



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA AQUÁTICA E PESCA

MONIQUE COSTA DE SOUZA CHAGAS

**ESTUDOS CITOGENÉTICOS EM PEIXE-BOI (MAMMALIA, SIRENIA,
TRICHECHIDAE): UMA ABORDAGEM EVOLUTIVA**

Belém – PA
2018

MONIQUE COSTA DE SOUZA CHAGAS

**ESTUDOS CITOGENÉTICOS EM PEIXE-BOI (MAMMALIA, SIRENIA,
TRICHECHIDAE): UMA ABORDAGEM EVOLUTIVA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia Aquática e Pesca da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ecologia Aquática e Pesca.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª. Renata Coelho Rodrigues Noronha.

Belém – PA
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Chagas, Monique Costa de Souza
ESTUDOS CITOGENÉTICOS EM PEIXE-BOI (MAMMALIA, SIRENIA, TRICHECHIDAE): UMA
ABORDAGEM EVOLUTIVA / Monique Costa de Souza Chagas. — 2018
65 f. : il. color

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ecologia Aquática e Pesca (PPGEAP), Instituto
de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2018.
Orientação: Profa. Dra. Renata Coelho Rodrigues Noronha

1. Ecologia Aquática. 2. Citogenética. 3. peixe-boi. I. Noronha, Renata Coelho Rodrigues , *orient.* II.
Título

CDD 572.8

MONIQUE COSTA DE SOUZA CHAGAS

**ESTUDOS CITOGENÉTICOS EM PEIXE-BOI (MAMMALIA, SIRENIA,
TRICHECHIDAE): UMA ABORDAGEM EVOLUTIVA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia Aquática e Pesca da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ecologia Aquática e Pesca.

Data: 26 de fevereiro de 2018

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Renata Coelho Rodrigues Noronha (Presidente)

Prof^o. Dr. Leonardo dos Santos Sena (Membro interno)

Prof^o. Dr Julio Cesar Pieczarka (Membro externo)

Prof^o. Dr. Cesar Martins (Membro externo)

Belém – PA
2018

Dedico este trabalho à minha família

AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente à Deus, pela vida, por estar sempre ao meu lado, renovando as minhas forças diante das dificuldades.

Agradeço a todos os integrantes da minha família pelo amor, apoio e compreensão durante a produção deste trabalho, em especial, aos meus pais José Carlos Chagas e Nilza Chagas, ao meu irmão André Chagas, minha filha de quatro patas, Luna, e ao meu melhor amigo Vinicius Pinheiro.

À minha orientadora, Renata Noronha, a quem admiro muitíssimo como profissional. Agradeço por todos os momentos de aprendizagem, paciência, compreensão, incentivo e pelos “puxões de orelha”.

Aos professores Cleusa Nagamachi e Julio Pieckzarca por todo apoio e infraestrutura.

Ao Alex Klautau e Leonardo Sena por todo apoio nas coletas.

Ao Msc Bruno Rafael de Almeida, pela amizade, pelas discussões de artigos e orientações. Agradeço de todo coração pela amizade, confiança, pelas palavras sinceras e pelo apoio quando mais precisei.

À Shirley Nascimento, Jorge Rissino, Conceição Mandú e Natalia Nascimento pelas orientações e momentos de descontração.

À equipe do Laboratório de Citogenética da UFPA, pela ajuda e amizade. Em especial à Stella Miranda, Marlyson Rodrigues e Manoella Gemaque.

Ao Dr. Carlos Bastos pela produção de algumas sondas.

Aos amigos da turma de mestrado de 2016, em especial, Aline Enir, Jeanne Duarte e Célio Soares (*In memorian*).

Ao Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Mamíferos Aquáticos e a Faculdades Integradas do Tapajós, por ter cedido as amostras.

Ao ICMBio (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade) pela licença para coleta das amostras biológicas.

A todas as instituições e órgãos que deram apoio financeiro e estrutural: UFPA, PPGEAP, CAPES, CEABIO e CNPq.

LISTA DE FIGURAS E TABELA

Figura 1: Cladograma ilustrando a posição e relação da Ordem Sirenia com os seus parentais elucidando os tetiterias (†= extinto), como proposto por MCKENNA (1975).

Fonte: BERTA *et al.*, 2015.

Figura 2: Distribuição das espécies da família Trichechidae (*Trichechus manatus*, *T. inunguis* e *T. senegalesis*) e Dugongidae (*Dugong dugon*), incluindo as subespécies derivadas do peixe-boi marinho (*Trichechus manatus latirostris* e *T. manatus manatus*).

Fonte: Medina, 2008.

Figura 3: Relações filogenéticas da ordem Sirenia com base na morfologia. Fonte: Domning (1994), modificado por Prista (2012).

Figura 4: Espécime de *Trichechus manatus manatus* do cativeiro do Centro Nacional de Pesquisas e Conservação de Mamíferos Aquáticos (CMA), Itamaracá-Pernambuco.

Figura 5: Resultados da Análise de Componentes Principais (Principal Component Analysis- PCA) com as coordenadas do teste estatístico Procrustes. *Trichechus manatus manatus* do Brasil (1), *Trichechus manatus manatus* caribenha e as setas representam a população da Guiana (acima) e Suriname (abaixo) (2) e *Trichechus manatus latirostris* (3). Fonte: Barros *et al.*, 2016.

Figura 6: *Trichechus inunguis*, peixe-boi da Amazônia (Fonte: ICMBio).

Figura 7: Provável peixe-boi híbrido de segunda geração (Poque) presente no Cativeiro Nacional de Pesquisa e Conservação de Mamíferos Aquáticos (CMA), Itamaracá-Pernambuco.

Figura 8: Árvore filogenética representando o cariótipo ancestral Paenungulata (APK) constituído através das alterações cromossômicas de elefante (LAF), peixe-boi (TMA) e hyrax (PCA). Fonte: PARDINI *et al.*, 2007.

Tabela 1: Revisão das informações cromossômicas em *Trichechus*.

CAPÍTULO 1

Figura 1: Cariótipos de *Trichechus inunguis*: a) Bandeamento G; b) Bandeamento C.

Figura 2: Cariótipos de *Trichechus manatus manatus*: a) Bandeamento G; b) Bandeamento C.

Figura 3: Análise comparativa entre *Trichechus inunguis* (TI) e *T. m. manatus* (TMM): a) Possíveis homologias cromossômicas; b) Possíveis rearranjos cromossômicos inferidos por bandeamento G.

Figura 4: Cariótipos do provável híbrido “Poque”: a) Bandeamento G; b) Bandeamento C.

Figura 5: Análise comparativa entre *Trichechus*: a) Possíveis homologias entre *Trichechus inunguis* (TI), *T. m. manatus* (TMM) e híbrido “Poque”; b) Entre híbrido e TMM; c) Entre híbrido e TI.

Figura 6: FISH com sonda de sequências teloméricas (a-c) e rDNA 45S (D-F): A e D) *T. inunguis*; B e E) *T. m. manatus*; C e F) Poque (híbrido).

Figura 7: FISH com sonda de U2 snDNA: a) *T. inunguis*; b) *T. m. manatus*.

