15117-1) Coordenador Marcelo Ricardo Vicari, pesca para fins científicos (Anexo 2).

#### 4.1.1 Número de animais, periodicidade de coletas e forma de captura

Para cada população/espécie amostrada serão capturados no máximo 30 animais. Não há como precisar o número de animais amostrados por depender do sucesso da captura. Da mesma forma, a identificação de espécie é realizada em Museu de Ictiologia, por sistematas especializados, onde são tombados e depositados em coleção. Diante do exposto, durante o esforço de captura são coletados espécimes os quais são reconhecidos por pertencer ao grupo em estudo. As coletas serão realizadas somente durante os meses de média de temperatura média a alta (setembro a maio). No máximo uma coleta/captura ao mês, sendo que, em vários meses não ocorrerão amostragens (média de 3 a 4 coletas ao ano). No caso específico do Parque Estadual de Vila Velha as capturas serão realizadas no córrego Quebra Perna, com acesso pelo aceiro localizado atrás da Igreja, longe do local de visitação. A forma de coleta é manual utilizando peneiras, redes de arrasto e ou tarrafas. Os animais serão transportados em condição de oxigenação até a Universidade Estadual de Ponta Grossa, onde serão mantidos em aquários até o processamento. Para o processamento os animais sofrerão eutanásia em anestésicos recomendados para peixes (óleo de cravo ou benzocaína). Posterior ao processamento os animais serão fixados em formol 10% e armazenados em álcool 70 v/v até serem enviados a Museus de Ictiologia especializados para a identificação e tombamento.

## 4. 2. Métodos

### 4. 2. 1. Obtenção de Cromossomos Mitóticos

(BERTOLLO et al., 1978)

Injetar intra-abdominalmente no animal uma solução aquosa de colchicina 0,025%, na proporção de 1 ml/100g de peso. Manter o peixe em aquário bem aerado durante 50 - 60 minutos. Anestésiar o exemplar colocando-o em um recipiente contendo benzocaína diluída a 0.01%, sacrificando-o em seguida. Retirar uma pequena porção do rim anterior, transferindo-a para cerca de 10 ml de solução hipotônica (KCl 0.075M), dissociando as células com uma seringa desprovida de agulha. Incubar em estufa a 37°C durante 25-30 minutos. Re-suspender o material com o auxílio de uma pipeta

Pasteur, colocando-o em um tubo de centrifuga, descartando os fragmentos de tecidos não desfeitos. Acrescentar algumas gotas de fixador (3 partes de metanol para 1 de ácido acético glacial), recém preparado, re-suspendendo o material repetidas vezes. Centrifugar durante 10 minutos, a 900 rpm. Descartar o material sobrenadante com uma pipeta Pasteur. Adicionar 5-7 ml do mesmo fixador, re-suspender bem o material e centrifugar por mais 10 minutos, a 900 rpm. Repetir o último passo. Descartar o material sobrenadante e adicionar quantidade suficiente de metanol para que se tenha uma suspensão celular moderadamente concentrada (geralmente de 0,5 a 1,0 ml) e re-suspender bem o material. Acondicionar em microtubos. Nesta etapa, o material poderá ser armazenado em freezer, para posterior utilização.

#### **4.2.2 Preparação de cromossomos meióticos**

(KLIGERMAN e BLOOM, 1977, adaptada por Bertollo et al., 1978)

Anestesiado o animal e sacrificado. Retirar as gônadas e seccionar em pequenos fragmentos. Colocar os fragmentos em solução hipotônica de KCl a 0,075M por 20 minutos. Transferir o material para o fixador (metanol: ácido acético; 3:1) recém preparado. Este processo deve ser repetido uma vez e a seguir o material será guardado no refrigerador a 4°C. As lâminas serão preparadas com fragmentos de gônadas em uma placa escavada, sendo então adicionadas duas a três gotas de ácido acético a 60%. Após o material bem fragmentado, obtendo-se uma suspensão celular esta será transferida então para uma lâmina aquecida a 30-35°C, sendo imediatamente re-aspirada. Este processo será repetido em 2 ou 3 pontos da lâmina e posteriormente esta será corada com Giemsa 10%.

#### **4. 2. 3 Detecção da Heterocromatina Constitutiva: Bandas-CBG**

(SUMNER, 1972, com pequenas modificações).

