

FABRICIO DOS ANJOS SANTA ROSA

ESTUDOS CITOGENÉTICOS EM DUAS ESPÉCIES DO GÊNERO
Apteronotus (APTERONOTIDAE-GYMNOTIFORMES) COLETADOS EM
RIOS DA REGIÃO AMAZÔNICA

Belém – PA
2017

FABRICIO DOS ANJOS SANTA ROSA

ESTUDOS CITOGENÉTICOS EM DUAS ESPÉCIES DO GÊNERO
Apteronotus (APTERONOTIDAE-GYMNOTIFORMES) COLETADOS EM
RIOS DA REGIÃO AMAZÔNICA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Faculdade de Ciências Biológicas do Instituto de
Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará
como requisito à obtenção do grau de Licenciado em
Ciências Biológicas.

Orientador: Prof^a Dr^a. Cleusa Yoshiko Nagamachi

Belém – PA
2017

FABRICIO DOS ANJOS SANTA ROSA

ESTUDOS CITOGENÉTICOS EM DUAS ESPÉCIES DO GÊNERO
Apteronotus (APTERONOTIDAE-GYMNOTIFORMES) COLETADOS EM
RIOS DA REGIÃO AMAZÔNICA

Orientador: Prof^a Dr^a. Cleusa Yoshiko Nagamachi
Instituto de Ciências Biológicas – UFPA.

Avaliador: Prof. Dr. Danillo dos Santos Silva
Universidade do Estado do Pará – UEPA (Campus Marabá)

Avaliador: Milla de Andrade Machado
Instituto de Ciências Biológicas - UFPA

Belém – PA
2017

“Mais importante que sonhar é saber cultivar os seus sonhos”

*Á toda a família Santa Rosa, em especial ao
meu avô Romualdo (in memorian), que sempre
preencheu minha vida com sentimentos
paternais verdadeiros.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Prof^a Dr^a Cleusa Yoshiko Nagamachi, primeiramente por me proporcionar a oportunidade de estágio no Laboratório de Citogenética, pela Bolsa de Iniciação científica conferida a mim por todo o período de estágio e por sempre me incentivar a progredir profissionalmente.

Ao Prof^o Dr. Julio Cesar Pieczarka pela infraestrutura do laboratório e por administrar tudo da melhor maneira possível.

À todos do Laboratório de Citogenética, em especial a Ananda, Bruno, Fernando, Inaê, Luciano e Milla, que sempre estiveram presentes me auxiliando nas técnicas e pela agradável companhia nas coletas.

Agradeço à minha família pelo apoio em todas as vertentes da minha vida, em especial a minha avó Iracema dos Anjos, minha tia Irene dos Anjos, minha mãe Maria dos Anjos e meu avô Romualdo Santa Rosa (*in memoriam*) pela companhia diária e por todo o amor dado a mim.

Aos meus tão especiais amigos do ensino fundamental e médio Bernardo Barros, Bruna Almeida, Jéssica Abdon e Junne Vanessa, por todas as risadas em momentos difíceis e por continuarem nutrindo um sentimento verdadeiro por mim mesmo com os meus sumiços.

Aos meus amigos de graduação Felipe Matheus, Gabriel Aztec, José Antônio, Magno Dias, Sérgio Pereira e Yan Rafael pelas parcerias nas missões da graduação, pelas infinitas coberturas jogando pelo Biocelona e pelos sorrisos sinceros de uma amizade verdadeira. Tamo junto, manos.

À Universidade Federal do Pará por toda infraestrutura e profissionais proporcionados que auxiliaram direta ou indiretamente no desenvolvimento deste trabalho.

À todas as instituições e órgãos que deram apoio: CNPq, CAPES (Edital Pro-Amazônia), UFPA, IBAMA, IDSM, FAPESPA.

SUMÁRIO

RESUMO -----	v
1.INTRODUÇÃO -----	1
1.1 A ORDEM GYMNOTIFORMES-----	1
1.2. A FAMÍLIA APTERONOTIDAE: ÊNFASE NO GÊNERO <i>Apteronotus</i> -----	2
1.3. CITOGENÉTICA NA FAMÍLIA APTERONOTIDAE: ÊNFASE NO GÊNERO <i>Apteronotus</i> -----	4
2.OBJETIVOS -----	4
3.MATERIAL E MÉTODOS -----	4
3.1. AMOSTRA -----	4
3.2. PREPARAÇÕES CROMOSSÔMICAS -----	5
3.2.1.Técnica de indução de mitoses e obtenção de cromossomos metafásicos -----	5
3.3. PREPARAÇÃO CITOLÓGICA DAS LÂMINAS -----	6
3.4. CITOGENÉTICA CLÁSSICA -----	6
3.4.1.Coloração convencional -----	6
3.4.2.Bandeamento C -----	7
3.4.3.Deteção de NOR por impregnação de nitrato de prata (Ag-NOR) -----	7
3.5. HIBRIDIZAÇÃO <i>IN SITU</i> FLUORESCENTE (FISH) -----	7
3.5.1.Preparação das lâminas -----	8
3.5.2.Desnaturação cromossômica -----	8
3.5.3.Hibridização -----	8
3.5.4.Lavagem de estringência -----	9
3.5.5.Deteção das sondas -----	9
3.6. ANÁLISE DAS PREPARAÇÕES CROMOSSÔMICAS -----	9
3.7. CLASSIFICAÇÃO MORFOLÓGICA CROMOSSÔMICA -----	9
3.8. ELABORAÇÃO DOS MAPAS -----	10
4.RESULTADOS -----	10
5.DISSCUSSÃO -----	12
6.CONCLUSÃO -----	15
7.REFERÊNCIAS -----	16

RESUMO

A família Apterontidae é um grupo de peixes elétricos Neotropicais amplamente distribuída desde o Panamá até o norte da Argentina, possuindo maior abundância e diversidade na bacia Amazônica. Apesar de o grupo possuir grande número de espécies formalmente descritas (86 espécies agrupadas em 15 gêneros), estudos citogenéticos foram realizados apenas nas espécies *Apterontus albifrons*, *Parapterontus hasemani*, *Sternarchogiton preto* e *Sternarchorhamphus muelleri*. No presente trabalho estudamos os cariótipos das espécies *Apterontus albifrons*, com um exemplar procedente do Furo do Paruru (Pará) e *Apterontus bonapartii*, com três exemplares procedentes do Alto Rio Solimões (Amazonas). Os cariótipos foram analisados utilizando as técnicas de coloração convencional, bandeamento C, Ag-NOR e FISH (*Fluorescent in situ hybridization*) com sondas telomérica, de rDNA 5S e 18S. Os resultados mostram que *A. albifrons* apresenta $2n=24/NF=40$ semelhante ao descrito na literatura para exemplares de outras regiões do Brasil. O cariótipo de *A. bonapartii* está sendo descrito pela primeira vez e mostra $2n=52/NF=94$. O bandeamento C teve como resultado evidente a marcação na região pericentromérica da maioria dos cromossomos de ambas as espécies, sendo observada em alguns pares a marcação de todo um braço. As técnicas Ag-NOR e FISH com rDNA 18S mostram que a NOR ocorre em apenas um par em ambas as espécies, marcando em *A. albifrons* na região distal do braço longo do par 4 e em *A. bonapartii*, na região distal do braço curto do par 3, apresentando heteromorfismo de tamanho neste. A FISH com sonda de rDNA 5S evidenciou marcação em um par cromossômico em ambas as espécies, sendo que em *A. albifrons* as sequências se encontram nas regiões intersticiais de ambos os braços dos cromossomos do par 2 e em *A. bonapartii* as sequências se encontram na região distal do braço curto do par 9, possuindo heteromorfismo de tamanho. A hibridização com a sonda telomérica revelou marcações nas regiões distais de todos os cromossomos de ambas as espécies, não sendo observadas sequências teloméricas intersticiais.