Figura 8: FISH com sonda de LINE-1: a) *T. inunguis*; b) *T. m. manatus*; c) Poque.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E TABELA	07
RESUMO	10
1. INTRODUÇÃO	11
1.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE A ORDEM SIRENIA	11
1.2 FAMÍLIA TRICHECHIDAE	13
1.3 ANÁLISES CITOGENÉTICAS	20
1.4 DNA REPETITIVO	22
2. OBJETIVOS	25
2.1 OBJETIVO GERAL.....	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3. MATERIAL E METODOS	25
3.1 AMOSTRAS	25
3.2 OBTENÇÃO DE CROMOSSOMOS MITÓTICOS	26
3.3 CITOGENÉTICA CLÁSSICA.....	26
3.4 CITOGENÉTICA MOLECULAR	27
4- CAPITULO 1: Estudos citogenéticos em peixe-boi (MAMMALIA, SIRENIA, TRICHECHIDAE): uma abordagem evolutiva	31
5- CONCLUSÃO GERAL	56
6-REFERÊNCIAS	57

RESUMO

O gênero *Trichechus* (Sirenia, Trichechidae) é representado por três espécies de peixes-boi: *Trichechus senegalensis*, *T. manatus* (peixe-boi marinho) e *T. inunguis* (TI - peixe-boi da amazônia). Para *T. manatus* são descritas duas subespécies: *T. manatus manatus* (TMM) e *T. manatus latirostris*. Na foz do rio Amazonas (Brasil), as espécies TMM e TI coabitam (simpátricas) e são capazes de reproduzir, gerando híbridos. No presente estudo, comparamos citogeneticamente as espécies TMM e TI e seu provável híbrido, com o objetivo de inferir processos de evolução cromossômica e organização genômica de certos marcadores de DNA repetitivo em *Trichechus*. Nossos resultados evidenciaram $2n=56$ com $NFa=86$ para TI, $2n=48$ com $NFa=82$ para TMM, e $2n=50$ com $NFa=88$ para o provável espécime híbrido. Em todos os casos, a heterocromatina constitutiva apresentou-se distribuída na região pericentromérica dos cromossomos. A análise comparativa de cariótipos G-bandeados de TI e TMM, demonstrou dez possíveis pares cromossômicos com homologias conservadas, três possíveis rearranjos robertsonianos e uma possível inversão paracêntrica. A comparação de cariótipos G-bandeados do híbrido com TI e TMM, evidenciou 4 possíveis pares de cromossomos autossomos comuns aos espécimes estudados, 4 possíveis pares homólogos à TMM, 2 possíveis pares homólogos à TI e 13 pares sem similaridade de bandas. Nossos resultados indicam que o espécime híbrido provavelmente é de segunda geração com reprodução entre parentais de $2n = 52$ (híbrido de primeira geração) e 48 (peixe-boi marinho). Em todos os indivíduos, a FISH mostrou DNA ribossomal 45S localizado no braço curto do par 20 coincidindo com a região organizadora de nucléolo (NOR), nota-se que o padrão de bandejamento G semelhante, sugerindo que o par 20 é conservado entre os *Trichechus*. O mapeamento de sequências teloméricas (TTAGGG) apresentam-se em regiões distais dos cromossomos. A distribuição do elemento transponível LINE-1 apresenta-se pericentromérica e dispersa ao longo dos cromossomos. Entretanto, no par 1 de TMM, se observou marcações de LINE-1 com padrão similar a bandas G. Essas marcações podem estar associadas a recente distribuição do retroelemento no genoma das espécies. Em TI e TMM, o U2 snDNA apresentou clusters em regiões pericentroméricas e marcações dispersas em outras regiões cromossômicas, demonstra a alta dinâmica dessas sequências. O resultado do alinhamento da sequência de U2 snDNA revelou similaridade com a espécie *Loxodonta africana*. Considerando a filogenia de *Trichechus* e os resultados do presente estudo, sugerimos que rearranjos do tipo fusão e fissão, foram os principais mecanismos responsáveis pela evolução cromossômica das espécies TI e TMM, com redução do $2n = 56$ para $2n = 48$.

Palavras-chaves: Peixe-boi, híbrido, DNAs repetitivos, Sirenia, *Trichechus*.

1. INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE A ORDEM SIRENIA

Os primeiros registros fósseis da ordem Sirenia datam no período Eoceno, que correspondem a Era Cenozóica, cerca de 50 milhões de anos atrás (DOMNING, 2009). O ápice da diversidade dos sirênios ocorreu no Mioceno, onde era possível encontrar inúmeros gêneros e espécies com diversidade morfológica e alimentar; atualmente, essa fauna sofreu vários declínios ocasionados pelas alterações climáticas, geológicas, oceanográficas e ações antrópicas (DOMNING, 1981; DOMNING, 2009; MARSH *et al.*, 2011).

As espécies que constituem a ordem Sirenia evoluíram de um ancestral quadrúpede que habitava a terra; as características modificadas envolvem os membros posteriores que foram degenerados e os pêlos que cobriam todo corpo sofreram rigorosa perda, restando poucos fios dispersos ao longo do corpo (RONALD *et al.*, 1978). Atualmente, esses animais vivem exclusivamente no ambiente aquático com distribuição no mar, estuários ou rios de águas rasas ou costeiras (BERTRAM & BERTRAM 1973; SATHASIVAM, 2004). São mamíferos herbívoros que se alimentam de macrófitas aquáticas e semi-aquáticas, consumindo espécies endêmicas no ambiente em que vivem (BEST, 1983; COLARES & COLARES, 2002).

As relações filogenéticas da Ordem Sirenia são estabelecidas na superordem Paenungulata, que também agrupa elefantes, hiras; esta superordem é inclusa no clado Afrotheria. Estudos de marcadores de DNA mitocondrial e nuclear (SPRINGER *et al.*, 1999), pintura cromossômica (PARDINI *et al.*, 2007) e dados utilizando retrotransposon sugerem a monofilia de Paenungulata, sugerindo que as divergências entre as ordens ocorreram em curto período (NISHIHARA *et al.*, 2005).

As ordens Proboscidea, Desmostylia (extinto), Hyracoidea, Tubulidentata e Sirenia são consideradas grupos que estão estreitamente relacionados, pois compartilham o mesmo ancestral terrestre (O'SHEA, 1994; THEWISSEN AND DOMNING, 1992; DOMNING, 2001). Simpson (1945) propôs a hipótese que as ordens Sirenia, Proboscidea e Hyracoidea fossem agrupadas na super ordem Paenungulata (Afrotheria) (SPRINGER *et al.*, 2003). McKenna (1975) propôs que a ordem Sirenia, Proboscidea (elefantes) e a extinta Desmostylia fossem reunidas no clado monofiletico em Tethytheria (**Figura 1**).

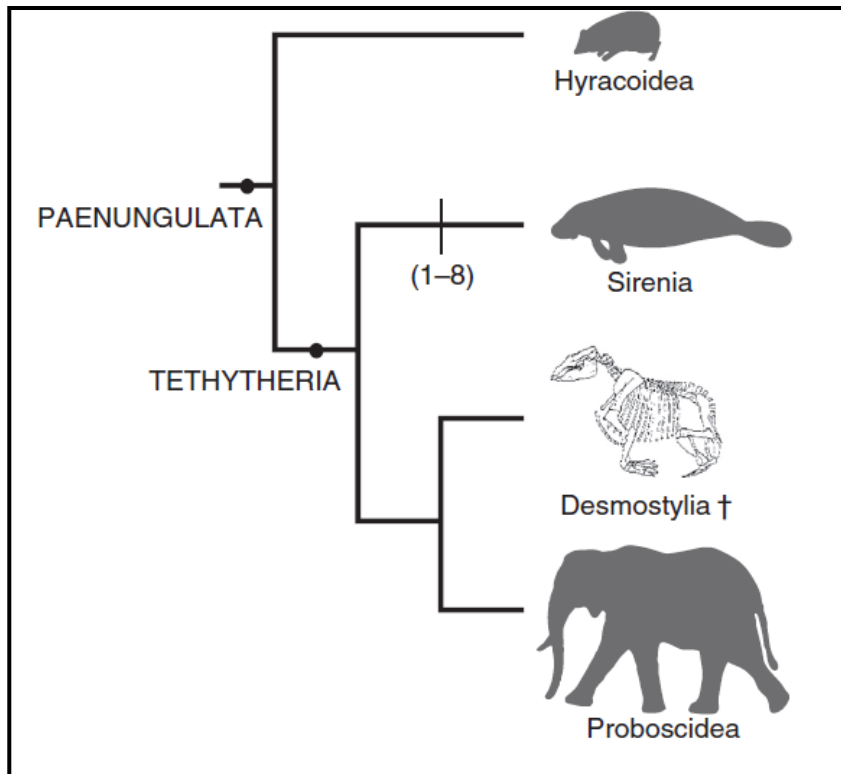


Figura 1: Cladograma ilustrando a posição e relação da Ordem Sirenia com os seus parentais elucidando os tetiterias (†= extinto), como proporstro por MCKENNA (1975).
 Fonte: BERTA *et al.*, 2015.

