



Universidade Estadual de Maringá

**Mini-Curso**

**Citogenética de Peixes: do Clássico ao Molecular**

Prof: Ana Luiza de Brito Portela Castro

Prof: Ana Camila Prizon

Prof: Andréa Cius

Prof: Isabelle Pereira Mari

Maringá - PR

2016

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO .....	3
MATERIAS E MÉTODOS.....	4
1. Análises citogenéticas .....	4
2. Estimulação de mitoses: .....	5
3. Preparação de Cromossomos Mitóticos: .....	5
4. Técnica “Air Drying” (BERTOLLO et al., 1978): .....	5
5. Bandeamentos Cromossômicos: .....	6
5.1 Técnica De Nitrato De Prata (AgNOR) - HOWELL e BLACK (1980) .....	6
5.2.1 Bandejamento C - SUMMER (1972).....	7
6. Hibridação in situ por fluorescência - (FISH) com sondas de DNAr 18S e 5S - PINKEL et al., 1986.....	8
6.1. Marcação da sonda por Nick Translation (Kit Bionick Labeling System).....	8
6.2. Marcação da sonda por Nick Translation (Kit Nick Translation Biotin ou Digoxigenin.....	9
6.3. Fluorescent in situ hybridization.....	9
7. Medidas cromossômicas: .....	10
7.1 Montagem dos cariótipos: .....	11
RESULTADOS ESPERADOS .....	11
REFERÊNCIAS .....	11

## 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, possuindo hoje esta região uma ictiofauna muito rica, contendo cerca de 60 famílias e, aproximadamente 2800 espécies conhecidas (Schaeffer, 1998). Entretanto, estima-se que existam cerca de 8.000 espécies de peixes de água doce neotropicais. Essa fauna extremamente complexa é do ponto de vista evolutivo, um grande produto do mundo biológico.

Nas duas últimas décadas a Citogenética vem contribuindo significativamente para um melhor conhecimento da biodiversidade em peixes neotropicais, apresentando uma somatória de informações e descobertas relativas a processos evolutivos nesse grupo, tais como rearranjos cromossômicos, polimorfismos estruturais e/ou numéricos, poliploidia natural, sistemas de cromossomos sexuais, distribuição geográfica de espécies/populações. Hoje, estima-se que existam disponíveis para a citogenética, 475 espécies de Characiformes, 318 espécies de Siluriformes, 48 espécies de Gymnotiformes, 199 espécies de água doce, não pertencem a superordem Ostariophysi e apenas 109 espécies de água salgada. (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 caracteres morfométricos e merísticos. Além disso, o conhecimento da estrutura dos cromossomos, através de mapeamento de sequências gênicas utilizando técnicas de FISH (Hibridação fluorescente “*in situ*”) 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 Ag-NORs (regiões organizadoras de nucléolos) e de citogenética molecular (FISH).

### **Objetivos específicos**

- Obter cromossomos mitóticos através da técnica de suspensão celular.
- Caracterizar a morfologia cromossômica da espécie alvo.
- Empregar as técnicas de bandeamento cromossômico como distribuição das regiões de heterocromatina constitutiva (banda C) e regiões organizadoras de nucléolos (Ag-NORs).
- Conhecer as técnicas de citogenética molecular como Hibridação Fluorescente “*in situ*” (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 foi o seguinte:

1. Preparar uma solução de fermento biológico (Fleischmann) na seguinte proporção: 0,5 g de fermento, 0,5 g de açúcar e 7 ml de água destilada.
2. Incubar a solução em banho-maria (40°C) por cerca de 20 minutos.
3. Injetar a solução dorso-lateralmente no peixe na proporção de 1 ml por 100 g de peso do animal.
4. Deixar o animal em aquário bem aerado por 48 ou 72 horas.