Palavras-chave: cromossomos, citogenética molecular, peixe elétrico neotropical

1. INTRODUÇÃO

1.1 A ORDEM GYMNOTIFORMES

A ordem Gymnotiformes é constituída por um grupo de peixes neotropicais cuja distribuição é extremamente ampla nas Américas Central e do Sul, onde as bacias hidrográficas dos rios Amazonas e Orinoco e de toda a região da Guiana concentram a maior parte da diversidade, com mais de 76,3% de todas as espécies (Crampton, 2011). Tem como característica mais marcante a presença de órgãos elétricos e eletro receptores distribuídos pelo corpo que são fundamentais para a relação do organismo com o seu ambiente, pois proporcionam a estes animais a capacidade de gerar e detectar campos elétricos, permitindo-os perceber qualquer objeto que possua uma condutividade diferente da água (Lissmann, 1958). Estes atributos diferenciados são utilizados para localizar objetos (Figura 1), possíveis predadores, presas e demais organismos, além de para o estabelecimento de contato com indivíduos da mesma espécie (Stoddard, 1999; Markham, 2013).

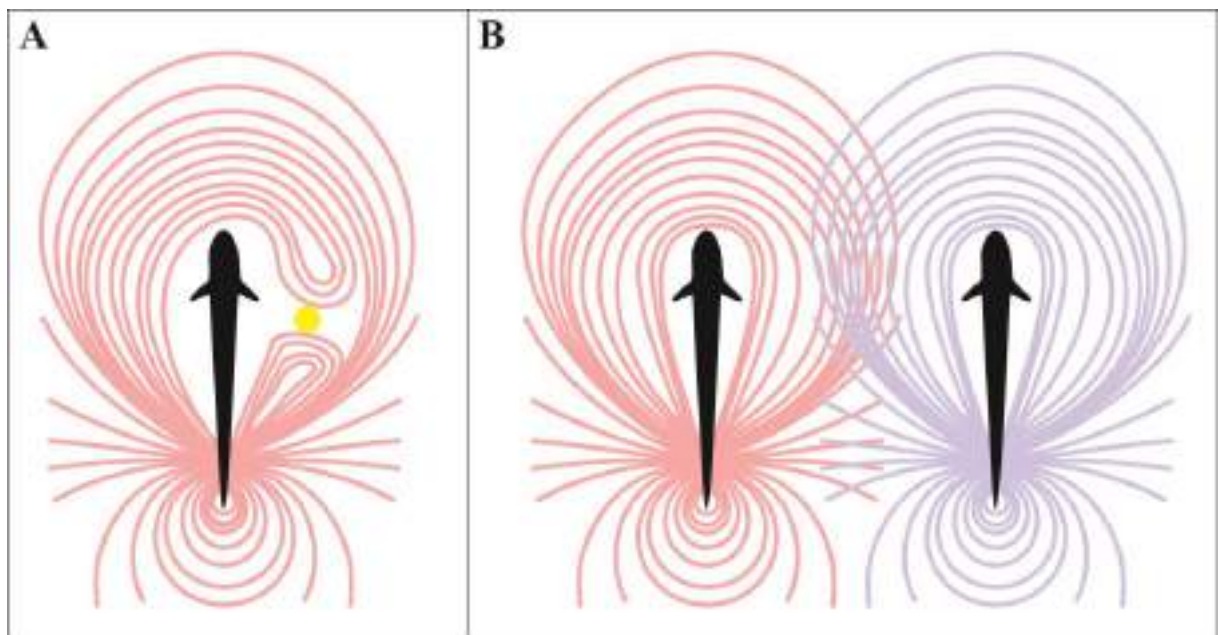


Figura 1: A) Eletrorecepção: objeto causando distorção no campo elétrico. B) Eletrocomunicação: troca de sinais intra e/ou interespecífica.

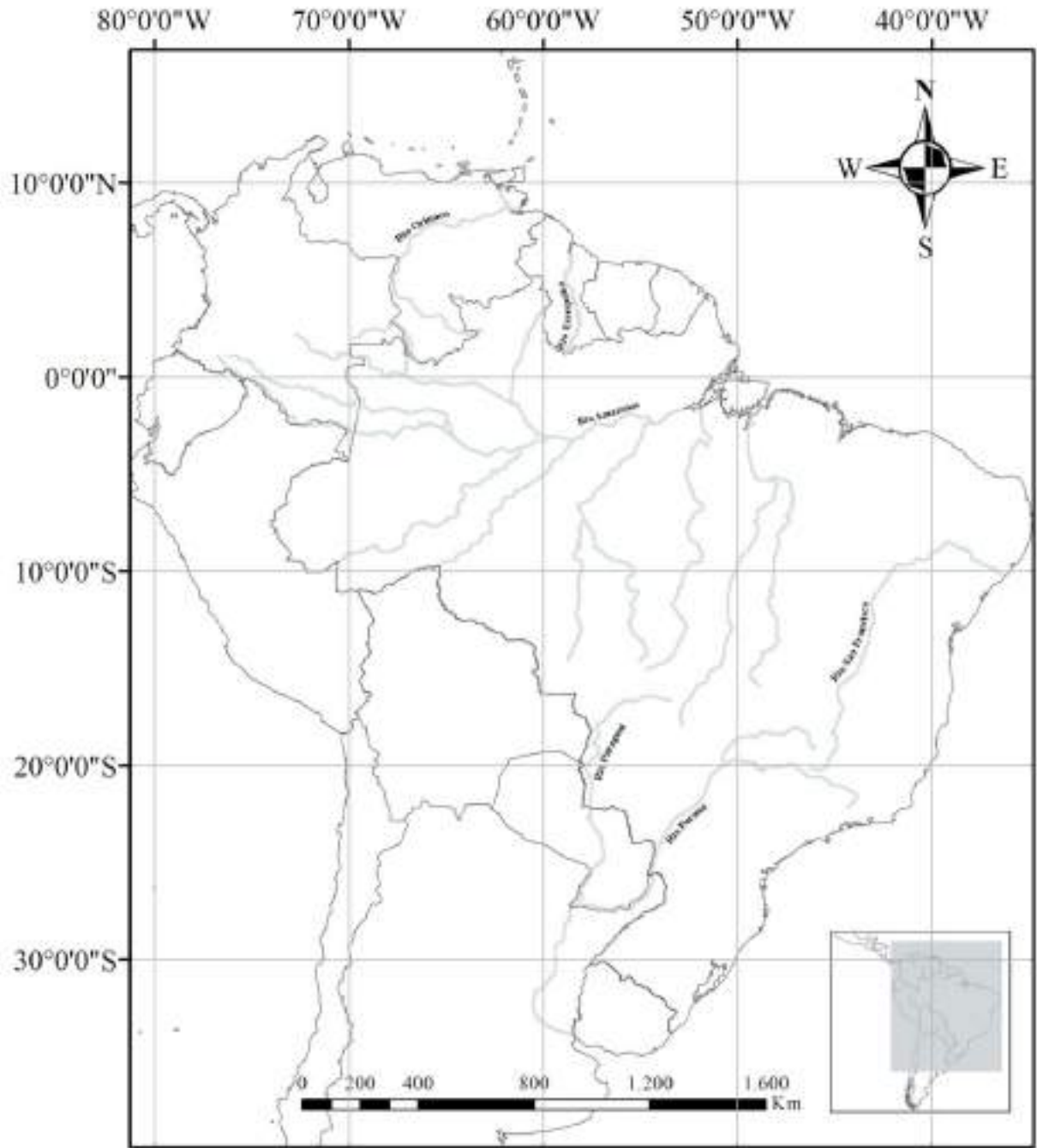
Estudos cladísticos interfamiliares de Gymnotiformes, baseados em caracteres morfológicos e moleculares, agrupam a ordem em cinco famílias: Apterontidae, Gymnotidae, Hipopomidae, Rhamphichthyidae e Sternopygidae (Albert & Campos-Da-Paz,

1998; Tagliacollo *et al.*, 2016). Possuem 34 gêneros viventes agrupando 219 espécies válidas (Tagliacollo *et al.*, 2016).

1.2. A FAMÍLIA APTERONOTIDAE: ÊNFASE NO GÊNERO *Apteronotus*

A família Apterontidae (Gymnotiformes) é constituída por 15 gêneros e cerca de 86 espécies (De Santana, 2007; De Santana & Crampton, 2010; Lundberg *et al.*, 2013) com ampla área de ocorrência, desde o Panamá até o norte da Argentina (Mago-Leccia, 1994; Silva *et al.*, 2014a). Os representantes desta família se diferenciam dos demais Gymnotiformes por algumas sinapomorfias, como a presença de nadadeira caudal, órgãos elétricos do tipo neurogênico (Triques, 2005) e descarga do órgão elétrico do tipo onda (Albert & Crampton, 2005).