A ordem Sirenia consiste em quatro espécies pertencentes a duas famílias: Dugongidae e Trichechidae. A família Dugongidae é representada pela espécie *Dugong dugon* Müller, 1776, com distribuição nos oceanos Índico e Pacífico (HUSAR, 1978c). A família Trichechidae é constituída apenas pelo gênero *Trichechus*, que agrupa três espécies de peixes-boi: *Trichechus inunguis* Natterer, 1883 (peixe-boi amazônico), *Trichechus senegalensis* Link, 1795 (peixe-boi africano) e *Trichechus manatus* (marinho) Linnaeus, 1758. Para esta última espécie foram classificadas duas subespécies: *Trichechus manatus manatus* Linnaeus, 1758 e *Trichechus manatus latirostris* Harlan, 1824 (HUSAR, 1978c; FORSTEN & YOUNGMAN, 1982; MARSH & LEFEBVRE, 1994; SATHASIVAM, 2004).

1.2 FAMÍLIA TRICHECHIDAE

A família Trichechidae é composta por um único gênero com três espécies de peixes-boi distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais (**Figura 2**): *Trichechus inunguis* (peixe-boi da Amazônia) que se encontra difundida ao longo da Bacia Amazônica; *Trichechus manatus* (peixe-boi marinho ou das Índias Ocidentais) ao longo do continente americano, desde a Flórida (EUA) até a região Nordeste do Brasil habitando as águas costeiras e rios; *Trichechus senegalensis* (peixe-boi africano), cuja distribuição abrange o continente africano desde o Senegal até Angola, sendo encontrado ao longo da costa, estuários e rios (MARSH *et al.*, 1986; MARSH & LEFEBVRE, 1994; VIANNA *et al.*, 2007; DOMNING, 2001). Há registros de hibridação de espécies encontradas na América do Sul (GARCIA-RODRIGUEZ *et al.*, 1998; VIANNA *et al.*, 2006).

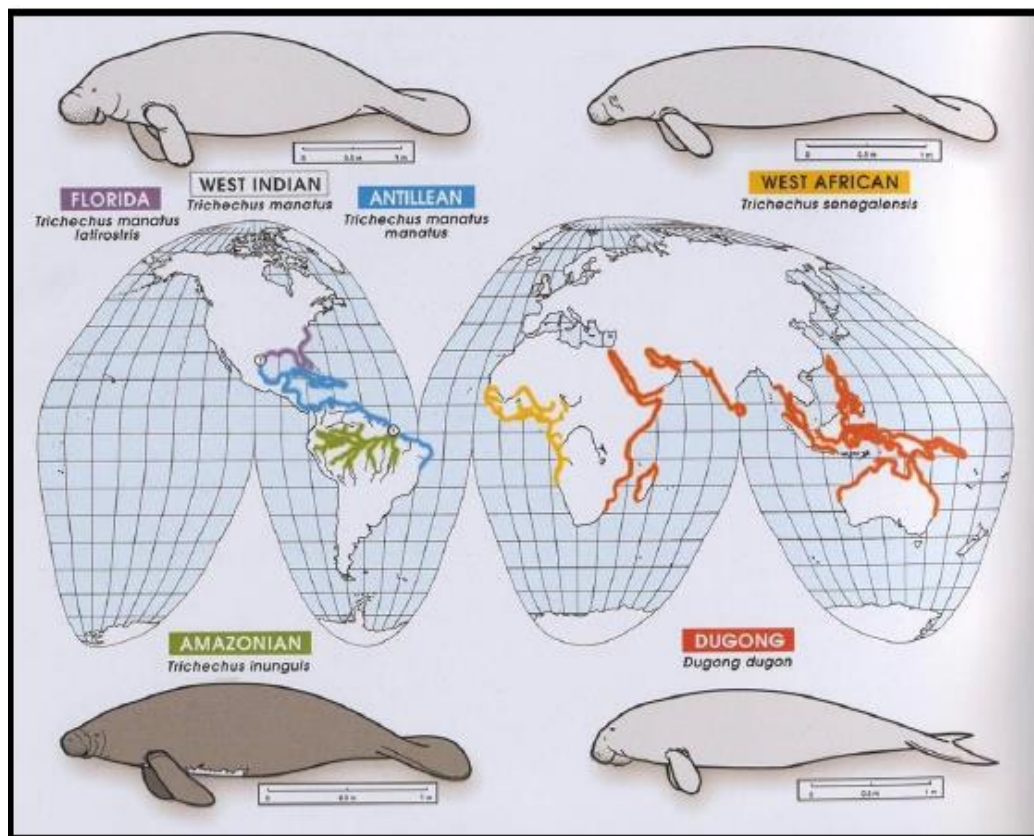


Figura 2: Distribuição das espécies da família Trichechidae (*Trichechus manatus*, *T. inunguis* e *T. senegalensis*) e Dugongidae (*Dugong dugon*), incluindo as subespécies derivadas do peixe-boi marinho (*Trichechus manatus latirostris* e *T. manatus manatus*).
Fonte: Houlguin-Medina, 2008.

As relações filogenéticas entre *Trichechus* por estudos morfológicos sugerem *Trichechus inunguis* basal em relação as demais espécies (**Figura 3**) (DOMNING, 1994). Cantanhede *et al.* (2005), ao realizarem análise filogeográfica de *Trichechus* sugeriram que *T. manatus* pode ser uma espécie parafilética. Vianna *et al.*, (2006), analisando a região de controle do mtDNA, evidenciaram três haplótipos distintos para *T. manatus*, agrupando as populações desta espécie em três clusters diferentes: o cluster 1 (Flórida, México, Grandes Antilhas, América Central e Caribe Costa da América do Sul) apresenta monofilia com *T. inunguis*, corroborando a hipótese de que *T. manatus* pode ser uma espécie parafilética. As relações pela árvore neighbour-joining (NJ) e máxima parcimônia (MP) utilizando citocromo b (menos propensa a homoplasias) sugerem a existência da monofilia do gênero, mas posicionam o peixe-boi amazônico como basal e as espécies marinha derivadas do mesmo ancestral (VIANNA *et al.*, 2006).