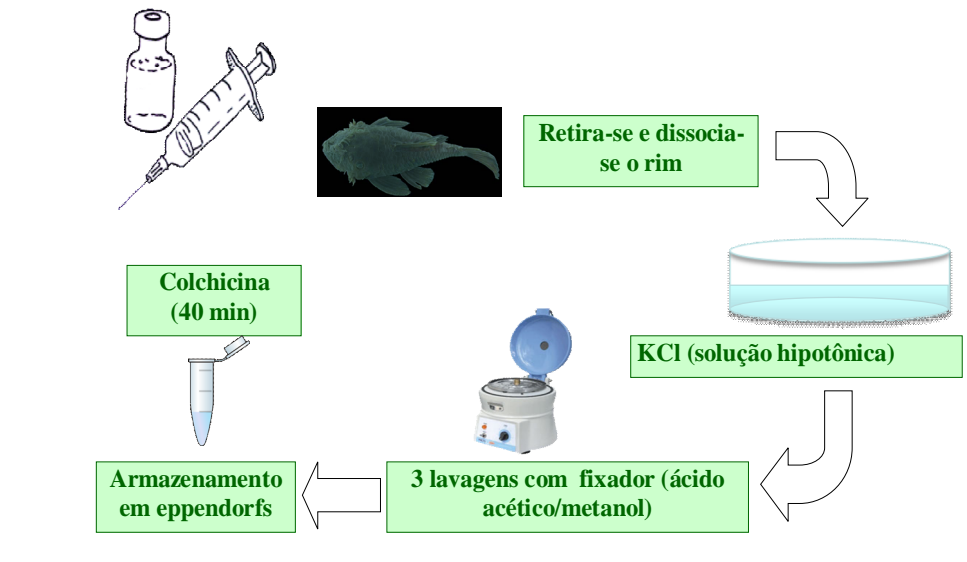
## **3. Preparação de Cromossomos Mitóticos:**

As preparações do material, para análise dos cromossomos mitóticos, serão feitas utilizando-se a porção cefálica do rim, de acordo com a técnica “air drying” descrita por Egozcue (1971) e modificada para peixe por Bertollo (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 por 30 a 60 minutos, sacrificando-o e retirando os órgãos desejados; hipotonizar o tecido em solução de KCl (0,075) e fixar em fixador (3 partes de álcool metílico: 1 parte de ácido acético). Após obter uma suspensão celular, pingar 3 a 4 gotas em uma lâmina e deixar secar. As lâminas com a suspensão celular serão coradas com Giemsa diluído a 5% em tampão fosfato pH 6,8, durante 5 minutos, para análise convencional e submetidas a diferentes tratamentos de bandeamentos cromossômicos.