O gênero *Apteronotus* (Apterontidae-Gymnotiformes) apresenta cerca de 23 espécies (Triques, 2011) com distribuição extremamente ampla na América do Sul, ocorrendo nas bacias dos rios Amazonas, Orinoco, Paraná, Paraguai, São Francisco, Essequibo e rios costeiros das Guianas (De Santana, 2007). Espécies desse gênero possuem hábitos noturnos, permanecendo durante o dia no interior de troncos e de vegetação submersa (De Santana, 2007).



Legenda

— Rios que apresentam espécies de *Apterionotus*

Figura 2: Mapa de distribuição de espécies do gênero *Apterionotus*.

1.3. CITOGENÉTICA NA FAMÍLIA APTERONOTIDAE: ÊNFASE NO GÊNERO *Apteronotus*

Estudos citogenéticos na família Apterontidae (Tabela 1) estão restritos às espécies *Parapteronotus hasemani* ($2n=52$; Silva *et al.*, 2014a), *Sternarchogiton preto* ($2n=52$; Silva *et al.*, 2014a), *Sternarchorhamphus muelleri* ($2n=32$; Silva *et al.*, 2014a) e *Apteronotus albifrons*, que possui número diplóide variando de $2n=22$ (Hinegardner & Rosen, 1972) à 24 (Howell, 1972; Almeida-Toledo *et al.*, 1981), e $2n=24$ com descrição de cromossomos B (Mendes *et al.*, 2012).

Tabela 1: Sumário dos cariótipos de espécies da família Apterontidae

Espécie	Sexo	Localidade	2n	Fórmula cromossômica	Referência
<i>Parapteronotus hasemani</i>	♀/♂	Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá (AM)	52	36 m/sm+16 st/a	Silva <i>et al.</i> (2014)
<i>Sternarchogiton preto</i>	♀/♂	Rio Caripetuba (PA)	52	38 m/sm+14 st/a	Silva <i>et al.</i> (2014)
<i>Sternarchorhamphus muelleri</i>	♂	Rio Anequara (PA)	32	28 m/sm+4 st/a	Silva <i>et al.</i> (2014)
<i>Apteronotus albifrons</i>	♀/♂	Ilha do Marajó (PA)	24	16 m/sm+8 st/a	Almeida-Toledo <i>et al.</i> (1981)
	-	Furo do Paruru (PA)	24	16 m/sm+8 st/a	Presente Estudo
	-	-	22	-	Hinegardner & Rosen (1972)
	♀/♂	Alto do Rio Paraná (PR)	24	16 m/sm+8 st/a	Mendes <i>et al.</i> (2012)
	-	-	24	16 m/sm+8 st/a	Howell (1972)
<i>Apteronotus bonapartii</i>	-	Alto do Rio Solimões (AM)	52	42 m/sm+10 st/a	Presente Estudo

2n, número diplóide; AM, Amazonas; PA, Pará; PR, Paraná; ♀, fêmea; ♂, macho; m-sm, metacêntrico-submetacêntrico; st-a, subtelocêntrico-acrocêntrico.

2. OBJETIVOS

No presente trabalho são estudados os cariótipos de duas espécies de *Apteronotus* da região amazônica, *Apteronotus bonapartii* (Castelnau, 1885) e *Apteronotus albifrons* (Linnaeus, 1766) por citogenética clássica (coloração convencional, bandeamento-C e marcação Ag-NO₃) e molecular (FISH com sondas de rDNA 18S, 5S e telomérica). São discutidas as diferenças cromossômicas entre os cariótipos das duas espécies e em relação aos cariótipos das espécies de Apterontidae descritos na literatura.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. AMOSTRA

Constituiu a amostra do presente estudo um espécime de *Apteronotus albifrons* de sexo indeterminado, que foi coletado no Furo do Paruru, Abaetetuba, Pará, Brasil e três exemplares de *Apteronotus bonapartii* de sexo indeterminado, que foram coletados no alto Rio Solimões, na Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá (RDSM), Amazonas, Brasil (Figura 3).

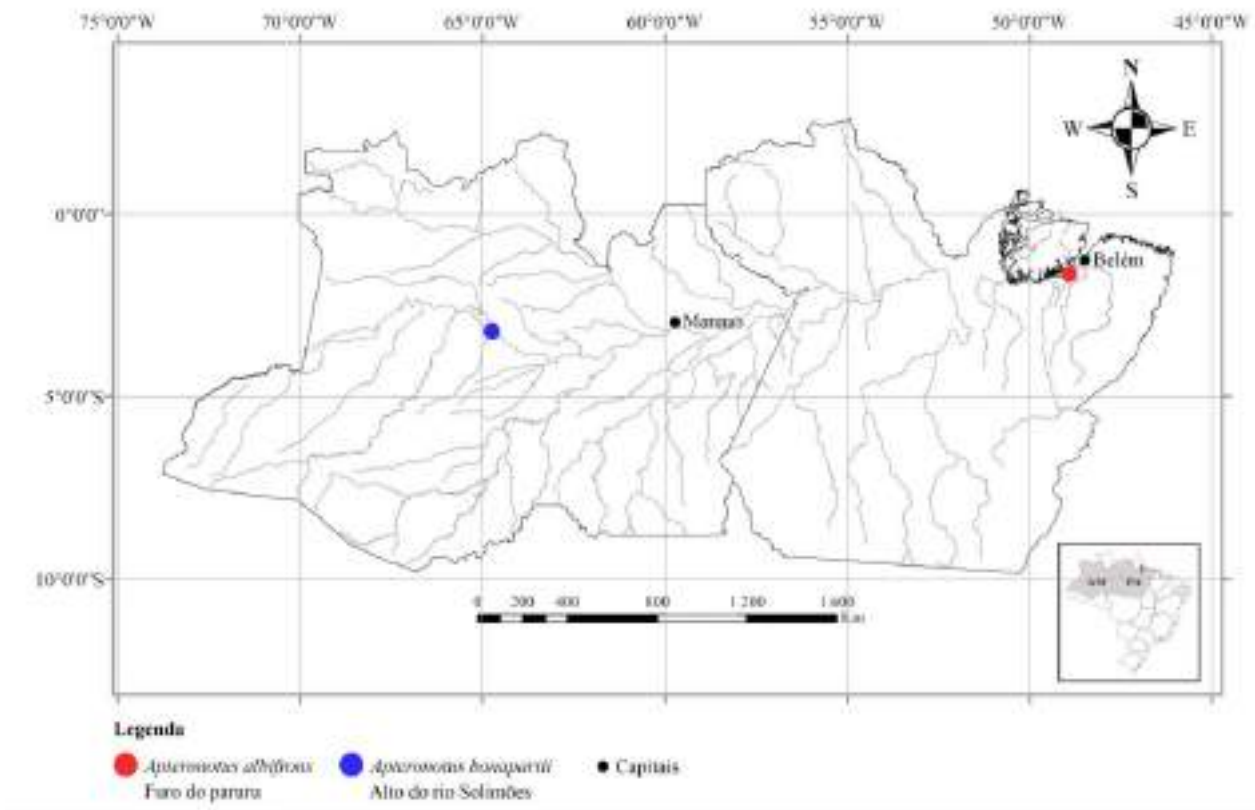


Figura 3: Mapa dos locais de coleta dos espécimes de *A. albifrons* e *A. bonapartii*.

Os peixes foram localizados com o auxílio de um detector de descargas elétricas e capturados com puçás de nylon ou com redes de arrasto. O armazenamento foi feito em baldes ou sacos plásticos (contendo água e oxigênio), onde permaneceram até o momento do processamento.

3.2. PREPARAÇÕES CROMOSSÔMICAS

3.2.1. Técnica de indução de mitoses e obtenção de cromossomos metafásicos

Os cromossomos metafásicos foram obtidos a partir de células renais através da técnica de extração direta adaptada para peixes por Bertollo *et al.* (1978).