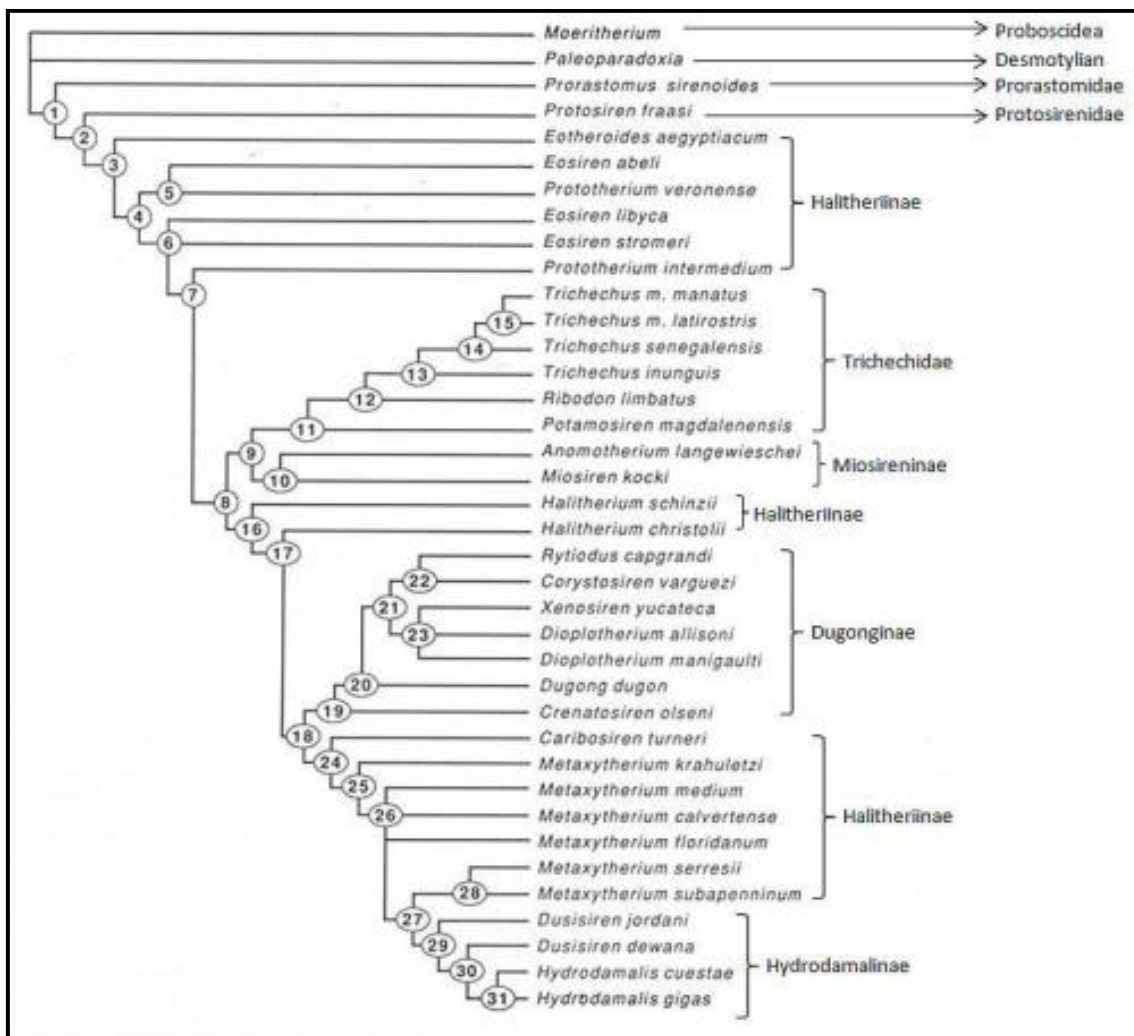


Figura 3: Relações filogenéticas da ordem Sirenia com base na morfologia. Fonte: Domning (1994), modificado por Prista (2012).

1.2.1 *Trichechus manatus* Linnaeus, 1758

O nome *Trichechus manatus* (**Figura 4**) é de origem grega e caribenha, as palavras gregas *trichos* (pêlos) e *ekh* (ter/possuir), expressam a presença de pêlos no corpo e face, já o termo caribenho *manati* refere-se à presença de glândulas mamárias (REYNOLDS III *et al.*, 2009). Pela necessidade alimentar e remoção de ectoparasitas, o peixe-boi marinho é capaz de entrar em fonte de água doce (HATMAN, 1979; LIMA *et al.*, 2011).



Figura 4: Espécime de *Trichechus manatus manatus* do cativeiro do Centro Nacional de Pesquisas e Conservação de Mamíferos Aquáticos (CMA), Itamaracá-Pernambuco. Foto: Monique Chagas.

No Brasil, o peixe-boi marinho pode ser encontrado no litoral da Região Norte com população estimada em 207 animais distribuídos no estado do Pará, Amapá e Maranhão (considerado Norte, por questões ambientais), a população do litoral Nordeste é superior com 242 (valor estimado) indivíduos dispostos ao longo do estado de Alagoas, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte, Ceará e Piauí, com descontinuidades em algumas regiões e ausência no estado de Sergipe (LUNA *et al.*, 2008a; LUNA *et al.*, 2008b; LUNA *et al.*, 2008c; LIMA *et al.*, 2011).

Dados disponíveis na literatura com base nas análises óssea e tecidual, principalmente peculiaridades de morfometria geométrica do crânio, apoiam a hipótese da existência de duas subespécies para *T. manatus*, identificados como *Trichechus manatus manatus* e *Trichechus manatus latirostris* (HATT, 1934; DOMNING E HAYEK, 1986).

Barros *et al.* (2016) retornaram com o estudo sobre as subespécies dos triquequídeos utilizando a morfometria geométrica craniana em 3D e estudos cromossômicos para compreender suas diferenças. Os resultados obtidos a respeito da análise morfométrica (**Figura 5**), evidenciam a diferença da população encontrada no Brasil (*Trichechus manatus manatus*) das demais encontradas no Caribe (*Trichechus manatus manatus*) e nos EUA (*T. manatus latirostris*). A ocorrência da variação de *T. manatus manatus* está associada a barreiras geográficas, como rio Amazonas, uma vez que pode influenciar na interrupção do fluxo gênico (BARROS *et al.*, 2016).

Estudos utilizando marcadores moleculares, como DNA mitocondrial e microssatélites (GARCIA-RODRIGUEZ *et al.*, 1998; CANTANHEDE *et al.*, 2005; VIANNA *et al.*, 2006; HUNTER *et al.*, 2012), não concordam com a divisão de *T. manatus* em subespécies, como proposto por dados morfológicos. Dessa maneira, análise de DNA mitocondrial identificou três clusters para o peixe-boi marinho: uma linhagem na região da Florida e Índias Ocidentais (Colômbia, Puerto Rico e República Dominicana); a segunda na porção do Golfo do México e rios Caribenhos (Colômbia, Venezuela e México); e a terceira na América do Sul, na região Nordeste do Brasil e na Guiana (GARCIA-RODRIGUEZ *et al.*, 1998; VIANNA *et al.*, 2006).

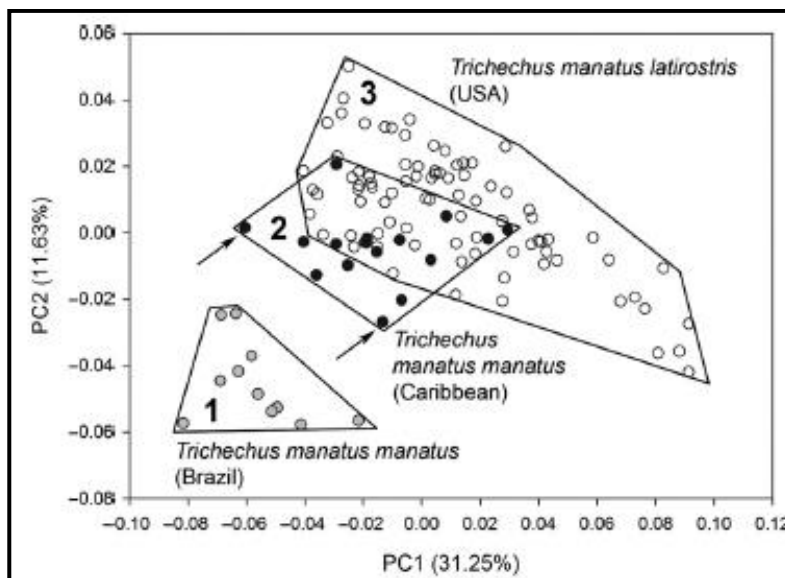


Figura 5: Resultados da Análise de Componentes Principais (Principal Component Analysis- PCA) com as coordenadas do teste estatístico Procrustes. *Trichechus manatus manatus* do Brasil (1), *Trichechus manatus manatus* caribenha e as setas representam a população da Guiana (acima) e Suriname (abaixo) (2) e *Trichechus manatus latirostris* (3). Fonte: Barros *et al.*, 2016.