Tratar as lâminas contendo o material celular em ácido clorídrico (HCl) 0,2N, à 37°C, durante 10 minutos e lavar com água destilada. Incubar a preparação em hidróxido de Bário ( $Ba(OH)_2$ ) a 5%, recém preparada e filtrada, a 42°C, durante 1 a 2 minutos. Submergir a lâmina em solução de ácido clorídrico 0,2N e lavar com água destilada. Imergir a lâmina em solução salina 2xSSC, a 60°C, durante 40 minutos. Lavar bem, com água destilada e secar ao ar. Corar com solução de Giemsa a 2%, em tampão fosfato pH=6,8 durante 15 minutos.

#### **4. 2.4 Microdissecção**

Os cromossomos metafásicos serão diluídos para a microdissecção em solução de metanol/ácido acético 3:1, respectivamente. Essa suspensão celular será gotejada sobre uma lamínula. O material será corado em Giemsa 2% (v/v) por 5 minutos e, lavados em água destilada. As microdissecções cromossômicas serão realizadas em microscópio invertido (Olympus) equipado com microdissector mecânico (Eppendorf). Os cromossomos serão microdissectados com agulhas de vidro, capilar, com pontas de aproximadamente 0,7  $\mu m$ . Após a microdissecção, a ponta da agulha contendo o material cromossômico será quebrada no interior de um microtubo, onde será realizada uma primeira reação de PCR.

#### **4. 2.5. Reação de DOP-PCR**

As reações de DOP-PCR seguirão o procedimento geral descrito por Telenius et al. (1992), com algumas modificações (Vicari et al., 2010). O procedimento consiste de

20 µl de reação de PCR (tampão 2X = 100 mM KCl, 20 mM Tris-HCl, 0,2% de Triton-X, 3 mM MgCl<sub>2</sub>; 500 µM dNTP; 2,5 µM de primer 5'-ccgactcgagnnnnnatgtgg-3 – DOP = *degenerated oligonucleotide primer* - e 2 U de *Taq* polimerase). O programa de PCR consistirá de 10 ciclos de baixa estrigência (94°C por 1,5 min, 30°C por 3 min, e 72°C por 4 min); seguidos por 30 ciclos de alta estrigência (94°C por 1,5 min, 56°C por 1,5 min, e 72°C por 1,5 min). Os produtos serão checados em gel de agarose 2%. Aliquotar 3µl do primeiro produto de PCR e proceder uma nova reação de amplificação num volume final de 50µl (tampão *Taq* polimerase 1X = 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTP, 3 µl DOP primer = 5'-ccgactcgagnnnnnatgtgg-3 (100µM) e 2 unidades de *Taq* polimerase), de acordo com as seguintes condições: 30 ciclos a 90°C por 1,5 min, 56°C por 1,5 min e 72°C por 1,5 min. Checar o produto de PCR em gel de agarose 2%.

#### 4. 2. 6 Extração de DNA com tampão salino

(ALJANABI & MARTINEZ, 1997)

Homogeneizar o tecido (50-100mg-1cm<sup>2</sup>) em 800 µL de tampão salino (NaCl 0,4 M; Tris-HCl 10mM pH=8,0 e EDTA 2mM pH=8,0) usando o *Polytron Tissue Homogenizer* por 10-15s. Adicionar 80 µL de SDS 20% (Cf=2%) e 16 µL de Proteinase K 20mg/mL (Cf=400 µg/ µL) e misturar bem. Incubar as amostras a 55-65°C por pelo menos 1h ou *overnight*. Adicionar 300 µL de NaCl 6M. *Vortexar* as amostras por 30s a velocidade máxima e centrifugar por 20 minutos a 13.000g. Transferir o sobrenadante para outro tubo. Adicionar igual volume de isopropanol e misturar bem. Incubar a -20° por 1h. Centrifugar por 10 minutos a 4°C a 13.000g. Lavar o *pellet* com etanol 70%, 300 µL, centrifugar por 5 minutos a 13.000g. Secar e ressuspender em 300-500 µL de H<sub>2</sub>O estéril (100 µL = 98 µL TE + 2 µL de RNase 10 mg/mL).

#### 4. 2. 7 Prospecção de DNA repetitivo por restrição genômica

Os DNAs de representantes de peixes Neotropicais serão digeridos com enzimas de restrição seguindo as orientações dos fabricantes. A reação de digestão será incubada por 16 h em banho Maria à 37° C. Uma alíquota da reação de digestão será então submetida à eletroforese em gel de agarose (2%). Possíveis bandas com padrão de repetição em escadas serão selecionadas no gel.

