



UEM – Universidade Estadual de Maringá

MINI-CURSO
INTRODUÇÃO A CITOGENÉTICA DE PEIXES

Prof. Dra Ana Luiza de Brito Portela Castro
Mestranda Ana Camila Prizon
Mestranda Andréa Cius
Doutorando Lucas Baumgärtner
Doutoranda Márcia Cristina de Lara Kamei

Maringá-PR

INTRODUÇÃO

O conhecimento sobre a biologia dos peixes quando comparado com outros grupos de vertebrados é pouco conhecida, notadamente sobre a evolução, sistemática e distribuição de muitos grupos neotropicais. Possivelmente, uma das principais razões para essa carência seja o elevado número de espécies - cerca de 24.600 - o que equivale, aproximadamente, ao número de espécies de todos os demais vertebrados (NELSON, 2006).

A grande diversidade de ambientes ecológicos existentes na América do Sul permitiu uma grande irradiação evolutiva, apresentando rica ictiofauna para a região, contendo cerca de 60 famílias e aproximadamente 2800 espécies conhecidas (SCHAEFER, 1998). Entretanto, estima-se que existam cerca de 8000 espécies de peixes de água doce neotropicais. Essa diversidade extremamente complexa é, do ponto de vista evolutivo, um grande produto do mundo biológico.

Nas duas últimas décadas a citogenética vem contribuindo significativamente para o conhecimento da biodiversidade em peixes, apresentando uma somatória de informações e descobertas relativas a processos evolutivos nesse grupo, tais como rearranjos cromossômicos, polimorfismos estruturais e/ou numéricos, poliploidias naturais, sistemas de cromossomos sexuais, distribuição geográfica de grupos/espécies/populações (OLIVEIRA et al., 2009). Entretanto, importantes subsídios têm sido fornecidos para um melhor entendimento das relações evolutivas entre espécies e populações, assim como para a caracterização de complexos de espécies, em associação com dados de morfologia, biogeografia, comportamento e biologia molecular (ARTONI et al., 2000).

A associação entre a citogenética e a sistemática, tem se mostrado, em muitos casos, extremamente importante, complementando os estudos de identificação, distribuição e de relacionamento entre grupos naturais, normalmente baseados apenas em características morfométricas e merísticas. Além disso, o conhecimento da estrutura dos cromossomos, através de mapeamento de sequências gênicas utilizando técnicas de FISH (hibridação “*in situ*” fluorescente) aplicados em diferentes grupos de peixes tem contribuído grandemente para o conhecimento do genoma dessa classe de vertebrados e suas implicações evolutivas.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Introduzir as metodologias de obtenção de cromossomos de peixes, de técnicas de bandamentos C e AgRONS (regiões organizadoras de nucléolos) e de citogenética molecular (FISH).

Objetivos específicos

- Obter cromossomos mitóticos através da técnica de suspensão celular.
- Caracterizar cromossomicamente a espécie utilizada, bem como comparar com grupos cladisticamente próximos.
- Empregar as técnicas de bandeamento cromossômico para a obtenção da distribuição das regiões de heterocromatina (banda C) e AgRONS.
- Demonstrar a técnica de citogenética molecular de hibridação “*in situ*” fluorescente (FISH) e suas aplicações.

MATERIAS E MÉTODOS

1. Análises Citogenéticas

As análises citogenéticas de cromossomos mitóticos serão feitas com base em técnicas convencionais e de bandeamentos cromossômicos.

2. Estimulação de Mitoses

Para obtenção de um maior número de mitoses, será utilizada uma técnica de estimulação celular através da injeção de uma solução de fermento biológico, descrita inicialmente por Cole e Leavens (1971) para anfíbios e répteis, utilizada por Lee e Elder (1980) para pequenos mamíferos e por Oliveira et al. (1988) para peixes. O procedimento utilizado será:

1. Preparar uma solução de fermento biológico na seguinte proporção: 0,5 g de fermento, 0,5 g de açúcar e 7 ml de água destilada.
2. Incubar a solução à 37°C por cerca de 20 minutos.
3. Injetar a solução intramuscular dorso-lateralmente no peixe na proporção de 1 ml por 100 g de peso do animal.
4. Deixar o animal em aquário bem aerado durante 24 ou 48 horas.