Morfologicamente *Trichechus manatus* pesa menos de 500 kg com cerca de 3 a 4 metros (HUSAR, 1977a). A pele do peixe-boi marinho sofre transições na tonalidade de cinza a marrom, em alguns momentos nota-se o crescimento de algas ao longo do seu corpo robusto, conferindo a coloração verde observada em alguns animais, aparentemente os pêlos são incolores (JEFFERSON *et al.*, 1993) e a presença de quatro unhas na nadadeira frontal (LUNA *et al.*, 2010).

As espécies brasileiras desde o período colonial sofrem com a pressão da caça predatória e pela falta de ambiente adequado que ofereçam abrigos para serem utilizados como berçários para que os filhotes não estejam sujeitos a desgarre, assim reduzindo a abundância (LUNA *et al.*, 2008a). Apesar de serem protegidos por lei desde o fim da década de 1960, somente duas décadas mais tarde iniciaram as medidas cabíveis através do Projeto Peixe-boi Marinho do IBAMA (LUNA *et al.*, 2008b), e o Plano de Ação Nacional Para a Conservação dos Sirênios (LUNA *et al.*, 2011).

1.2.2 *Trichechus inunguis* Natterer, 1883

O nome científico do peixe-boi Amazônico, *Trichechus inunguis*, (**Figura 6**) foi escolhido devido à ausência de unhas, uma das características da morfologia externa (HUSAR, 1977b; ROSAS, 1994).



Figura 6: *Trichechus inunguis*, peixe-boi da Amazônia (Fonte: ICMBio).

O peixe-boi da Amazônia é restrito a ambiente de água doce da Bacia Amazônica (BERTRAM & BERTRAM 1973; MARSH *et al.*, 1986), onde a sua distribuição depende da disponibilidade de alimento (BEST, 1983).

A morfologia externa e esquelética, *T. inunguis* é o mais derivado (DOMNING & HAYEK, 1986). O tamanho do crânio é menor (BARROS *et al.*, 2016). É a menor espécie, quando comparada às outras do mesmo gênero, podendo pesar cerca de 450kg e o comprimento pode chegar ao alcance de 3 metros (JEFFERSON *et al.*, 1993). Outras características para identificar a espécie são: machas presentes na porção ventral de cor clara, ausências de unhas nas nadadeiras, a coloração corporal escura com tonalidade de cinza escuro a preta, e a pele lisa (HUSAR, 1977b; RONALD *et al.*, 1978; ROSA, 1994; REYNOLDS III *et al.*, 2009).

A população de peixe-boi Amazônico foi drasticamente reduzida no período pré-colonial (SANTOS & SANTOS, 2005), a carne e a gordura eram aproveitadas na alimentação e a gordura se utilizava na iluminação doméstica (VERISSIMO, 1970).

1.2.3 Híbrido

A hibridação é um termo que se refere ao cruzamento de populações geneticamente distintas e independente da taxonomia (RHYMER & SIMBERLOFF, 1996). A frequência da hibridação está relacionada com os mecanismos de isolamento reprodutivo pré-zigóticos e pós-zigóticos, por seleção natural com intuito de evitar a ocorrência de híbridos ou espera-se que sejam espécies menos viáveis no meio ambiente (MALLET, 2005). Geralmente híbridos de primeira geração possuem vigor híbrido, porém, são menos aptos e férteis; há casos de híbridos mais aptos que contribuem para adaptação por introgressão de alelos simples ou por recombinação de genótipos (BARTON, 2001; MALLET, 2005)

Garcia-Rodriguez *et al.* (1998) foram os primeiros a apresentarem a ocorrência de hibridação interespecífica em peixe-boi, onde três indivíduos da Guiana Francesa foram descritos como *Trichechus manatus*, contudo, através dos resultados de DNA mitocondrial, foi possível identificar haplótipos correspondendo a *T. inunguis*. Vianna *et al.* (2006) utilizando análise de DNA mitocondrial, microssatélite e citogenética, também identificaram híbridos entre suas amostras de *Trichechus*. Mediante análise de DNA mitocondrial, identificaram quatro espécimes *T. manatus* com haplótipos correspondentes a *T. inunguis*, e um *T. inunguis* com haplótipos correspondentes a *T. manatus*. Entre os híbridos descritos com o estudo de microssatélites e cromossomos,

foram relatados dois casos de espécimes híbridos de segunda geração ($2n=50$), resultante do cruzamento entre um híbrido de primeira geração ($2n=52$) e um peixe-boi marinho (*T. manatus*, $2n=48$), assim sugerindo que híbridos de peixe-boi encontrados na natureza são viáveis.



Figura 7: Provável peixe-boi híbrido de segunda geração (Poque) presente no Cativeiro Nacional de Pesquisa e Conservação de Mamíferos Aquáticos (CMA), Itamaracá-Pernambuco. Foto: Monique Chagas

Vianna *et al.* (2006) constataram que os híbridos foram encontrados em áreas onde as espécies marinha e amazônica vivem em simpatria, essa região se estende pela foz (boca) do Rio Amazonas ao oeste da Guiana.

Bérubé e Aguilar (1998) reforçam que a ocorrência de hibridação interespecífica pode ser ocasionada quando espécies possuem necessidades de habitat semelhantes. Dessa forma, a ocorrência das espécies nessa região se deve ao ambiente atrativo com excelente fonte alimentar, presença de água doce e a fatores abióticos propícios (LUNA *et al.*, 2008a; LUNA *et al.*, 2008c; LUNA *et al.*, 2010 LIMA *et al.*, 2011).

São conhecidos 57 híbridos cetáceos e 1.144 híbridos para a superfamília pinípedes (SCHAURICH *et al.*, 2012). Em alguns estudos com base na análise morfológica, molecular e citogenética foi possível documentar casos de mamíferos aquáticos híbridos, descendentes de cruzamento entre *Balaenoptera physalus* (barbatana) e *B. musculus* (baleia azul) (ARNASON *et al.*, 1991; BÉRUBÉ & AGUILAR, 1998),

Tursiops truncatus (golfinho-de-nariz-de-garrafa) e *Sotalia guianensis* (boto-cinza) (CABALLERO & BAKER, 2010), entre outros mamíferos (BRUNNER, 2002; YAZDI, 2002; WILLIS *et al.*, 2004). Descrições de hibridações foram igualmente inferidas para outros vertebrados aquáticos, como em tartarugas *Chelonia mydas* (tartaruga-verde) e *Eretmochelys imbricata* (tartaruga-de-pente) (WOOD *et al.*, 1983), *Eretmochelys imbricata* (tartaruga-de-pente) e *Caretta caretta* (cabeçuda) (PROIETTI *et al.*, 2014). E peixes entre o cruzamento das espécies *Colossoma macropomum* e *Piaractus brachypomus* (NIRCHIO *et al.*, 2003). As consequências evolutivas resultantes deste processo de hibridação envolvem fatores relacionados à aptidão, frequência de ocorrência, sistemas reprodutivos, história evolutiva e grau de diferenciação genética das espécies envolvidas (ARNOLD, 1992; SCHAURICH *et al.*, 2012).

1.3 ANÁLISES CITOGENÉTICAS: *Trichechus*

Estudos de citogenética clássica para a Ordem Sirenia são conhecidos para *T. inunguis* e para as subespécies *Trichechus manatus manatus* e *T. manatus latirostris*. Até o momento, não há informações citogenéticas para *T. senegalensis*.

O espécime *T. inunguis* capturado em Letícia na Colômbia, apresentou o número diploide (2n) igual a 56 cromossomos, com cariótipo composto de 7 pares de cromossomos metacêntricos, 3 submetacêntricos, 2 subacrocêntricos e 13 pares acrocêntricos. Os cromossomos sexuais são distintos dos demais, com X submetacêntrico e Y acrocêntrico. Os autores não apresentaram a imagem do cariótipo. Posteriormente, Assis *et al.* (1988), descrevem o número diploide, 2n=56, porém os espécimes analisados por estes autores apresentaram cariótipo com 14 pares de cromossomos meta e submetacêntricos, e 13 pares de cromossomos acrocêntricos (NFa=82), com X submetacêntrico e Y acrocêntrico. Estas análises incluem a descrição da heterocromatina constitutiva pericentromérica, bandeamento G e um par com marcação Ag-NOR, localizada no par 20 (acrocêntrico).