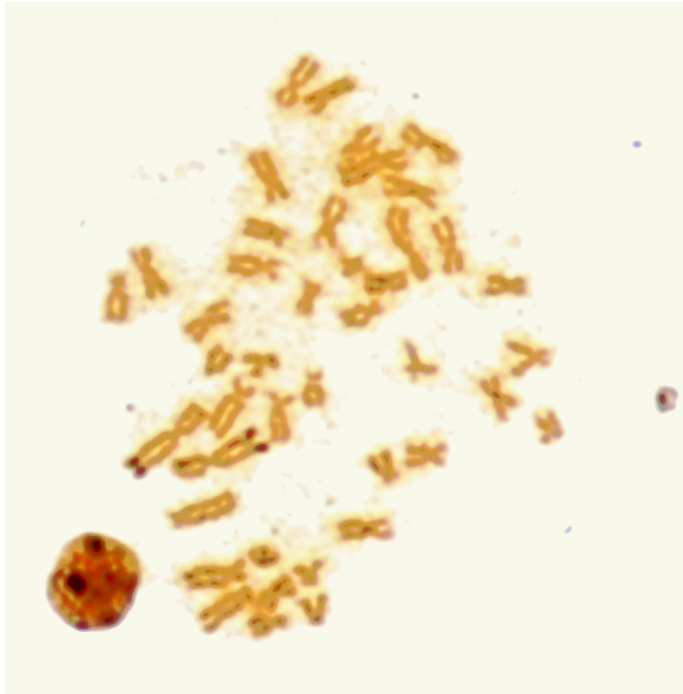
## Processamento do material



### 5. Bandeamentos Cromossômicos:

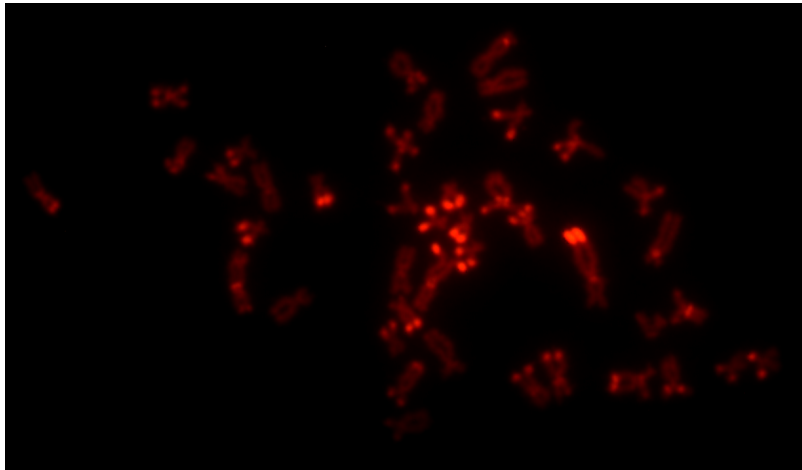
#### 5.1 Técnica De Nitrato De Prata (AgNOR) - HOWELL e BLACK (1980)

De posse da lâmina já contendo o material para análise, hidrolisá-la por 3 minutos em HCl 1N a 60°C, em estufa. Lavar em água corrente e secar ao ar. Pingar uma gota de solução aquosa de gelatina em dois pontos distintos da lâmina, sobre estas gotas adicionar uma gota de água deionizada. Adicionar sobre as gotas anteriores, duas gotas de solução de nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>), e cobrir a lâmina com lamínula. Incubar em estufa a 60°C por um período de 3-5 minutos, ou até que a solução adquira uma coloração caramelada. Lavar em água corrente e secar ao ar, analisar em microscópio.



### 5.2.1 Bandeamento C - SUMNER (1972)

Tratar a lâmina já contendo as gotas do material para análise, com HCl em temperatura ambiente em estufa, por 15 minutos. Lavar a lâmina em água corrente e secar ao ar. Incubar em solução salina de 2xSSC, a 60°C em banho-maria por 15 minutos. Lavar em água corrente e secar ao ar. Incubar a lâmina por 30 segundos em solução de hidróxido de bário (BaOH), em banho-maria a 42°C, com o BaOH sendo recém preparado e filtrado. Lavar a lâmina rapidamente em solução de HCl, e depois em água deionizável, deixar secar ao ar. Incubar a lâmina em solução salina de 2xSSC a 60°C, por 1 hora. 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) com sondas de DNAr 18S e 5S - PINKEL et al. (1986)**

Serão utilizadas duas sondas para o mapeamento físico destas sequências sobre os cromossomos: uma sonda de DNAr 18S, obtida do DNA nuclear de *Prochilodus argenteus* (HATANAKA e GALETTI, 2004) e uma sonda de DNAr 5S, isolada a partir do DNA genômico de *Leporinus elongatus* (MARTINS e GALETTI, 1999) e uma sonda para sequência telomérica de eucariotos (IJDO et al., 1991).

### **6.1. Marcação da sonda por Nick Translation (Kit Bionick Labeling System)**

Pipetar os seguintes componentes em tubo de 1,5 ml no gelo: xl água qsp; 7,5l de dNTP Mix 10x com dATP mais biotina; x l de DNA sonda (equivalente a 1,6 g); 7,5 l de Enzima (DNase + DNA polimerase I) (o volume final da reação deve ser 45 l e o volume de água a ser colocado dependem da concentração da sonda). Misturar, centrifugar brevemente (cerca de 5 Seg) e incubar a 16°C durante 2 horas. Terminada às 2 horas coloque o tubo no gelo e cheque em gel o tamanho dos fragmentos (deve ser menor que 500 pb). Adicionar 7,5 l de stop buffer. Precipitar o DNA com 5 l de acetato de sódio 3M e 100 l de etanol PA. Incubar a -20°C overnight. Centrifugar a 14.000 rpm por 10 min. Descartar o sobrenadante e lavar o pellet com 50 l etanol 70%. Centrifugar a 14.000 rpm 5 min. Descartar o sobrenadante, secar em estufa a 37°C e diluir em xl de água (para uso imediato) ou TE (para ser armazenada por um período maior).