A técnica para obtenção das metáfases consiste em injetar dorso-lateralmente uma solução aquosa de fermento biológico (0,5g de fermento biológico Fleischmann, 0,5g de sacarose dissolvido em 7 mL de água destilada) na proporção de 1mL/100g de peso do animal. O animal foi deixado por 24-72 horas em um aquário bem iluminado e areado e após esse período injetou-se dorso-lateralmente uma solução de colchicina a 0,025% na proporção de 1 mL/100g de peso do animal. O peixe foi mantido em aquário areado por 30 minutos e em seguida sacrificado para ser realizada a extração do rim. O rim foi colocado em uma placa de Petri contendo 5 mL de solução hipotônica de cloreto de potássio (5,9g de cloreto de potássio para 1 litro de água destilada) e dissociado com a ajuda de um macerador. Em seguida a suspensão obtida foi levada para a estufa a 37°C por 30 minutos e após esse tempo, adicionou-se 4 gotas de fixador Carnoy 3:1 (3 partes de metanol para 1 parte de ácido acético). O material foi ressuscitado com o auxílio de uma pipeta Pasteur e em seguida transferido para um tubo de centrífuga, para então ser centrifugado por 5 minutos a 1000 rpm, fazendo logo em seguida o descarte do sobrenadante e adicionando 5 mL do fixador Carnoy. Posteriormente foi feita uma nova ressuspensão do material, centrifugando-o em seguida. O descarte do sobrenadante foi feito novamente e adicionou-se o fixador para armazená-lo no freezer.

3.3.PREPARAÇÃO CITOLÓGICA DAS LÂMINAS

As lâminas para microscopia foram limpas e mantidas na geladeira em solução de etanol e éter etílico (na proporção 1:1). Para o uso, as lâminas foram secas com auxílio de um papel toalha e em seguida, com auxílio de uma pipeta Pasteur, foi feita a ressuspensão do material a ser pingado nas lâminas. Com o auxílio de uma micropipeta, pingou-se 12 µl da suspensão celular gelada sobre as lâminas, que posteriormente foram deixadas secar em temperatura ambiente (37°C), sendo armazenadas em caixas de plástico na geladeira.

3.4. CITOGENÉTICA CLÁSSICA

3.4.1. Coloração convencional

Para a análise convencional, o material citológico foi corado com Giemsa a 5%, diluído em tampão fosfato pH 6,8 durante 10 minutos. Em seguida, a lâmina foi lavada com água destilada e deixada secar em temperatura ambiente.

3.4.2. Bandeamento C

Para a caracterização do padrão de heterocromatina constitutiva utilizou-se a técnica de bandeamento C, segundo Sumner (1972), com modificações. Primeiramente a lâmina contendo o material citológico foi colocada em solução de ácido clorídrico (HCl) 0,2 N durante 15 minutos, lavada com água destilada e deixada secar a temperatura ambiente. Posteriormente, a lâmina foi incubada em solução aquosa de Hidróxido de Bário ($\text{Ba}(\text{OH})_2$) 2% à 45°C, com o tempo variando de 20 a 30 segundos entre os espécimes. Após isso, foi imediatamente imersa em HCl 0,1 N para interromper a ação da solução de Hidróxido de Bário e em seguida lavada com água destilada e deixada secar novamente. Posteriormente a lâmina foi incubada em solução salina 2xSSC em temperatura de 60° C durante 15 minutos, depois foi lavada em água destilada e deixada secar. A técnica de coloração foi feita com solução de Wright 3:1 durante 5 minutos.

3.4.3. Detecção de NOR por impregnação de nitrato de prata (Ag-NOR)

As Regiões Organizadoras de Nucléolo (NOR) foram detectadas pela impregnação por Nitrato de Prata (AgNO_3), segundo a técnica descrita por Howell & Black (1980), com modificações. Inicialmente a lâmina é tratada em HCl 0,2 N durante 3 minutos em temperatura ambiente, em seguida é lavada com água destilada e deixada para secar. Sobre a lâmina contendo o material citológico pingou-se uma gota de gelatina incolor 1% a 60°C, e duas gotas de Nitrato de Prata 50%. O material foi coberto com uma lamínula e incubado em uma câmara úmida protegida da luz. A câmara úmida foi colocada dentro de uma estufa ou banho-maria a 60°C por cerca de 5 minutos. Retirou-se a lâmina da estufa e banhou-se em água destilada. A técnica de coloração é feita com Giemsa, diluído em tampão fosfato pH6,8 na proporção 1:30 durante cerca de 20 segundos.

3.5. HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* FLUORESCENTE (FISH)

As FISH (Fluorescent *in situ* hybridization) foram realizadas utilizando sondas de rDNA 18S, obtidas da espécie *Prochilodus argenteus* (Hatanaka & Galetti, 2004), rDNA 5S

(Martins & Galetti, 1999) e telomérica humana (All telomere, Oncor) seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. Todas as técnicas foram realizadas com adaptações.

3.5.1. Preparação das lâminas

Sobre a lâmina citologicamente preparada pingou-se 200 µl de solução contendo RNase (1 µl de RNase para cada 1000 µl de 2xSSC), cobriu-se com parafilm e incubou-se em uma câmara úmida à 37°C, por 30 min. Posteriormente, retirou-se o parafilm e a lâmina foi lavada por três vezes em solução de 2xSSC, por 2 minutos em cada.

Em seguida, a lâmina foi imersa em uma solução de pepsina a 1% (50 mL de HCl 4,8 N para 0,5 mL de pepsina) por 5 minutos, posteriormente lavada em solução de 2xSSC por 3 vezes, pelo tempo de 2 minutos em cada. A etapa seguinte consistiu em mergulhar a lâmina em solução de formaldeído (5 mL de PBS 10x, 2,5 mL de MgCl e 500 µL de formaldeído dissolvidos em 42 mL de água destilada) por 10 minutos e imediatamente após esse período a lâmina foi introduzida em uma solução de PBS 1x (4 mL de PBS 10x dissolvidos em 36 mL de água destilada) por 5 minutos.

A seguir os cromossomos foram desidratados com etanol (séries de 2x70% por 2 minutos, 2x90% por 2 minutos e 1x100% por 5 minutos) e incubado em estufa a 65°C por 1 hora.

3.5.2. Desnaturação cromossômica

Colocou-se a lâmina citologicamente preparada em uma solução de Formamida 70% (70 mL de formamida e 30 mL de 2xSSC), durante 5 minutos, a 65°C. A lâmina foi retirada da solução de Formamida 70% e mergulhada em solução de etanol 70% gelado, por 5 minutos. Desidratou-se novamente os cromossomos em uma bateria de álcool (séries de 1x70% por 2 minutos, 2x90% por 2 minutos cada e 1x100% por 5 minutos).

3.5.3. Hibridização

Em seguida, a solução contendo as sondas foi desnaturada em banho-maria a 65°C, durante 15 minutos. Após a desnaturação, pingou-se 12 µL da solução contendo as sondas sobre a lâmina, colocando uma lamínula sobre ela e vedando-a com cola PVC. Em seguida, preparou-se uma câmara úmida e as lâminas foram incubadas em estufa a 37°C durante 24 horas.

3.5.4. Lavagem de estringência

Posteriormente a lamínula foi retirada e a lâmina introduzida em formamida 50% à 40°C. Em seguida a lâmina foi colocada em 2xSSC à 40°C, 2 vezes pelo período de 2 minutos em cada. A lâmina foi introduzida em detergente 4Tween (200 mL de 4xSSC para 100 µL de Tween) à 40°C por 5 minutos.

3.5.5. Detecção das sondas

Foi pingado na lâmina 100 µL de solução de detecção (0,4 µL anti-digoxigenina FITC + 100 µL de 4Tween ou 0,2 µL de avidina CY3 ou FITC + 100 µL de 4Tween), em seguida esta foi coberta com uma lamínula e deixada secar na estufa a 37°C por 30 minutos. A lamínula foi retirada e a lâmina foi lavada em 4Tween em temperatura ambiente 3 vezes por 2 minutos cada. Foi adicionado 10 µl de solução DAPI com anti-fade sobre a lâmina, em seguida foi coberta com uma lamínula de vidro 24 x 50 mm e selada.

3.6. ANÁLISE DAS PREPARAÇÕES CROMOSSÔMICAS

A análise das lâminas provenientes das técnicas de citogenética clássica foi realizada em microscópio óptico Zeiss Axio star com objetiva de imersão (100x) e ocular de 10 vezes de aumento. As melhores metáfases foram fotografadas em fotomicroscópio Zeiss Axiophot II ou Olympus BX41 em campo claro com auxílio dos softwares Axiovision e Karyotyping, respectivamente. As lâminas submetidas às técnicas de FISH foram analisadas em fotomicroscópio de fluorescência Zeiss Axiophot II com objetiva de imersão, ocular de 10x e optovar 1,25. As melhores metáfases foram capturadas digitalmente com auxílio de câmara Zeiss Axio Cam MRm por meio do programa Axiovision 3.1.