Em relação a *T. manatus manatus*, Vianna *et al.* (2006) relataram que a população brasileira de *T. m. manatus* possui 2n=48 (cariótipo não apresentado), com 2n semelhante ao da Flórida. Segundo Barros *et al.* (2016), o cariótipo de *T. m. manatus* do Brasil, apresenta 2n=48 e é composto de 9 cromossomos metacêntricos, 5 submetacêntricos, 8 subtlocêntricos e 1 acrocêntrico, com NF=90. Por outro lado, Hunter *et al.* (2012), fizeram análises de bandeamento G em espécimes de *T. m. manatus* provenientes de Porto

Rico com NFa=92 e constataram cariótipo com 10 cromossomos subtelocêntricos, 5 submetacêntricos e 8 metacêntricos, diferente daquele analisado por Barros et al. (2010).

O primeiro cariótipo de *T. manatus latirostris* foi descrito por White et al. (1976), com 2n=48 e organização cromossômica em três grupos, de acordo com a morfologia dos cromossomos (1º grupo formado por submetacêntrico e subacrocentrico; 2º metacêntrico; 3º acrocentrico), os cromossomos sexuais X e Y foram identificados como submetacêntrico e acrocentrico, respectivamente. Gray et al., (2002) estudaram a espécie *T. manatus latirostris* por técnicas de bandeamentos cromossômicos G, Q e C. Os resultados demonstraram 2n=48, com NF=96, HC localizada na região pericentromérica, e Ag-NOR no par 20 para esta subespécie.

Tabela 1: Revisão das informações cromossômicas em *Trichechus*.

Espécie	Localidade	2n/NF	Técnicas Citogenéticas	Referências
<i>Trichechus inunguis</i>				
<i>T. inunguis</i>	Colômbia	56/-	Convencional	LOUGHMAN et al., 1970
<i>T. inunguis</i>	Brasil, Colômbia	56/82	BG, BC, NOR	ASSIS et al., 1988
<i>Trichechus manatus manatus</i>				
<i>T. m. manatus</i>	Brasil	48/-	convencional	VIANNA et al., 2006
<i>T. m. manatus</i>	Porto Rico	48/-	BG	HUNTER et al., 2012
<i>T. m. manatus</i>	Brasil	48/90	BG, BC, NOR	BARROS et al., 2016
<i>Trichechus manatus latirostris</i>				
<i>T. m. latirostris</i>	-	48/-	convencional	WHITE et al., 1976
<i>T. m. latirostris</i>	-	48/96	BG, BC, BQ	GRAY et al., 2002

A análise utilizando citogenética molecular foram aplicadas, até o momento, na espécie *Trichechus manatus latirostris* com pintura cromossômica utilizando sondas de humano (HSA) (KELLOGG et al., 2007) e a ZOO-FISH foi realizada para compreender a estrutura cromossômica e evolução do grupo (PARDINI et al., 2007). Foram observados 44 segmentos conservados entre o genoma de HSA e *T. manatus latirostris*. No cromossomo 7 foram encontrados três sinais evidentes da hibridização de HSA 12 favorecendo provavelmente uma inversão pericêntrica. Outras sondas demonstraram alta reorganização genômica, como por exemplo, HSA2 que mostrou sinais de hibridização

nos cromossomos 10, 15, 17 e 23 de *T. m. latirostris*, e também HSA3 que hibridou em segmentos dos cromossomos 6, 9, 15, 17, 19 desta subespécie. As informações obtidas por mapeamento cromossomo apoiam a subordem Tethytheria (associação entre Sirenia e Proboscidea), Paenungulata e Afrotheria (KELLOGG *et al.*, 2007).

Pardini *et al.* (2007) empregaram a pintura cromossômica cruzada (ZOO-FISH) com sondas específicas de elefante (*Loxodonta africana*), peixe-boi marinho (*Trichechus manatus latirostris*) e hyrax (*Procavia capensis*), e usaram *Orycteropus afer* (porco-da-terra) e o humano como outgroup. Essas análises levantaram informações importantes sobre as variações cromossômicas ocorridas em cada táxon ao longo da evolução, assim contribuindo para a construção do cariótipo ancestral Paenungulata ($2n=58$) e corroboram a hipótese a respeito dos Paenungulatas (**Figura 8**).

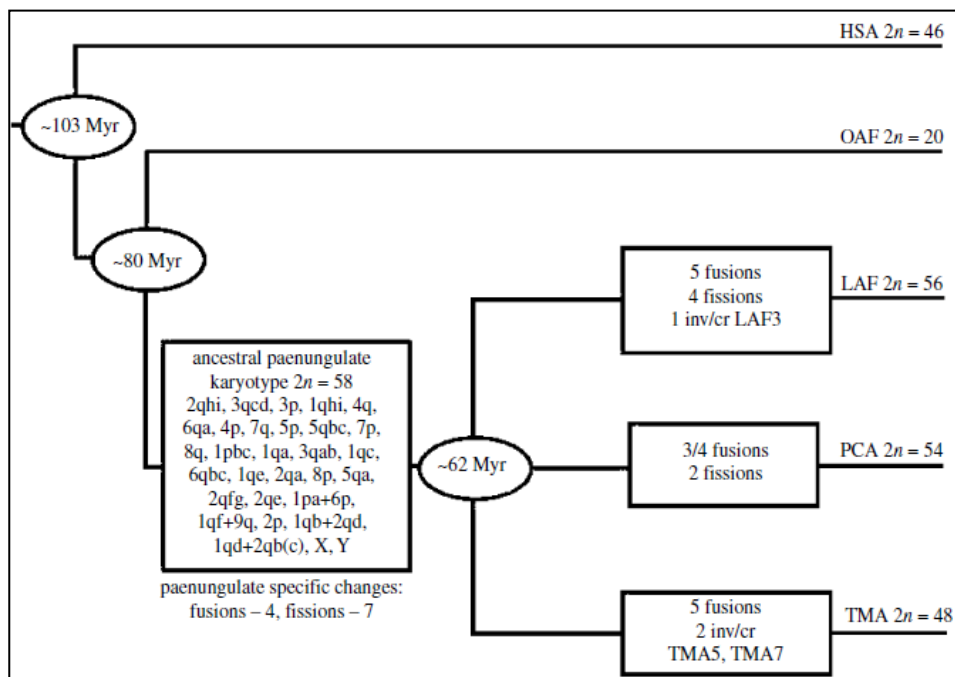


Figura 8: Árvore filogenética representando o cariótipo ancestral Paenungulata (APK) constituído através das alterações cromossômicas de elefante (LAF), peixe-boi (TMA) e hyrax (PCA). Fonte: PARDINI *et al.*, 2007.

1.4 DNA REPETITIVO

1.4.1 Aspectos gerais e classificação

As sequências de DNA repetitivo estão presentes substancialmente na composição do genoma de organismos eucariontes, por se encontrar repetidas em centenas ou milhares

de vezes, proporcionando maior porção do conteúdo no DNA nuclear (HARDMAN, 1986; BISCOTTI *et al.*, 2015).

As sequências repetitivas, durante muitos anos foram conhecidas como “DNA lixo” (junk DNA) ou “DNA parasita”, por não apresentarem ação funcional definida (ORGEL & CRICK, 1980; SHAPIRO & STERNBERG, 2005; CABRAL-DE-MELLO & MARTINS, 2010b). Entretanto, estudos sugerem que esse tipo de DNA está relacionado aos processos biológicos essenciais, influenciando na organização estrutural e funcional do genoma (BISCOTTI *et al.*, 2007; MARTINS *et al.*, 2011).