## **6.2. Marcação da sonda por Nick Translation (Kit Nick Translation Biotin ou Digoxigenin)**

Pipetar os seguintes componentes em tubo de 1,5 ml no gelo: x 1 água qsp; x 1 sonda (1g); 4 l mix de nick (Completar para o volume total de 20 l). Interromper com 1 l de EDTA 0,5 M pH 8,0. Aquecer por 10 min à 65 C.

## **6.3. Fluorescent in situ hybridization**

Tratamento com RNase: Lavar as lâminas em tampão PBS 1x durante 5 min. em temperatura ambiente (shaker). Desidratar as lâminas em série alcoólica 70, 85 e 100%, 5 min cada (secar). Incubar as lâminas em 100 l de RNase (0,4% RNase/2xSSC) a 37°C por 1h em câmara úmida com água milli-Q. Lavar 3 x por 5 min em 2xSSC. Lavar durante 5 min em PBS 1x.

Fixação: Fixar em formaldeído 1% em PBS 1x/50mM MgCl<sub>2</sub> durante 10 min a temperatura ambiente. Lavar em PBS 1x por 5 min. (shaker). Desidratar as lâminas em série alcoólicas (70, 85, 100 %) por 5 min cada.

Pré-hibridação: Simultaneamente a desidratação em série alcoólica desnaturar a solução de hibridação a 100°C por um período de 10 min e passá-la imediatamente ao gelo. Desnaturar o DNA cromossômico com formamida 70% em 2xSSC a 70°C por 5 min. Desidratar o material em série alcoólica 70, 85 e 100% durante 5 min cada.

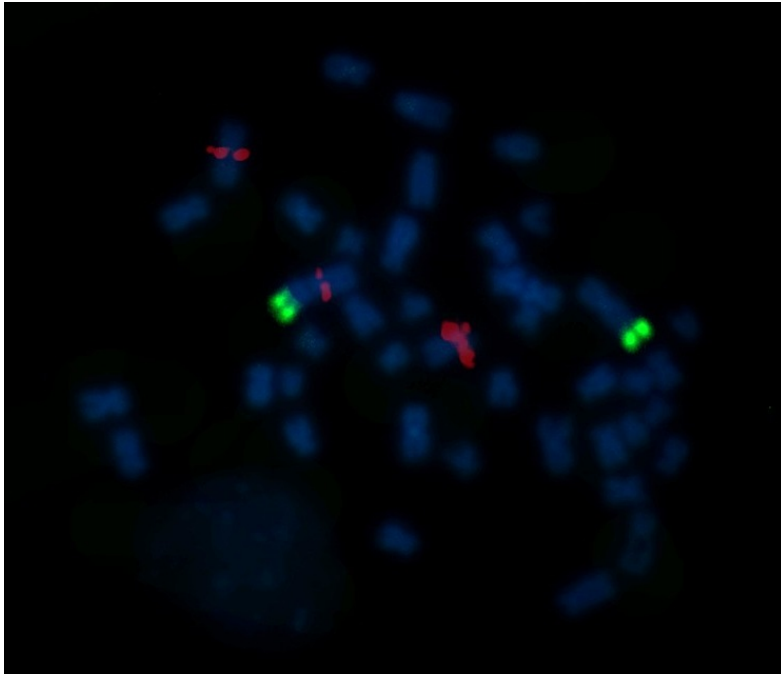
Hibridação: Preparar a câmara úmida a 37°C. Montar cada lâmina com 40 l de solução de hibridação, cobrir com lamínula e deixar overnight a 37°C. (Solução de Hibridação: (estrिंगência 77%) duas sondas (DOUBLE FISH) (200 µl Formamida (50% de Formamida); 80 µl Sulfato de Dextrano 50% (conc final de 10%); 40 µl de 20xSSC (conc final 2xSSC); 8 µl DNA de placenta 10mg/ml (1µl/ lâmina); 36 µl de H<sub>2</sub>O qsp. Acrescentada a sonda A; 36 µl de H<sub>2</sub>O qsp. Acrescentada a sonda B; Volume final 400 µl.