#### 4. 2. 8 Prospecção de DNA repetitivo via cinética de reassociação *Wei et al. (2005)*, com modificações de *Ferreira & Martins (2008)* e *Vicari et al. (2010)*

Este procedimento está baseado na técnica de *C<sub>0</sub>t-1* DNA (DNA enriquecido com sequências alta e moderadamente repetitivas). Brevemente, o DNA genômico será diluído para uma concentração final de 300 ng/µL em uma solução de NaCl 0,3 mol/L. A amostra será autoclavada (121 °C, 1,034 x 10<sup>5</sup> Pa) por 5 min para obter fragmentos entre 100 e 1000 pb. O DNA será então desnaturado a 95 °C por 10 min e colocado a 65 °C para re-anelamento, e posteriormente tratado com nuclease S1 (Promega) a 37 °C por 8 min. Os fragmentos de DNA obtidos serão clonados ou usados como sondas para hibridização fluorescente *in situ* (FISH).

#### 4.2.9 Clonagem

As amostras de DNA provenientes das amplificações serão isoladas do gel de agarose e purificadas utilizando o kit "Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System" (Promega) ou por meio do sistema de eletroforese E-Gel, i-Base safe imager, real-time

transiluminador (Invitrogen) e, então serão ligadas ao plasmídeo pTZ57R, utilizando-se o Kit “InsT/Aclone PCR Product Cloning” (Fermentas), ou em plasmídeo Pmos “blunt ended PCR cloning Kit” (GE) segundo as instruções dos fabricantes. As colônias bacterianas recombinantes (brancas) serão transferidas para tubos de 15 ml contendo 4 ml de meio LB líquido acrescidos de ampicilina (100 mg/ml). As bactérias serão deixadas *overnight* sob agitação de 200 rpm a 37°C. Os plasmídeos bacterianos serão então extraídos por meio de mini-preparação plasmidial e parte da cultura de bactérias será homogeneizada com glicerol e armazenada a -80°C.

#### 4.2.10 Sequenciamento nucleotídico

O sequenciamento nucleotídico dos clones de interesse será realizado utilizando-se o kit “DYEnamic™ ET Terminator Cycle Sequencing” (Amersham Biosciences), segundo as instruções do fabricante. Para cada amostra a ser sequenciada será preparada a seguinte reação: 2 µl de pré-mix (kit), 1 µl de primer M13\_F 5' agc gga taa caa ttt cac aca gg 3'e M13\_R 5' ccc agt cac gac gtt gta aaa cg 3' (3,3 mM), 40-100 ng de DNA (volume máximo de 5 µl), água estéril (volume necessário para 10 µl de reação final). O programa de PCR de sequenciamento consistirá de uma etapa inicial de 2 minutos a 96 °C, seguida de 36 ciclos de 45 segundos a 96 °C, 30 segundos a 50 °C e 4 minutos a 60 °C, e de uma etapa final a 4 °C. Os produtos dessa reação serão purificados para eliminação de nucleotídeos terminadores não incorporados. Adicionar 2 µl de acetato de sódio 3M e 80 µl de etanol 95% em temperatura ambiente em cada tubo contendo o produto da reação de PCR de sequenciamento, misturar no vórtex e centrifugar a 20 °C por 30 minutos a 14000 g. Remover cuidadosamente o sobrenadante e adicionar 400 µl de etanol 70% em temperatura ambiente e, em seguida, centrifugar a 20 °C por 5 minutos a 14000 g. Descartar cuidadosamente o sobrenadante e deixar o *pellet* secar por uma hora em temperatura ambiente protegido da luz. Ressuspender o *pellet* em 4 µl de tampão de carregamento (formamida: blue dextran, na proporção de 5:2). Passar os tubos pelo vórtex, desnaturar as amostras por 5 minutos a 95°C e colocá-las imediatamente no gelo após a desnaturação. Utilizar até 2 µl de amostra na corrida de sequenciamento. As seqüências serão lidas num sequenciador automático.

#### 4.2.11 Análise das seqüências nucleotídicas

Para identificação de possíveis homologias de genes, as seqüências nucleotídicas obtidas serão primeiramente submetidas a buscas *online* BLASTn (ALTSCHUL et al. 1990) através do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (USA), “website” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). Posteriormente, as seqüências serão depositadas no GenBank.