O conhecimento das características das sequências repetitivas é importante para compreender a sua distribuição, organização, comportamento e o potencial funcional (MEHROTA & GOYAL, 2014). Dessa maneira, os DNAs repetitivos abrangem as famílias multigênicas, DNAs satélites, microssatélites, minissatélites e elementos transponíveis, que podem apresentar-se intercaladas ou *in tandem* no genoma (JUAN *et al.*, 1993; CHARLESWORTH *et al.*, 1994; CABRAL-DE-MELLO & MARTINS, 2010b).

Dentre as famílias multigênicas, estão os genes que transcrevem os RNAs ribossomais 18S+5,8S+28S (DNAr 45S) e seus espaçadores intergênicos inclusos no RNA mensageiro. Essas sequências são moderadamente repetitivas e se localizam em um ou mais pares cromossômicos; esses sítios correspondem às regiões organizadoras de nucléolo (construção secundária); outra classe que compõe as famílias de multigenes ribossômicos são as sequências que transcrevem o RNAr 5S (compostas por aproximadamente 120 pares de bases conservadas) e seus espaçadores não-transcritos organizados *in tandem*; (LONG E DAWID 1980; INAFUKU *et al.*, 2000; MARTINS & WASKO, 2004; GUERRA, 2004; ALVES-COSTA, 2006). As unidades de DNAr *in tandem* podem se encontrar dispostas no cromossomo em regiões pericentromérica, telomérica, subtelométrica ou/e intercalada (KUBIS *et al.*, 1998).

O gene *small nuclear RNAs* (snRNA), outro representante da família multigênica, é um dos componentes do complexo ribonucleoproteico (snPNPS) que são responsáveis pelo processo de splicing no RNAm (GUTHRIE & PATTERSON, 1988; UBEDA-MANZANARO *et al.*, 2010). Igualmente atuando no processo de transcrição e desempenhando funções importantes na homeostase celular (VALADKHAN, 2005). O U2 snDNA geralmente é conservado em um par cromossômico (ALMEIDA *et al.*, 2017), porém, ele pode estar associado a outros multigenes (UTSUNOMIA *et al.*, 2014) ou apresentarem de forma dispersa (UBEDA-MANZANARO *et al.*, 2010).

Os elementos transponíveis (ETs) são classificados de acordo com a molécula intermediária, em elementos de classe I ou retrotransposon e os de classe II ou transposons. Os elementos de classe I ou retrotransposons atuam utilizando a transcriptase reversa, para realizar a transposição através de uma molécula intermediária de RNA, processo semelhante ao usado pelos retrovírus; os retrotransposons podem ser divididos em diversas subclasses, entre estes estão: LTR (LTR- *Long Terminal Repeat*) que possuem longas sequências de repetições nas suas extremidades; e retrotransposons não-LTR, cuja estrutura não apresenta tais sequências terminais (CHARLESWORTH, 1994; KAZAZIAN, 2004; GRIFFITHS *et al.*, 2008). Os não-LTR são elementos nucleares conhecidos por serem interdispersos (LINEs) e curtos (SINEs), e por apresentarem nas terminações, sequências de nucleotídeos poli-A (VARANI *et al.*, 2015).

LINE-1 (*Long Interspersed Nuclear Element*) é um elemento transponível não-LTR que possui todos os componentes necessários para realizar a transposição (autônomo), em sua estrutura, apresenta um 5'UTR com promotor de RNA polimerase II, dois *Open Reading Frame* (OFR-1 codifica proteínas de ligação com o RNA e OFR-2 codifica proteínas para realizar atividade de endonuclease e transcriptase reversa), uma 3'UTR com uma cadeia de poliadenilação (KLEIN & O'NEILL, 2018).

LINE-1 é um retrotransposon abundante no genoma de mamíferos, em humanos compreende 17% do genoma (BOEKE, 1997), atua como elemento de reforço no processo de inativação do cromossomo X, disseminando sequências para possivelmente estabilizar e realizar o processo de dosagem de genes ligados ao cromossomo X (LYON, 2000).

Os ETs são importantes componentes do DNA que podem atuar no controle da atividade gênica, mediante a inserção de genes alterando sua estrutura e expressão, conseqüentemente desencadeando rearranjos cromossômicos (deleções, inversões, translocações, duplicação e amplificação) que contribuem para mapeamento genético e para elucidar estudos filogenéticos e populacionais (O'DONNELL & BURNS, 2010; OZOUF-COSTAZ; 2003). No homem, a perda da aptidão ocasiona o desenvolvimento de doenças genéticas causadas por mutações (CHARLESWORTH *et al.*, 1994). Em alguns casos, as mutações podem não apresentar efeitos deletérios, mas como fonte de diversidade gênica dos organismos com potencial evolutivo (BIÉMONTE & VIEIRA, 2006; RAO *et al.*, 2010).

Na análise de citogenética molecular, sondas contendo DNAs repetitivos são importantes marcadores cromossômicos para estudos de evolução das espécies,

identificação de cromossomos supernumerários, cromossomos sexuais e os rearranjos cromossômicos (CABRAL-DE-MELLO *et al.*, 2010a). Até o momento, não foram realizadas análises citogenéticas de sequências repetitivas em Trichechidae, isso mostra a necessidade de estudos de mapeamentos comparativos de sequências repetitivas, que permitirão compreender a organização genômica e possíveis rearranjos cromossômicos ocorridos indicando uma perspectiva sobre a evolução cariotípica na família.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar e comparar citogeneticamente amostras de peixe-boi amazônico (TI), peixe-boi marinho (TMM) e o provável híbrido (Poque), de forma a contribuir na compreensão do processo evolutivo e contribuir com estudos de conservação do grupo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Caracterizar o cariótipo das espécies de *Trichechus* comparando número diploide (2n) e número fundamental (NF) e distribuição de heterocromatina constitutiva (HC);
- b) Descrever as homologias cromossômicas entre as espécies de peixes-boi marinho, amazônico e híbrido, por bandeamento G, e propor possíveis rearranjos cromossômicos ocorridos.
- c) Realizar mapeamento físico de sequências teloméricas, DNA ribossomal 45S, U2 snDNA e do Elemento de Transposição LINE-1, por Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH);

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS

As amostras de sangue utilizadas no presente estudo foram compostas por 3 de exemplares macho e 3 fêmeas de *Trichechus inunguis* (peixe-boi-da-Amazônia) e 2 machos e duas fêmeas *Trichechus manatus manatus* (peixe-boi marinho) provenientes, respectivamente, do cativeiro da Faculdades Integradas do Tapajós em Santarém no Estado do Pará (Brasil) e Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Mamíferos Aquáticos (CMA), localizado no município de Itamaracá no Estado de Pernambuco

(Brasil). Um provável híbrido (“Poque”) foi coletado no cativeiro do CMA, Itamaracá-Pernambuco, Brasil. Autorização de coleta SISBIO (Número: 44915-1).

3.2 OBTENÇÃO DE CROMOSSOMOS MITÓTICOS

As preparações para obtenção de cromossomos metafásicos foram realizadas mediante a técnica de cultura temporária de linfócitos, segundo o protocolo desenvolvido por Moorhead *et al.* (1960), com modificações para peixe-boi:

O protocolo consistiu na coleta de 5 mL de sangue do animal utilizando seringa contendo anticoagulante heparina. Foram semeados 0,5 mL de sangue total em 5 mL meio de RPMI-1640. Posteriormente, as amostras foram incubadas na estufa contendo CO₂ à 37°C durante 72 horas, para que ocorra o cultivo celular. Durante o período de incubação, as preparações foram homogeneizadas delicadamente duas vezes ao dia. Todos os procedimentos foram executados em ambiente estéril.

Uma hora antes do término do processo de incubação de 72 horas, foi adicionado 0,1 mL de colchicina (concentração 1:40; Colchemid). Esse tratamento impede a formação do fuso acromático, assim promovendo o bloqueio e acúmulo temporário de células em metáfase. Após adição do alcalóide, as preparações retornaram à estufa para a conclusão do cultivo.