As metáfases digitalizadas foram montadas com o auxílio do programa Adobe Photoshop CC.

3.7. CLASSIFICAÇÃO MORFOLÓGICA CROMOSSÔMICA

A identificação cromossômica foi feita com base em Levan *et al.* (1964), que leva em consideração o quociente entre o comprimento do maior braço cromossômico (L) e o do menor (C). Para o cálculo do Número Fundamental (NF) os cromossomos classificados como metacêntricos (m) e submetacêntricos (sm) foram considerados de dois braços, enquanto os subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a) constituídos por um único braço. A medição dos cromossomos foi feita com auxílio do programa Adobe Photoshop CC.

3.8. ELABORAÇÃO DOS MAPAS

O programa de software livre ArcGIS, versão 10.4.1 foi utilizado para a produção dos mapas. A edição das imagens foi feita utilizando os programas Adobe Photoshop CC.

4. RESULTADOS

Apteronotus albifrons apresenta $2n=24$ (16 m/sm + 8 st/a) e número fundamental NF (Número Fundamental) = 40 (Figura 4A). O Bandeamento C evidenciou marcação na região pericentromérica de todos os cromossomos, sendo que o par 4, submetacêntrico, apresenta um bloco heterocromático em todo o braço longo e os pares 2 e 10 possuem pequenos blocos heterocromáticos nas regiões intersticiais de ambos os braços (Figura 4B). As Regiões Organizadoras de Nucléolo são encontradas na região distal do braço longo do par 4 (Box – Figura 4A), sendo também confirmada sua presença em apenas um par pela FISH com sonda de rDNA 18S (Figura 4C). Sequências de rDNA 5S se encontram nas regiões intersticiais de ambos os braços do par 2 (Figura 4D). A sonda telomérica marcou as regiões distais de todos cromossomos, não sendo evidenciada nenhuma marcação de sequência telomérica intersticial (ITS) (– Figura 4E).

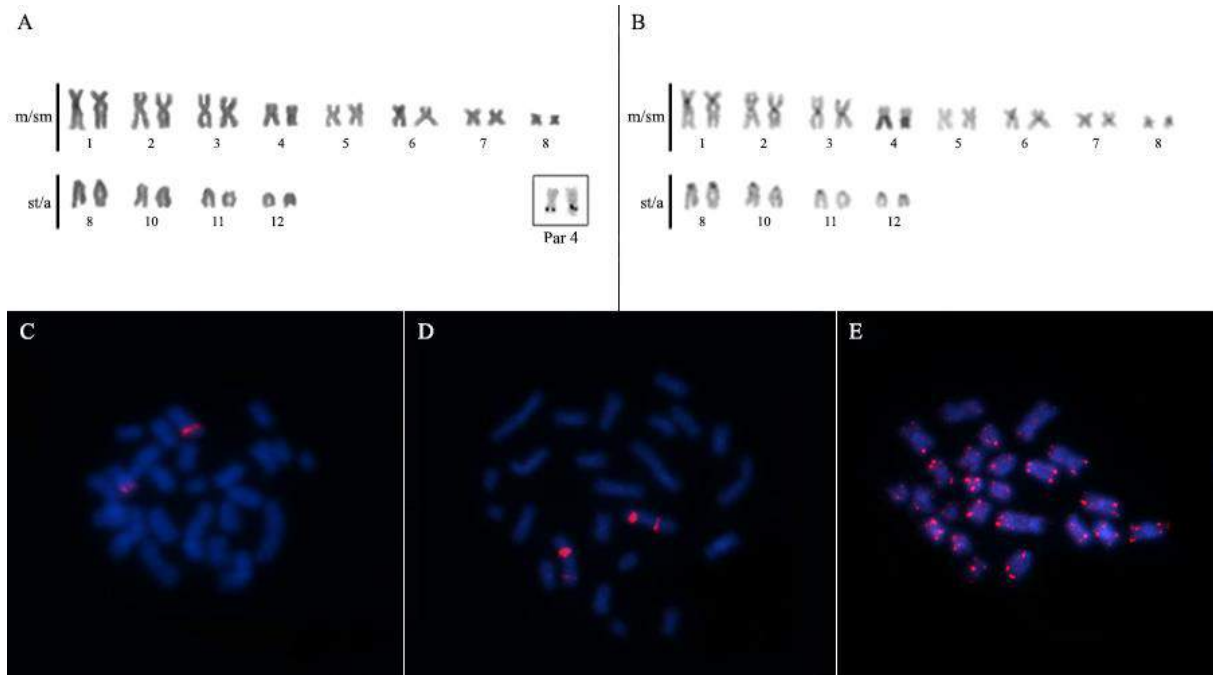


Figura 4: Cariótipos de *Aptereronotus albifrons* com: **A-** Coloração convencional destacando a Ag-NOR (Box); **B-** Bandeamento C; Técnicas de FISH com sondas de: **C-** rDNA 18S; **D-** rDNA 5S; e **E-** telomérica. Abreviações: m = metacêntrico; sm = submetacêntrico; st = subteloecêntrico; a = acrocêntrico.

A. bonapartii apresenta $2n=52$ (42 m/sm + 10 st/a) e NF=94 (Figura 5A). O Bandeamento C evidenciou marcação na região pericentromérica de todos os cromossomos, sendo que nos pares 1, 2, 3, 6 e 14 apresentam um bloco heterocromático em todo o braço curto (Figura 5B). As Regiões Organizadoras de Nucléolo apresentaram heteromorfismo de tamanho e são encontradas na região distal do braço curto do par 3 (Box – Figura 3A), sendo também confirmada sua presença em apenas um par pela FISH com sonda de rDNA 18S (Figura 5C). As sequências de rDNA 5S se encontram na região distal do braço curto do par 9, com heteromorfismo de tamanho (Figura 5D). A sonda telomérica marcou as regiões distais de todos cromossomos, não sendo evidenciada nenhuma marcação ITS (Figura 5E).

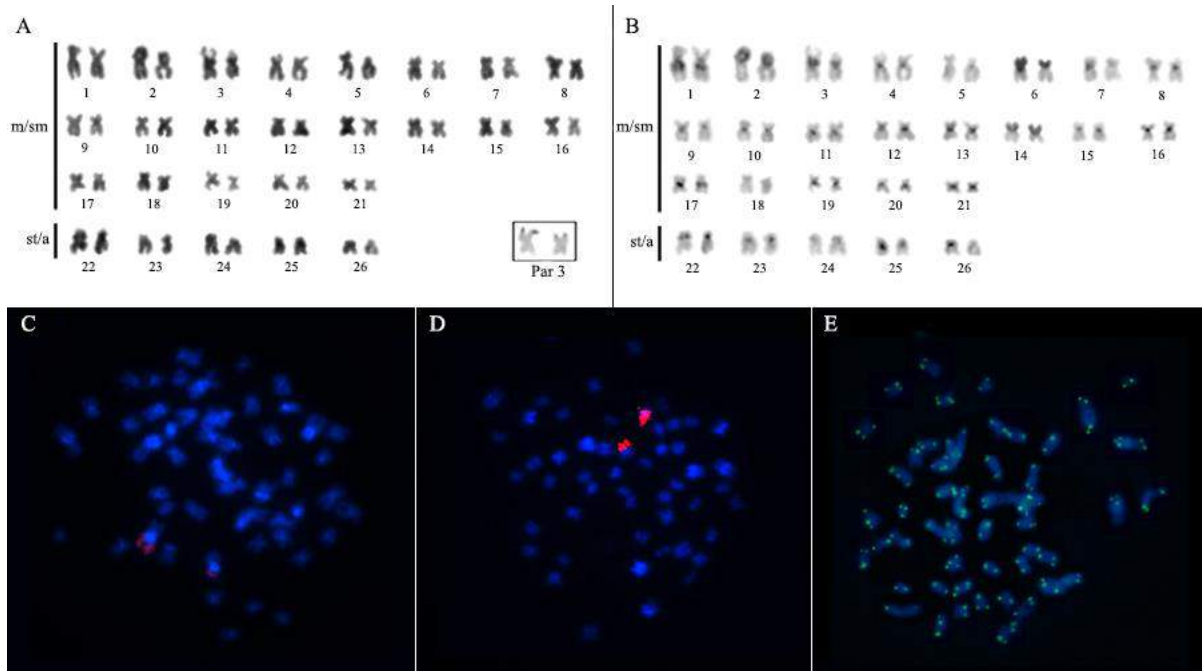


Figura 5: Cariótipos de *Aptereronotus bonapartii* com: **A-** Coloração convencional destacando a Ag-NOR (Box); **B-** Bandeamento C; Técnicas de FISH com sondas de: **C-** rDNA 18S; **D-** rDNA 5S; e **E-** telomérica. Abreviações: m = metacêntrico; sm = submetacêntrico; st = subteloicêntrico; a = acrocêntrico.