3. Preparação de Cromossomos Mitóticos

As preparações do material para análise dos cromossomos mitóticos, serão feitas utilizando-se a porção anterior do rim, de acordo com a técnica de “air drying” descrita por Egozcue (1971) e modificada para peixe por Bertollo *et al.*, (1978).

4. Técnica “Air Drying” (BERTOLLO *et al.*, 1978)

Injetar intraperitonealmente solução aquosa de colchicina (0,0025%) na proporção de 1 ml/100g do peso do animal; deixar o peixe em aquário bem aerado de 30 a 60 minutos, sacrificá-lo e retirar a porção anterior do rim e colocar o tecido em solução hipotônica de KCl (0,075); dissociar com a ajuda de uma seringa hipodérmica de vidro; hipotonizar em estufa à 37°C por 30 minutos; retirar tecidos precipitados no

tubo e centrifugar por 10 minutos a 1000 RPM; retirar o sobrenadante, adicionar fixador (solução de álcool metílico e ácido acético, proporção 3:1) e ressuspender com a ajuda de uma pipeta de Pasteur de vidro e centrifugar novamente; repetir o último passo por mais duas vezes; guardar o material em eppendorf com fixador e armazenar em freezer - 20°C. Após obter a suspensão celular, pingar de 3 a 4 gotas em uma lâmina quente (60°C) e deixar secar. As lâminas com a suspensão celular serão coradas com Giemsa diluído a 5% em tampão fosfato pH 6,8 durante 8 minutos, para análise convencional ou submetidas a tratamentos de bandeamentos cromossômicos.

5. Bandeamentos Cromossômicos

5.1 Técnica de Impregnação por Nitrato de Prata - HOWELL e BLACK (1980)

De posse da lâmina já contendo o material para análise, pingar uma gota de solução aquosa de gelatina em dois pontos distintos da lâmina, sobre estas gotas adicionar uma gota de água deionizada e adicionar sobre estas gotas, duas gotas de solução de nitrato de prata (AgNO_3), e cobrir a lâmina com lamínula. Incubar em estufa a 60°C por 3-5 minutos, ou até que a solução adquira uma coloração caramelada. Lavar em água corrente e secar ao ar, analisar em microscópio de luz.

5.2.1 Bandamento C - SUMNER (1972)

Submeter a lâmina com o material pingado à tratamento com HCl em estufa à 37°C, por 15 minutos. Lavar a lâmina em água corrente e secar ao ar. Incubar a lâmina por 1 minuto e 30 segundos em solução de hidróxido de bário (BaOH), em banho-maria à 42°C, com o BaOH recém preparado e filtrado. Lavar a lâmina rapidamente em solução de HCl, e depois em água corrente, deixar secar ao ar. Incubar a lâmina em solução salina de 2xSSC à 60°C, por 30 minutos. Lavar em água corrente e secar ao ar. Corar com Giemsa 5% durante 5-10 minutos. Lavar em água corrente.

6. Hibridação *in situ* por fluorescência – FISH

6.1 Preparação da sonda

Marcação da sonda: método de nick translation utilizando o Kit BioNick™ Labeling System (Invitrogen). Mix para uma lâmina: 1µl de DNA (200ng/µl); 1µl de dNTP mix; 1 µl de mix; H₂O para completar 9µl.

1. Misturar bem, centrifugar brevemente e incubar por 30 minutos a 16°C (no termociclador);
2. Parar a reação com a adição de 1µl de Stop Buffer;
3. Acrescentar 1/10 do volume (1µl) de acetato de Sódio 3M e o dobro do volume (22µl) de etanol 100% gelado;
4. Misturar invertendo o tubo, centrifugar rapidamente e colocar no freezer – 70°C por 1 hora;
5. Centrifugar por 15 minutos a 15.000 rpm a 4°C;
6. Descartar o sobrenadante e adicionar 50 µl de etanol 70% gelado;
7. Centrifugar por 5 minutos a 15.000 rpm a 4°C;
8. Descartar o sobrenadante com cuidado e deixar secar;
9. Ressuspender em 6µl de água Milli Q.

6.2. Preparação cromossômica

Usar lâminas recém preparadas, ou descongelar as lâminas em temperatura ambiente uma hora antes do uso. Desidratar as lâminas em álcool 70, 85 e 100% gelados, por 5 minutos cada.