#### 4.2.12 Hibridação *in situ* fluorescente (FISH)

##### A. Marcação das sondas

As sondas serão marcadas pela técnica de *nick translation* ou por PCR, utilizando os compostos biotina 16 - dUTP ou digoxigenina 11 dUTP (Roche). O produto desta reação será precipitado com acetato de potássio e etanol *overnight* a -20° C. Posteriormente, o material será centrifugado por 15 minutos a 13000 rpm, será descartado o sobrenadante, deixando o DNA marcado secar completamente em estufa a 37° C.

##### B. Preparação das lâminas

As lâminas, contendo as preparações cromossômicas, serão lavadas em PBS, por 5 minutos, em temperatura ambiente e desidratadas em uma série de etanol a 70%, 85% e 100%, 5 minutos em cada banho. A seguir, serão tratadas com solução de RNase (100 µg/ml) durante 1 hora, em câmara úmida a 37°C, lavadas duas vezes em solução de 2xSSC, por 10 minutos e em PBS, por 5 minutos. Em seguida a fixação com formaldeído 1% / PBS 1x / MgCl<sub>2</sub> 50mM, por 10 minutos, à temperatura ambiente, lavagem em PBS 1x por 5 minutos e desidratação em série de etanol a 70%, 85% e 100%, 5 minutos cada banho, à temperatura ambiente. As lâminas serão então tratadas com formamida 70% dissolvida em 2xSSC, a 70°C, por 5 minutos e novamente desidratadas em série de etanol a 70%, 85% e 100%, 5 minutos cada banho.

#### *C. Hibridação e detecção dos sinais correspondentes*

Serão aplicados, sobre as lâminas, cerca de 50 µl da solução de hibridação permanecendo “overnight” a 37°C, em câmara úmida contendo solução de 2xSSC pH 7,0. Decorrido este tempo, as lâminas serão lavadas com solução de formamida 15% em 0,2xSSC pH 7,0 por 20 minutos, a 42°C e, em seguida, lavadas com 0,1xSSC a 60°C, por 15 minutos. Em seguida serão lavadas em Tween 20, por 5 minutos, incubação em 90 µl de tampão NFDm a 5%, por 15 minutos em câmara úmida e duas lavagens com Tween 20, cinco minutos cada. Para a detecção da sonda, serão colocados sobre as lâminas 90 µl de avidina-FITC (Fluoresceína Isotil Cianato-avidina conjugada) a 0,25 µg/µl, permanecendo por 30 minutos a 37°C, em câmara úmida. As lâminas serão então lavadas 3 vezes em Tween 20, cinco minutos cada. Em seguida a desidratação em série de etanol a 70%, 85% e 100% à temperatura ambiente, 5 minutos em cada banho. Os cromossomos serão então contra corados com DAPI (0,2 µg/ml) diluído em uma solução “antifade” (Fluka).

## **5. FORMA DE ANÁLISES DOS RESULTADOS**

As preparações cromossômicas convencionais serão analisadas em microscópio de campo claro Olympus Bx41. As preparações com hibridação *in situ* serão analisadas em microscópio de epifluorescência, com os filtros apropriados Olympus Bx41. As imagens serão capturadas com utilização da camera CCD DP71 (Olympus) e software DP controller. As imagens obtidas serão organizadas em cariótipos para a descrição dos marcadores cromossômicos e analisadas de forma comparativa entre as espécies quando for um marcador compartilhado.

Os resultados obtidos deverão ser apresentados em congressos/simpósios e publicados em revistas científicas.

## 6. Custos do projeto

Os custos do projeto estão a encargo de financiamento a ser obtido pelo Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari. Parte dos Custos já foram financiados pela CAPES.