5. DISCUSSÃO

A heterocromatina em ambas as espécies apresentou distribuição centromérica em praticamente todos os cromossomos, com a presença de blocos adicionais em regiões não centroméricas, assim como demonstrado para outras espécies da família (Silva *et al.*, 2014a). Como observado em outros Gymnotiformes (Milhomem *et al.*, 2007, 2008; Silva *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2009), a heterocromatina de ambas as espécies é rica em pares de base AT, fato que pôde ser constatado pela coloração com o fluorocromo DAPI (Figuras 4 e 5). Em *A. albifrons* percebe-se a presença de pequenos blocos heterocromáticos na região proximal de ambos os braços do par 2, que possivelmente são pontos de quebra derivados de uma inversão pericêntrica (Galetti *et al.*, 1991), evento que já foi sugerido em Gymnotiformes (Milhomem *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2014a). Estes pontos de quebra coincidem com a localização proximal dos dois blocos do gene rDNA 5S presentes no mesmo par cromossômico. Podemos sugerir que um rearranjo do tipo inversão pericêntrica teria ocorrido em *A. albifrons*, o que justifica a presença de sítios de rDNA 5S em ambos os braços do par 2.

Uma outra possibilidade seria que, como o cariótipo de *A. albifrons* é derivado (Silva *et al.*, 2014a), o padrão observado poderia ter surgido de um evento de fusão cêntrica de dois pares portadores desses sítios de rDNA 5S (Figura 6).

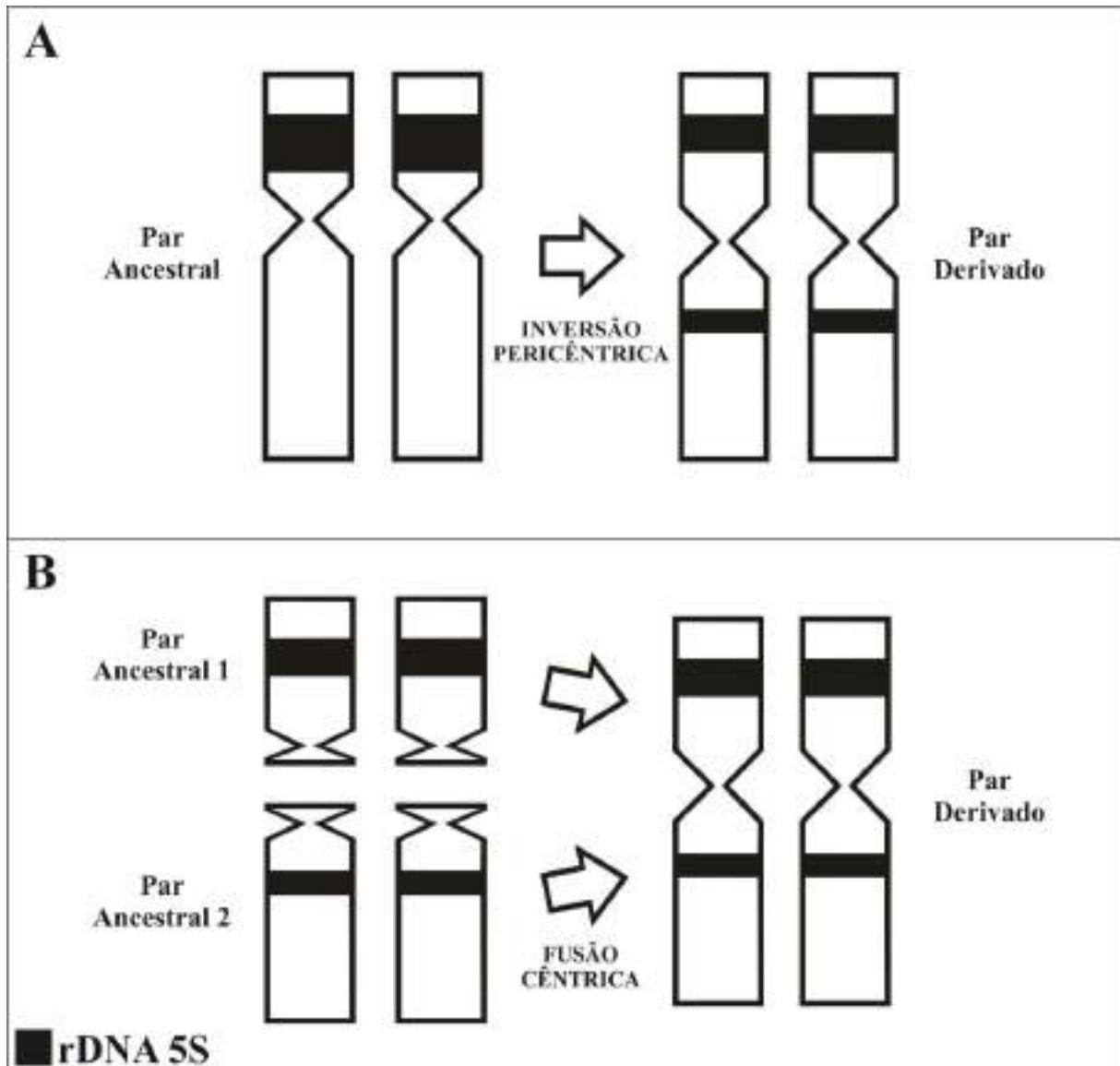


Figura 6: A: Origem do padrão de distribuição derivado de inversão pericêntrica; B: Origem do padrão de distribuição derivado de fusão cêntrica.

Em *A. bonapartii*, a FISH com sondas de rDNA 5S mostra blocos de diferentes tamanhos presentes na região distal do braço curto par 9. O heteromorfismo de tamanho observado nestas regiões pode ser derivado de diferenças no número de cópias dos genes ribossomais, assim como já foi observado em outros grupos de rDNA (Foresti *et al.*, 1981; Almeida-Toledo *et al.*, 1985; Martínez *et al.*, 1996; Oliveira *et al.*, 2003).

Tanto a NOR quanto o FISH com sonda de rDNA 18S evidenciou marcação simples em um único par cromossômico em ambas as espécies. A espécie *A. albifrons* apresenta marcação da NOR simples no braço longo do par 4, corroborando com os dados do trabalho de Almeida-Toledo *et al.* (1981) e diferenciando dos dados obtidos pelo trabalho de Mendes

et al. (2012). Ambos os trabalhos inferem marcação em um par cromossômico que coincide com um bloco heterocromático, mas estes divergem quanto ao posicionamento deste bloco (Figura 7). A amplificação de sequências repetitivas é um evento comum em peixes (Silva *et al.*, 2009) e pode ter originado o bloco heterocromático maior presente no cariótipo da espécie no trabalho de Almeida-Toledo *et al.* (1981) e no presente estudo, alterando desta forma a própria conformação estrutural do cromossomo portador. Este evento também pode explicar a divergência na classificação observada nos artigos anteriores de descrição da espécie, onde o cromossomo portador da NOR está presente no par 4 no artigo de Almeida-Toledo *et al.* (1981) e no par 4 no artigo de Mendes *et al.* (2012).