6.3. Desnaturação dos cromossomos

1. Preparar 60 mL de formamida 70% em concentração final de 2xSSC, pH 7,0 a 67°C.
2. Verificar temperatura e pH.
3. Desnaturar as lâminas por 2 min (dependendo da qualidade do material).
4. Desidratar em série alcoólica gelada, 70, 80 e 100%, 2 minutos cada.

Solução de hibridação:

1. Em um tubo Eppendorf contendo 6µl da sonda adicionar 15µl de formamida (concentração final 50%), 6µl de sulfato de dextrano 50% (concentração final 10%) e 3µl de 20xSSC (concentração final de 2xSSC).

2. Desnaturar a sonda a 95°C por 5 minutos e passar imediatamente ao gelo.

6.4. Hibridação

1. Colocar 30µl de solução de hibridação sobre a lamínula e inverter a lâmina sobre a lamínula.
2. Manter as lâminas com o material voltado para baixo em câmara úmida (2xSSC) a 37°C *overnight*.
3. Remova a lamínula.
4. Lavar em 2xSSC, pH 7,0 a 72°C, em banho sem agitação, por 5 minutos.
5. Transferir para PBD a temperatura ambiente para proceder à detecção.

7. Medidas cromossômicas

Os cromossomos terão sua morfologia estabelecida de acordo com a relação de braços (RB), segundo as proporções propostas por Levan et al. (1964), e serão classificados em: metacêntricos (RB de 1,00 a 1,70), submetacêntricos (RB de 1,71 a 3,00), subtelocêntrico (RB de 3,01 a 7,00) e acrocêntricos (RB maior que 7,00).

7.1 Montagem dos cariótipos

Feitas as medidas cromossômicas e estabelecido o número de cromossomos metacêntricos (M), submetacêntricos (SM), subtelocêntricos (ST) e acrocêntricos (A), os cromossomos serão arranjados segundo o tipo (M, SM, ST e A) e em ordem decrescente de tamanho.

RESULTADOS ESPERADOS

O presente mini-curso deverá proporcionar ao aluno, entendimento sobre as técnicas utilizadas nos estudos de citogenética de peixes, bem como sua aplicabilidade, como instrumento de estudo evolutivo e sistemático. Além de proporcionar a compreensão das relações genéticas entre os peixes, através das diferenças cariotípicas na macro e microestrutura cromossômica das espécies.

REFERÊNCIAS

ARTONI, R. F.; VICARI, M. R.; BERTOLLO, L. A. C. Cytogenetics of the Neotropical fishes: methods, results and perspectives. *Biology and Health Sciences* 6: 43-60, 2000.

BERTOLLO, L. A. C.; TAKAHASHI, C. S.; MOREIRA-FILHO, O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Brazilian Journal of Genetics* 2: 103-120, 1978.

COLE, C. J.; LEAVENS, C. R. Chromosome preparations of amphibians and reptiles: improved technique. *Herpetological Review* 3:102, 1971.

EGOZCUE, J. Estudios cromosómicos. Preparaciones directas. In: *Técnicas en Citogenética*: 15-37. Editorial Espaxs, Barcelona, 197.

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

LEE, M. R.; ELDER, F. F. B. Yeast stimulation of bone marrow mitosis for cytogenetic investigations. *Cytogenetic and Genome Research* 26: 36-40, 1980.

LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANDBERG, A. A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220, 1964.

NELSON, J.S. *Fishes of the world*. 4rd ed., John Wiley & Sons, Inc. 600 pp. 2006.

OLIVEIRA, C.; TOLEDO, L. F. A.; FORESTI, F.; BRITSKI, H. A.; TOLEDO FILHO, S. A. Chromosome formulae of neotropical freshwater fishes. *Brazilian Journal of Genetics* 11: 577-624, 1988.

OLIVEIRA, C.; FORESTI, F.; HILSDORF, A. W. S. Genetics of neotropical fish: from chromosomes to populations. *Fish Physiology and Biochemistry* 35:81–100, 2009.

SCHAEFER, S. A. Conflict and resolution: impact of new taxa on phylogenetic studies of the neotropical cascudinhos (Siluroidei: Loricariidae). Porto Alegre: *Edipucrs*, 375-400, 1998.

SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromat. *Experimental Cell Research* 75: 304-306, 1972.