Rubrica	Quantidade	Valor R\$	Justificativa
<b>Ano 1</b>			
Consumo	Produtos para biologia molecular: Taq DNA polimerase; agarose, enzimas de restrição, gel red, primers, kit genome walker, kits de clonagem. Kits purificação DNA.	4.000,00	Consumíveis indispensáveis para a amplificação e clonagem de sequências gênicas e de DNA repetitivo
Consumo	Produtos para citogenética molecular: biotina 11 dUTP, digoxigenina 16 dUTP, Anti - Digoxigenina Rodamina Conjugada, streptavidina alexa fluor 488; sais, formamida, sulfato dextrano, kits de amplificação de sinal, kits de marcação de sondas	9.000,00	Consumíveis utilizados para mapeamento citogenético das sequências repetitiva e gênicas obtidas neste estudo.
Serviço de terceiros	Sequenciamento <i>next generation</i>	10.000,00	Sequenciamento do cromossomo sexual W total de Parodontidae para a prospecção de sequências gênicas e repetitivas.
Consumo	Plásticos e Vidrarias: ponteiras, tubos, caixas, Becker, provetas, etc;	2.000,00	Material de uso rotineiro em experimentos de bancada.
<b>Ano 2</b>			
Consumo	Produtos para biologia molecular: Taq DNA polimerase; agarose, enzimas de restrição, gel red, primers, kit genome walker, kits de clonagem. Kits purificação DNA	8.000,00	Consumíveis indispensáveis para a amplificação e clonagem de sequências gênicas e de DNA repetitivo
Consumo	Produtos para citogenética molecular: biotina 11 dUTP, digoxigenina 16 dUTP, Anti - Digoxigenina Rodamina Conjugada, streptavidina alexa fluor 488; sais, formamida, sulfato dextrano, kits de amplificação de sinal, kits de marcação de sondas	10.000,00	Consumíveis utilizados para mapeamento citogenético das sequências repetitiva e gênicas obtidas neste estudo.
Consumo	Plásticos e Vidrarias: ponteiras, tubos, caixas, Becker, provetas, etc;	2.000,00	Material de uso rotineiro em experimentos de bancada.
Serviço de terceiros	Sequenciamento automático 200 linhas	5.000,00	Sequenciamento de sequências repetitivas e gênicas obtidas neste estudo.
<b>Total de Consumo</b>		<b>35.000,00</b>	
<b>Total de Serviços de Terceiros</b>		<b>15.000,00</b>	
<b>Total Geral</b>		<b>50.000,00</b>	

## 7. CRONOGRAMA

### Cronograma de execução em 24 meses (após aprovação IAP a Março de 2014)

	2012/1					2012/2					2013/1					2013/2					2014/1						
	J	F	M	A	M	J	J	A	S	C	N	D	J	F	M	A	M	J	J	A	S	C	N	D	J	F	M
<b>Revisão Bibliográfica</b>	∩	∩	∩	∩	∩	∩	∩	∩	∩	∩	∩	∩	∩	∩	∩	∩	∩	∩	∩	∩	∩	∩	∩	∩	X	X	
<b>Coletas/amostras</b>	X	X	X	X	X						X	X	X	X	X												
<b>Inventário Ictiológico</b>									∩					∩						∩							
<b>Ensaio Metodológicos</b>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<b>Análise dos dados</b>	∩	∩				∩	∩	∩					∩	∩	∩					∩	∩	∩	∩	∩	X	X	
<b>Divulgação Resultados</b>											X	X								X	X	X	X	X	X	X	X
<b>Relatório</b>													∩											∩			X