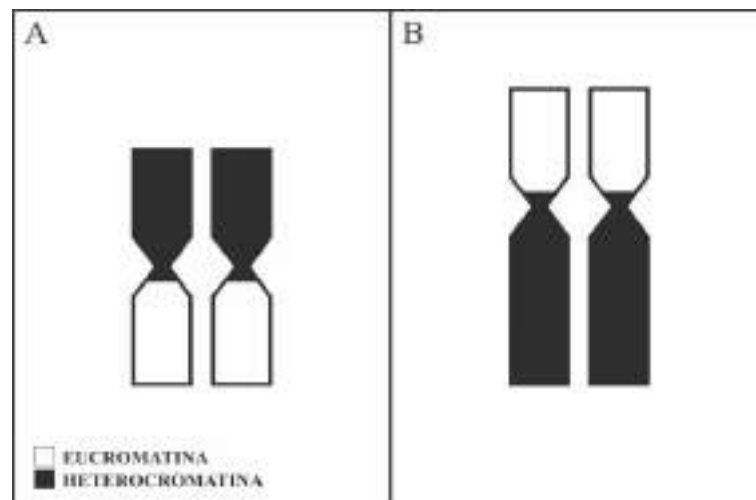


Figura 7: A- Bloco heterocromático evidenciado no braço curto do cromossomo metacêntrico portador da Ag-NOR (Mendes *et al.*, 2012). B- Bloco heterocromático evidenciado no braço longo do cromossomo submetacêntrico portador da Ag-NOR (Almeida Toledo *et al.*, 1981).

O heteromorfismo de NORs no cariótipo de peixes, como observado nesta espécie, é um evento comum, tendo sido descrito em todas as famílias de Gymnotiformes (Milhomem *et al.*, 2007; Fonteles *et al.*, 2008; Scacchetti, 2009; Silva *et al.*, 2009; Cardoso *et al.*, 2011; Milhomem *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2014a). Os polimorfismos de tamanho destas regiões podem ser resultado de diferenças no número de cópias dos genes ribossomais (Silva *et al.*, 2009; Sene, 2011) causadas possivelmente por duplicações em tandem, crossing-over desigual envolvendo regiões repetidas ou duplicações acidentais do DNA (Foresti *et al.*, 1981; Silva *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2014a).

A FISH com sonda telomérica evidenciou marcação nas regiões distais de todos os cromossomos em ambas as espécies, não sendo observada nenhuma sequência telomérica intersticial (ITS).

Os cariótipos de ambas as espécies são considerados simétricos pelo fato de apresentarem grande similaridade morfológica entre seus cromossomos, não havendo desta forma grandes diferenças de tamanho entre a maioria dos seus cromossomos (Guerra, 1988). Assim como Margarido *et al.* (2007) constatou para espécies do gênero *Gymnotus*, os resultados citogenéticos dos indivíduos da família Apterodontidae demonstram diversidade interespecífica na macroestrutura cariotípica (Tabela 1), indicando que a citogenética pode ser utilizada para o diagnóstico taxonômico neste grupo de peixes.

Em geral, as variáveis mobilidade e densidade populacional possuem influência marcante na evolução cromossômica dos grupos de peixes (Oliveira *et al.*, 1988). Segundo Oliveira *et al.* (2009), os Gymnotiformes se incluem na parcela de peixes que são geralmente caracterizados pela mobilidade reduzida e baixa densidade populacional, o que acarretaria numa extensa variação intra e interespecífica do cariótipo. Uma maior probabilidade de cruzamento com parentes, dada a baixa densidade populacional apresentada poderia ser o fator que facilitaria a homogeneização e fixação de um rearranjo e, conseqüentemente, levaria à variação numérica do cariótipo (Silva *et al.*, 2009).

Os estudos citogenéticos da família Apterodontidae existentes até o momento demonstram que *A. albifrons* e *Sternarchorhamphus muelleri* (Silva *et al.*, 2014a) exibem uma redução drástica de número diplóide, com $2n=24$ e $2n=32$, respectivamente. O $2n$ elevado é acreditado ser basal em Apterodontidae por ser compatível com a encontrada em Gymnotidae, que se encontra em posição basal nos Gymnotiformes (Silva *et al.*, 2014a).

6. CONCLUSÃO

A descrição citogenética das espécies do presente estudo e a revisão bibliográfica feita para outras espécies da família demonstrou que existe grande diversidade interespecífica na macroestrutura cariotípica entre as espécies do grupo, indicando que os seus cariótipos sofreram intensas variações cromossômicas estruturais para chegar aos extremos $2n=22$ e $2n=52$ observados na literatura. É importante ressaltar que rearranjos que não alteram a morfologia ou o número de cromossomos, tais como inversões paracêntricas, podem ter ocorrido durante o processo evolutivo das espécies do grupo (Oliveira *et al.*, 2003), sendo importante para o diagnóstico destes rearranjos um estudo mais aprofundado, possibilitado pelas técnicas de pintura cromossômica. A pesquisa sistemática sobre a diversidade

cromossômica de Apterontidae ainda é bastante insipiente, sendo que estudos posteriores são necessários para a melhor compreensão da evolução cromossômica do grupo.

7. REFERÊNCIAS

ALBERT, J.S. & CRAMPTON, W.G. Diversity and phylogeny of Neotropical electric fishes (Gymnotiformes). **In Electrosensation**. Springer New York: 360-409. 2005.

ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; FORESTI, F. & ALMEIDA-TOLEDO, S. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer region in the knifefish, *Apterontus albifrons* (Pisces, Apterontidae). **Cellular and Molecular Life Sciences**, **37(9)**: 953-954. 1981. DOI: 10.1007/BF01971773.

ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; FORESTI, F. & ALMEIDA-TOLEDO, S. Spontaneous triploidy and NOR activity in *Eigenmannia* sp. (Pisces, Sternopygidae) from the Amazon basin. **Genetica**, **66(2)**: 85-88. 1985. DOI: 10.1007/BF00139713.

BERTOLLO, L.A.C.; TAKAHASHI, C.S.; & MOREIRA-FILHO, O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae*. **Braz J Genet** **2**: 103–120. 1978.

CARDOSO, A.L.; PIECZARKA, J.C.; FELDBERG, E.; MILHOMEM, S.S.R.; MOREIRA-ALMEIDA, T.; SILVA, D.S.; SILVA, P.C. & NAGAMACHI, C.Y. Chromosomal characterization of two species of genus *Steatogenys* (Gymnotiformes: Rhamphichthyoidea: Steatogenini) from the Amazon basin: sex chromosomes and correlations with Gymnotiformes phylogeny. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, **21(3)**: 613-621. 2011. DOI: 10.1007/s11160-010-9196-0.

CASTELNAU, F.L. Animaux nouveaux ou rares recueillis pendant l'expédition dans les parties centrales de l'Amérique du Sud, de Rio de Janeiro a Lima, et de Lima au Para; executée par ordre du gouvernement français pendant les années 1843 a 1847. **Chez P. Bertrand**, **7**. 1885.

CRAMPTON, W.G.R. An ecological perspective on diversity and distributions. **Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes**: 165-189, 2011.

DE SANTANA, C.D.C. **Sistemática e Biogeografia da Família Apterontidae (Otophysi, Gymnotiformes)**. Dissertação de Doutorado. INPA/UFAM, Manaus. 2007.

DE SANTANA, C.D. & CRAMPTON, W.G. A review of the South American electric fish genus *Porotergus* (Gymnotiformes: Apterontidae) with the description of a new species. **Copeia**, **2010(1)**: 165-175. 2010. DOI:10.1643/CI-05-136.

FONTELES, S.B.; LOPES, C.E.; AKAMA, A.; FERNANDES, F.M.; PORTO-FORESTI, F.; SENHORINI, J.A.; DANIEL-SILVA, M.F.; FORESTI, F. & Almeida-Toledo, L.F.D. Cytogenetic characterization of the strongly electric Amazonian eel, *Electrophorus electricus* (Teleostei, Gymnotiformes), from the Brazilian rivers Amazon and Araguaia. **Genetics and Molecular Biology**, **31(1)**: 227-230. 2008. DOI:10.1590/S1415-47572008000200010.

FORESTI, F.; ALMEIDA-TOLEDO, L.D. & TOLEDO F.S.A. Polymorphic nature of nucleolus organizer regions in fishes. **Cytogenetic and Genome Research**, **31(3)**: 137-144. 1981.

GALETTI JR, P.M.; CESAR, A.C.G. & VENERE, P.C. Heterochromatin and NORs variability in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). **Caryologia**, **44(3-4)**: 287-292. 1991. DOI: 10.1080/00087114.1991.10797193.

GUERRA M. **Introdução à Citogenética Geral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan., 1988. 35p.