Lavagens: Lavar 2 vezes em formamida 15%/0,2xSSC pH 7.0 a 42°C durante 10min cada (Shaker). Lavar durante 5min em solução de Tween 0,5%/4xSSC, ambiente (Shaker).

Bloqueio: Incubar as lâminas em tampão 5% NFDm/4xSSC por 15 minutos. Obs: Antes de incubar alicotar 5 tubos com 1000 l cada do tampão 5% NFDm/4xSSC. Lavar 2 x 5min com Tween 0,5%/4xSSC, ambiente (Shaker);

Detecção de duas sondas DOUBLE FISH: Montar um mix contendo 994 µl NFDm + 1µl de avidina FITC conjugada + 5µl de antidigoxigeninarodamina conjugada. Incubar as lâminas com 100 l cada do mix de anticorpos durante 1 h em câmara úmida e escura, a temperatura ambiente. Lavar 3 x 5min com Tween 0,5%/4xSSC, ambiente (Shaker). Desidratar em álcool 70, 85 e 100%, 5 min. cada (secar).

Montagem das lâminas com DAPI: Misturar 400 l de antifading mais 1 l de dapi (0,2 mg/mL). Colocar 50 l da mistura e cobrir com lamínula. Guardar no escuro.

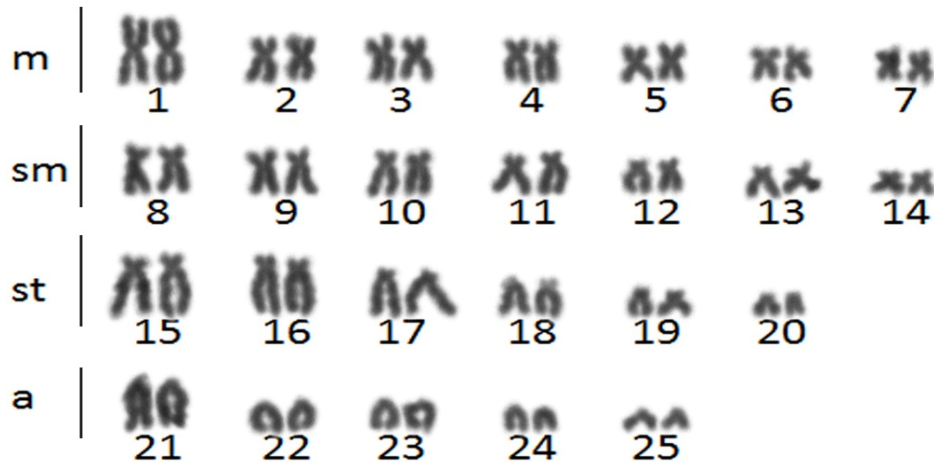


## 7. Medidas cromossômicas:

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, um melhor entendimento sobre a citogenética de peixes e a sua aplicabilidade, como instrumento de estudo evolutivo e ferramenta sistemática, detectando diferenças cariotípicas na macro e microestrutura cromossômica da espécie, buscando uma melhor compreensão das suas relações genéticas.

### REFERÊNCIAS

ARTONI, R.F.; VICARI, M.R. and BERTOLLO, L.A.C. Cytogenetics of the Neotropical fishes: methods, results and perspectives. Publication/ UEPG: **Biol. Health Scien** 6(1): 43-60, 2000.

BERTOLLO, L.A.C.; TAKAHASHI, C.S. and MOREIRA-FILHO, O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Revista Brasileira de Genética**, 2: 103-120, 1978.

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

LEVAN, A., FREDGA, K. and 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.; FORESTI, F., HILSDORF, A.W.S.. Genetics of neotropical fish: from chromosomes to population. **Fish Physiol Biochem**, 35:81–100, 2009.

PINKEL, D., STRAUME T. and GRAY, J.W. Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. **Proc Natl Acad Sci USA**, 83: 2934-2938, 1986.

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 heterocromation. **Exptl. Cell Res. Research**, 75: 304-306, 1972.