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aljanabi S. M.; Martinez I. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Res*, 25, 4692–4693.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 5, 403-410.
- Alves, A.L; Oliveira, C; Foresti, F. Comparative cytogenetic analysis of eleven species of subfamilies Neoplecostominae and Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae). *Genetica*. v.124, p.127-136, 2005.
- Armbruster, j.w. Phylogenetic relationships of the suckermouth armoured catfishes (Loricariidae) with emphasis on the Hypostominae and the Ancistrinae. *Zoological Journal of the Linnean Society*. v.141, p.1-80, 2004.
- Artoni, R.F.; Bertollo, L.A.C. Trends in the Karyotype Evolution of Loricariidae Fish (Siluriformes). *Hereditas*. v.134, p.201–210, 2001.
- Bellafronte, E.; Vicari, M.R.; Artoni, R.F.; Margarido, V.P.; Moreira-Filho, O. (2009). Differentiated ZZ/ZW sex chromosomes in *Apareiodon ibitiensis* (Teleostei, Parodontidae): considerations on cytotaxonomy and biogeography. *J Fish Biol* 75:2313–2325 (2009).
- Bellafronte, E.; Schemberger, M.O.; Moreira-Filho, O.; Almeida, M.C.; Artoni, R.F.; Margarido, V.P.; Vicari, M.R. Chromosomal markers in Parodontidae: New data and revision with phylogenetic inferences. *Genetica* (submetido para publicação).
- Bertollo L.A.C.; Takahashi C.S.; Moreira-Filho, O. (1978). Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Revista Brasileira de Genética* 1, 103-120.
- Brenner, S., Elgar, G., Sandford, R., Macrae, A., Venkatesh, B., Aparicio, S. (1993). Characterization of the pufferfish (Fugu) genome as a compact model vertebrate genome. *Nature* 366, 265-268.
- Britto, M. R. Análise filogenética da ordem Siluriformes com ênfase nas relações da superfamília Loricarioidea (Teleostei: Ostariophysi). Tese de Doutorado, Instituto de Biociências, Universidade Estadual de São Paulo, São Paulo. 2003.
- Brum, M. J. I. & Galetti, P. M. Jr. (1997). Teleostei ground plan karyotype. *Journal of Computational Biology* 2, 91-102.
- Centofante, L., Bertollo, L. A. C., Moreira-Filho, O. (2001). Comparative cytogenetics among sympatric species of *Characidium* (Pisces, Characiformes). Diversity analysis with the description of ZW sex chromosome system and natural triploidy. *Caryologia* 54, 253-260.
- Centofante, L., Bertollo, L. A. C., Moreira-Filho, O. (2002). ZZ/ZW sex chromosome system in new species of the genus *Parodon* (Pisces, Parodontidae). *Caryologia* 54, 139-150.
- Centofante, L., Bertollo, L.A.C., Buckup, P.A., Moreira-Filho, O. (2003) Chromosomal divergence and maintenance of sympatric characidiin fish species (Crenuchidae, Characidiinae). *Hereditas* 138, 213–218.
- Cramer, A. C. Filogenia de duas subfamílias de cascudos (Siluriformes, Loricariidae), usando dados nucleares, mitocondriais e morfológicos. Tese de Doutorado. p. 1-121, 2009.
- Elgar, G. (1999). Quality not quantity: the pufferfish genome. *Human Molecular Genetics* 5, 1437-1442.

- Elmerot, C., Arnason, U., Gojobori, T., Janke, A. (2002). The mitochondrial genome of the pufferfish, *Fugu rubripes*, and ordinal teleostean relationships. *Gene* 295, 163-172.
- Eschmeyer, W; Fricke, R. Catalog of fishes electronic version. Acesso em: 17-11-2010. California Academy of Sciences.
- Ferraris Jr., C.J. Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. *Zootaxa*. v.1418, p.1-628, 2007.
- Ferreira, I. A. & Martins, C. (2008). Physical chromosome mapping of repetitive DNA sequences in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*: Evidences for a differential distribution of repetitive elements in the sex chromosomes. *Micron* 39, 411-418.
- Hinegardner, R. & Rosen, D. E. (1972). Cellular DNA Content and the Evolution of Teleostean Fishes. *The American Naturalist* 106, 621-644.
- Ingenito, L. F. S. (2008). Análise filogenética da família Parodontidae (Teleostei, Characiformes). PhD. Thesis. Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil 140p.
- Isbrücker, I.J.H. Classification and catalogue of the mailed Loricariidae (Pisces, Siluriformes). *Verslagen en Technische Gegevens. Universiteit van Amsterdam*. v.22, p.1-181, 1980.
- Jesus, C. M., Bertollo, L. A. C., Moreira-Filho, O. (1999). Comparative cytogenetics in *Apareiodon affinis* (Pisces, Characiformes) and considerations regarding diversification of the group. *Genetica* 105, 63-67. Jesus, C. M. & Moreira-Filho, O. (2000a). Cytogenetic studies in some *Apareiodon* species (Pisces, Parodontidae). *Cytologia* 65, 397-402.
- Jesus, C. M.; Moreira-Filho, O. (2000a). Cytogenetic studies in some *Apareiodon* species (Pisces, Parodontidae). *Cytologia*, 65, 397-402.
- Jesus, C. M. & Moreira-Filho, O. (2000b). Karyotypes of three species of *Parodon* (Teleostei: Parodontidae). *Ichthyological Exploration of Freshwaters* 11, 75-80.
- Jorge, L. C. & Moreira-Filho, O. (2000). Cytogenetic studies on *Apareiodon affinis* (Pisces, Characiformes) from Paraná river basin: Sex chromosomes and polymorfism. *Genetica* 109, 267-273.
- Jorge, L. C. & Moreira-Filho, O. (2004). Nucleolar organizer regions as markers of chromosomal polymorphism in *Apareiodon affinis* (Pisces, Parodontidae). *Caryologia* 57, 203-207.
- Kantek, D. L. Z., Vicari, M. R., Peres, W. A. M., Cestari, M. M., Artoni, R. F., Bertollo, L. A. C., Moreira-Filho, O. (2009). Chromosomal location and distribution of As51 satellite DNA in five species of the genus *Astyanax* (Teleostei, Characidae, Incertae sedis). *Journal of Fish Biology* 75, 408-421.
- Kavalco, K.F.; Pazza, R.; Bertollo, L.A.C.; Moreira-Filho, O. Heterochromatin characterization of four fish species of the family Loricariidae (Siluriformes). *Hereditas*. v.141, p.237-242, 2004.
- Loh, Y.H., Brenner, S., Venkatesh, B. (2008). Investigation of loss and gain of introns in the compact genomes of pufferfishes (*Fugu* and *Tetraodon*). *Molecular Biology and Evolution* 25, 526-535.
- Maistro, E. L., Jesus, C. M., Oliveira, C., Moreira-Filho O., Foresti, F. (2004). Cytogenetic Analysis of A-, B-chromosomes and ZZ/ZW Sex Chromosomes of *Characidium gomesi* (Teleostei, Characiformes, Crenuchidae). *Cytologia* 69, 181-186.
- Maistro, E. L., Oliveira, C., Foresti, F. (1998). Comparative cytogenetic and morphological analysis of *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characidae, Tetragonopterinae). *Genetics and Molecular Biology* 21, 201-206.