HATANAKA, T. & GALETTI JR P.M. Mapping of 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). **Genetica**, **122**: 239-244. 2004. DOI: 10.1007/s10709-004-2039-y.

HINEGARDNER, R. & ROSEN, D.E. Cellular DNA content and the evolution of teleostean fishes. **American Naturalist**, **106(951)**: 621-644. 1972. DOI: 10.1086/282801.

HOWELL, W.M. Somatic chromosomes of the black ghost knifefish, *Apterontus albifrons* (Pisces: Apterontidae). **Copeia**, **1972(1)**: 191-193. 1972.

HOWELL, W. & 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. & SANDBERG, A.A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**, **52(2)**: 201-220. 1964. DOI: 10.1111/j.1601-5223.1964.tb01953.x.

LINNAEUS, C.N. Systema naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus differentiis, synonymis, locis. **Salvius**. 1766.

LUNDBERG, J.G.; FERNANDES, C.C.; CAMPOS-DA-PAZ, R. & Sullivan, J.P. *Sternarchella calhamazon* n. sp., the Amazon's most abundant species of apteronotid electric fish, with a note on the taxonomic status of *Sternarchus capanemae* Steindachner, 1868 (Gymnotiformes, Apterontidae). **Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia**, **162**: 157-173. 2013. DOI: 10.1635/053.162.0110.

MAGO-LECCIA, F. Electric fishes of the continental water of America: classification and catalogue of the electric fishes of the order Gymnotiformes (Teleostei: Ostariophysi), with descriptions of new genera and species. **Caracas, Fundacion para el desarrollo de las Ciencias Fisicas, Matematicas y Naturales**, **29**. 1994.

MARGARIDO, V.P.; BELLAFRONTI, E. & MOREIRA-FILHO, O. Cytogenetic analysis of three sympatric *Gymnotus* (Gymnotiformes, Gymnotidae) species verifies invasive species in the Upper Paraná River basin, Brazil. **Journal of Fish Biology**, **70**: 155-164. 2007. DOI: 10.1111/j.1095-8649.2007.01365.x.

MARTINS, C. & GALETTI JR, P.M. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in Leporinus fish (Anostomidae, Characiformes). **Chromosome Research**, **7(5)**: 363-367. 1999. DOI: 10.1023/A:1009216030316.

MENDES, V.P.; PORTELA-CASTRO, A.L.B. & JÚLIO-JÚNIOR, H.F. First record of supernumerary (B) chromosomes in electric fish (Gymnotiformes) and the karyotype structure of three species of the same order from the upper Paraná River basin. **Comparative Cytogenetics**, **6(1)**: 1-16. 2012. DOI: 10.3897/CompCytogen.v6i1.1752.

MILHOMEM, S.S.; PIECZARKA, J.C.; CRAMPTON, W.G.R.; SOUZA, A.C.P.; CARVALHO JR, J.R. & NAGAMACHI, C.Y. Differences in karyotype between two sympatric species of *Gymnotus* (Gymnotiformes: Gymnotidae) from the eastern amazon of Brazil. **Zootaxa**, **1397**: 55-62. 2007. DOI: 10.11646/zootaxa.1397.7.

MILHOMEM, S.S.; PIECZARKA, J.C.; CRAMPTON, W.G.; SILVA, D.S.; DE SOUZA, A.C.; CARVALHO, J.R. & NAGAMACHI, C.Y. Chromosomal evidence for a putative cryptic species in the *Gymnotus carapo* species-complex (Gymnotiformes, Gymnotidae). **BMC genetics**, **9(1)**: 1. 2008. DOI: 10.1186/1471-2156-9-75.

MILHOMEM, S.S.; CRAMPTON, W.G.R.; PIECZARKA, J.C. SHETKA, G.H., SILVA, D.S. & NAGAMACHI, C.Y. (2012). *Gymnotus capanema*, a new species of electric knife fish (Gymnotiformes, Gymnotidae) from eastern Amazonia, with comments on an unusual karyotype. **Journal of fish biology**, **80(4)**: 802-815. 2012. DOI: 10.1111/j.1095-8649.2012.03219.x

OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; FORESTI, F.; BRITSKI, H.A. & TOLEDO-FILHO, S.D. Chromosome formulae of Neotropical freshwater fishes. **Rev Bras Genet**, **11(57)**: 624. 1988.

OLIVEIRA, C.; NIRCHIO, M.; GRANADO, Á. & Levy, S. Karyotypic characterization of *Prochilodus mariae*, *Semaprochilodus kneri* and *S. laticeps* (Teleostei: Prochilodontidae) from Caicara del Orinoco, Venezuela. **Neotropical Ichthyology**, **1(1)**: 47-52. 2003. DOI: 10.1590/S1679-62252003000100005.

OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. & HILSDORF, A.W.S. Genetics of neotropical fish: from chromosomes to populations. **Fish Physiol Biochem**, **35**: 81-100. 2009. DOI: 10.1007/s10695-008-9250-1 .

SCACCHETTI, P.; PANSONATO-ALVES, J.; UTSUNOMIA, R.; OLIVEIRA, C. & FORESTI, F. Karyotypic diversity in four species of the genus *Gymnotus* Linnaeus, 1758 (Teleostei, Gymnotiformes, Gymnotidae): physical mapping of ribosomal genes and telomeric sequences. **Comparative cytogenetics**, **5(3)**: 223. 2011. DOI: 10.3897/CompCytogen.v5i3.1375.

SILVA, D.S.; MILHOMEM, S.S.; SOUZA, A.C.P.; PIECZARKA, J.C. & NAGAMACHI, C.Y. A conserved karyotype of *Sternopygus macrurus* (Sternopygidae, Gymnotiformes) in the Amazon region: differences from other hydrographic basins suggest cryptic speciation. **Micron**, **39(8)**: 1251-1254. 2008. DOI: 10.1016/j.micron.2008.04.001.

SILVA, D.S.; MILHOMEM, S.S.; PIECZARKA, J.C. & NAGAMACHI, C.Y. Cytogenetic studies in *Eigenmannia virescens* (Sternopygidae, Gymnotiformes) and new inferences on the

origin of sex chromosomes in the *Eigenmannia* genus. **BMC Genetics**, **10(1)**: 74. 2009. DOI: 10.1186/1471-2156-10-74.

SILVA, P.C.; NAGAMACHI, C.Y.; SILVA, D.S.; MILHOMEM, S.S.; CARDOSO, A.L.; OLIVEIRA, J.A. & PIECZARKA, J.C. Karyotypic similarities between two species of Rhamphichthys (Rhamphichthyidae, Gymnotiformes) from the Amazon basin. **Comparative cytogenetics**, **7(4)**: 279. 2013. DOI: 10.3897/CompCytogen.v7i4.4366.

SILVA, F.H.R.; PIECZARKA, J.C.; CARDOSO, A.L.; SILVA, P.C.D.; OLIVEIRA, J.A.D. & NAGAMACHI, C.Y. Chromosomal diversity in three species of electric fish (Apteronotidae, Gymnotiformes) from the Amazon Basin. **Genetics and molecular biology**, **37(4)**: 638-645. 2014a. DOI: 10.1590/S1415-47572014005000018.

SENE, V.F. **Citogenética molecular e caracterização cromossômica no gênero Eigenmannia (Teleostei, Gymnotiformes, Sternopygidae)**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu. 2011.

SUMNER, A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental cell research**, **75(1)**: 304-306. 1972.

TAGLIACOLLO, V.A.; BERNT, M.J.; CRAIG, J.M.; OLIVEIRA, C. & ALBERT, J.S. Model-based total evidence phylogeny of Neotropical electric knifefishes (Teleostei, Gymnotiformes). **Molecular phylogenetics and evolution**, **95**: 20-33. 2016. DOI: 10.1016/j.ympev.2015.11.007.

TRIQUES, M.L. Análise cladística dos caracteres de anatomia externa e esquelética de Apteronotidae (Teleostei: Gymnotiformes). **Lundiana**, **6(2)**: 121-149. 2005.

TRIQUES, M.L. *Apteronotus acidops*, new species of long snouted electric fish (Teleostei: Gymnotiformes: Apteronotidae) from the upper rio Paraná basin in Brazil, with a key to the apteronotid species from the area. **Vertebrate Zoology**, **61(3)**: 299-306. 2011.