- Mestriner, C. A., Galetti Jr., P. M., Valentini, S. R., Ruiz, I. R. G., Abel, L. D. S., Moreira-Filho, O., Camacho, J. P. M. (2000). Structural and functional evidence that a B chromosome in the characidae fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome. *Heredity* 85, 1-9.
- Moreira-Filho, O., Bertollo, L. A. C., Galetti Jr., P. M. (1980). Evidences for a multiple sex chromosome system with female heterogamety in *Apareiodon affinis* (Pisces, Parodontidae). *Caryologia* 33, 83-91.
- Moreira-Filho, O., Bertollo, L. A. C., Galetti Jr., P. M. (1984). Structure and variability of nucleolar organizer regions in Parodontidae fish. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* 26, 564-568.
- Moreira-Filho, O., Bertollo, L. A. C., Galetti Jr., P. M. (1993). Distribution of sex chromosomes mechanisms in Neotropical fish and description of a ZZ/ZW system in *Parodon hilarii* (Parodontidae). *Caryologia* 46, 115-125.
- Néo, D. M., Bertollo, L. A. C., Moreira-Filho, O., Camacho, J. P. M. (2000) Altitudinal variation for B chromosome frequency in the characid fish *Astyanax scabripinnis*. *Heredity* 85, 136-141.
- Noletto, R. B., Amorin, A. P., Vicari, M. R., Artoni, R. F., Cestari, M. M. (2009). An unusual ZZ/ZW sex chromosome system in *Characidium* fishes (Crenuchidae, Characiformes) with the presence of rDNA sites. *Journal of Fish Biology* 75, 448-453.
- Noletto, R. B., Guimarães, F. S. F., Paludo, K. S., Vicari, M. R., Artoni, R. F., Cestari, M. M. (2009b). Genome Size Evaluation in Tetraodontiform Fishes from the Neotropical Region. *Marine Biotechnology* 11, 680-685.
- Alves, J.C.P.; Paiva, L.R.S.; Oliveira, C.; Foresti, F. (2010). Interspecific chromosomal divergences in the genus *Characidium* (Teleostei: Characiformes: Crenuchidae). *Neotrop ichthyol* 8, 77-86.
- Pistune, H.F.M. Citogenética molecular de *Astyanax scabripinnis* Characidae, *Incertae sedis* com ênfase no cromossomo B. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva). Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa, PR, 2010.
- Reis, R. E; Kullander, S. O; ferraris Jr, C. J. Check list of the freshwater fishes of south and central America. Porto Alegre: EDIPUCRS. p.742, 2003.
- Rosa, R., Bellafronte, E., Moreira-Filho, O., Margarido, V. P. (2006). Constitutive heterochromatin, 5S and 18S rDNA genes in *Apareiodon* sp. (Characiformes, Parodontidae) with a ZZ/ZW sex chromosome system. *Genetica* 128, 159-166.
- Schemberger, M. O.; Nogaroto, V.; Almeida, M. C.; Artoni, R. F.; Bertollo, L. A. C.; Moreira-Filho, O.; Vicari, M. R. (em preparação). Pintura cromossômica e diversificação dos cromossomos sexuais simples e múltiplo de Parodontidae.
- Silva, E. B. Citogenética clássica e molecular em peixes Neotropicais. Estudos comparativos entre bacias hidrográficas com ênfase em região de transposição de rio. Tese de Doutorado (Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução). Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, SP, 2009.
- Sumner, A. T. (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research* 75, 304-306.
- Telenius, H.; Carter, N. P.; Bebb, C. E.; Nordenskjold, M.; Ponder, B. A.; Tunnacliffe, A. (1992). Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics*, 13, 718-725.
- Venkatesh B., Gilligan P., Brenner S. (2000). Fugu: a compact vertebrate reference genome. *FEBS Letters* 476, 3-7.

- Vicari, M. R., Moreira-Filho, O., Artoni, R. F., Bertollo, L. A. C. (2006). ZZ/ZW sex chromosome system in an undescribed species of the genus *Apareiodon* (Characiformes, Parodontidae). *Cytogenetic and Genome Research* 114, 163-168.
- Vicari, M. R., Artoni, R. F., Moreira-Filho, O. & Bertollo, L. A. C. (2008). Diversification of a ZZ/ZW sex chromosome system in *Characidium* fish (Crenuchidae, Characiformes). *Genetica* 134, 311–317.
- Vicari, M.R.; Nogaroto, V.; Noletto, R.B.; Cestari, M.M.; Cioffi, M.B.; Almeida, M.C.; Moreira-Filho, O.; Bertollo, L.A.C.; Artoni, R.F. (2010) Satellite DNA and chromosomes in Neotropical fishes: Methods, applications and perspectives. *J Fish Biol* 76:1094-1116.
- Vicari, M.R.; Machado, T.C.; Pansonato, J.C.; Oliveira, C.; Foresti, F. Nogaroto, V.; Almeida, M.C.; Moreira-Filho, O.; Bertollo, L.A.C.; Artoni, R.F. Satellite DNA and ZW molecular composition em *Characidium gomesi* (Teleostei, Crenuchidae). Em preparação.
- Vicente, V. E., Bertollo, L. A. C., Valentini, S. R., Moreira-Filho, O. (2003). Origin and differentiation of sex chromosome system in *Parodon hilarii* (Pisces, Parodontidae). Satellite DNA, G and C-banding. *Genetica* 119: 115-120.

## 9. Anexos

Aspectos éticos e de biossegurança Em consonância com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, quando couber.

O pesquisador responsável (Marcelo Ricardo Vicari) possui a Licença permanente para coleta de material zoológico MMA/IBAMA/SISBIO: 15117-1. Ainda, os procedimentos estão de acordo com o Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Ponta Grossa –Processo CEUA: 07/2011 (Anexo).

 **PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAL**

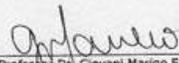
**CARTA DE APROVAÇÃO**

**Processo CEUA – 07/2011**  
**Protocolo UEPG – 05057/2011**  
**Título – "Citogenética Molecularem Peixes Neotropicais".**  
**Interessado – Dr. Marcelo Ricardo Vicari.**

**Data de Entrada – 31/03/2011**  
**Resultado: Aprovado**  
**Data/Prazo – Validade de dois anos para projetos de pesquisa.**  
**02/05/2013**

**Considerações**  
Prezado Professor,  
Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:  
- APROVADO, por dois anos, para a utilização 30 exemplares de cada espécie/população dos peixes em estudo.

Atenciosamente,  
**Relatório Final previsto para 90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo.**

  
Professor Dr. Giovanni Marino Favero  
Coordenador Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA-UEPG

Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748, CEP 84.030-900 Campus Universitário em Uvaranas  
Ponta Grossa - Paraná  
Bloco da Reitoria - anexo a PROPESP  
Fone: (042) 3220-3264