Ao finalizar o processo de incubação na estufa, o material foi transferido para tubo falcon de 15 mL, ressuspendido e submetido ao processo de centrifugação a 1000 RPM durante cinco minutos. O sobrenadante foi descartado e substituído por solução hipotônica (KCL) 0,075M, previamente aquecida na estufa a 37°C, ressuspendindo e novamente armazenado em estufa de CO₂ a 37°C durante 20 minutos. Logo após, foi adicionado 1 mL de fixador gelado (4 mL de metanol para 1 mL de ácido acético) para interromper a ação da hipotonização, e imediatamente ressuspendido e centrifugado a 1000 RPM por 5 minutos. Novamente o sobrenadante foi descartado e substituído por 5 mL de fixador 4:1 gelado, homogeneizado e armazenado no freezer.

3.4 CITOGENÉTICA CLÁSSICA

3.4.1 Técnica de coloração convencional

As lâminas com o material fixado, foram coradas utilizando Giemsa a 10% diluída em tampão fosfato com o pH 6,8, na proporção 1:3, durante 6 minutos. Posteriormente as lâminas foram lavadas e deixadas a secar em temperatura ambiente.

3.4.2 Técnica Bandeamento G

Os protocolos utilizados na técnica de bandeamento G foram descritos por Seabright (1971) e Verna e Babu (1995) com modificações:

As lâminas com material cromossômico foram submetidas a ação da solução proteolítica da tripsina (0,1%) em temperatura ambiente por 25 segundos, posteriormente foram imersas em solução salina (2xSSC) à 60°C durante 5 segundos, lavadas com água destilada gelada para interromper a ação dos reagentes, secas ao ar e coradas com Wright na proporção 3:1 (1mL de Wright para 3 mL de tampão fosfato pH 6,8) durante 2 minutos para evidenciar o padrão de bandas.

3.4.3 Técnica Bandeamento C

A detecção da heterocromatina constitutiva foi obtida segundo o protocolo descrito por Summer (1972), com modificações:

As lâminas foram submetidas ao tratamento de ácido clorídrico 0,2N em temperatura ambiente durante 10 minutos. Posteriormente imersas na solução de hidróxido de bário ($Ba(OH)_2$) 2% durante 18 segundos e submetidas imediatamente ao ácido clorídrico 0,1N durante 10 segundos para neutralizar a ação da base, ambos procedimentos em 60°C. Logo após as lâminas foram expostas a solução salina de 2xSSC à 60°C por 12 minutos, lavadas e coradas com Wright na proporção 3:1 (1mL de Wright para 3 mL de tampão fosfato pH 6,8) durante 3 minutos.

3.5 CITOGENÉTICA MOLECULAR

3.5.1 Extração de DNA

O processo de extração de DNA seguiu o protocolo fenol-clorofórmio descrito por Sambrook *et al.* (1989), com as modificações necessárias para as amostras de sangue de *Trichechus manatus manatus* e *T. inunguis* de modo que:

Foram adicionados 200 µL de sangue, 300µL de tampão de homogeneização, 300 µL de tampão de lise e 20 µL de proteinase K em um eppendorf. Homogeneizar a solução e deposita em banho-maria á 55°C durante 30 minutos, agitando cuidadosamente a cada 10 minutos. Após o tempo de incubação, deixar a solução esfriar em temperatura ambiente. Adicionar 700 µL de fenol-clorofórmio e homogeneizado cuidadosamente, centrifugado a 1.4000 RPM durante 15 minutos e o sobrenadante transferido para outro recipiente. Em seguida, acrescentados 700 µL de clorofórmio-álcool isoamílico concentração

2:1, novamente foi devidamente homogeneizado, centrifugado e sobrenadante retirado foi depositado em outro recipiente. Após, foi inserido 100 µL de acetato de sódio (3M com pH 4,8) e devidamente misturado. Para a precipitação do DNA, foi necessário adicionar 700 µL de isopraonol, misturar, centrifugar a 14000 RPM durante 10 minutos e o sobrenadante retirado foi descartado. Etanol 70% gelado será acrescido, homogeneizado, centrifugado a 1.4000 RPM por 5 minutos e sobrenadante descartado novamente. Armazenar o recipiente com o DNA na estufa a 37°C para secar.

Ao finalizar o processo de extração, as amostras de DNA foram quantificadas no equipamento Epoch Microplate Spectrophotometer (Biotek Instruments) com software Gen5 2.03.1 e, se necessário, diluídas para concentração de 100ng/ µL.

3.5.2 Amplificação de DNAs Repetitivos

Sonda de repetições teloméricas de vertebrados foi produzida por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando-se primers complementares (TTAGGG)_n e (CCCTAA)_n, na ausência de DNA molde segundo Idjo *et al.* (1991). Sondas rDNA 45S foram produzidas utilizando o plasmídeo pTa71, que contém a sequência completa deste rDNA isolado do genoma de *Triticum aestivum* (GERLACH AND BEDBROOK, 1979). Sondas LINE-1 (genoma de roedor) foram amplificadas por PCR empregando-se os primers forward 5'-ATTCTRTTCCATTGGTCTA-3' e reverse 5'-CCATGCTCATSGATTGG-3' como descrito por Dobigny, (2002) e Waters *et al.*, (2004). A amplificação de genes de U2 snDNA (artrópodes) utilizado os primers F5'-TCT CGG CCT (AT)(AT)T GGC TAA-3' e R5'-G(AC)G GTA (GC)TG CAA TAC CGG-3'. (COLGAN *et al.*, 1998). Os produtos da PCR foram examinados por eletroforese em gel de agarose 1%.

A Reação da Cadeia Polimerase foi composta por 2,5 µL de tampão Buffer 10x (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCL), 0,75 µL de MgCl₂ (50 mM), 1,5 µL de dNTP (8 mM), 100ng de DNA total, 1,5 µL forward + 1,5 µL de reverse específico para cada gene e 1,5 U de Taq DNA Polymerase.

Os ciclos de amplificação e as temperaturas utilizadas foram: 1 ciclo de 95°C por 5 minutos para desnaturação inicial do DNA genômico contendo a sequência a ser amplificada; 30 ciclos com 95°C por 40 segundos para desnaturação, 40 segundos a temperatura específica para anelamento de cada *primer* e 2 minutos a 72°C para extensão; um ciclo de 72°C por 4 minutos.

3.5.3 Marcação das sondas

As preparações obtidas a partir das PCRs foram marcadas utilizando kits de *Nick Translation*. Para marcações de sondas com biotina utilizamos o kit BioNick Labeling System (Invitrogen); sondas marcadas com digoxigenina foram produzidas através do kit DIG-Nick Translation Mix (Roche), conforme as instruções do fabricante.

3.5.4 Hibridização *in situ* fluorescente (FISH)

A técnica de hibridização *in situ* fluorescente seguiu o protocolo proposto por Yang *et al.* (2003), com as seguintes modificações para as espécies de *Trichechus*:

3.5.4.1 Lavagem de estrigência

As lâminas contendo as melhores metáfases mitóticas foram submetidas ao pré-tratamento com solução de pepsina a 1% (50 mL de HCL 4,8N para 0,5 mL de pepsina) durante 5 minutos em temperatura ambiente, para remover o excesso de material citoplasmático presente. As lâminas foram mergulhadas três vezes em solução salina (2xSSC) por 1 minuto para cada recipiente. Em seguida, as lâminas foram desidratadas em bateria de álcool (2 vezes 70% e 2 vezes 90%, ambos por 2 minutos; e 1 vez em 100% durante 15 minutos), e depositadas na estufa a 65°C durante uma hora.

3.5.4.2 Hibridização

As lâminas foram mergulhadas em formamida 70% (70 mL de formamida + 30 mL de 2xSSC), pré-aquecida em banho-maria à 65°C, durante 1 minuto para a desnaturação dos cromossomos. Ao término do tempo necessário, as lâminas foram imersas em etanol gelado 70%, com intuito de interromper a ação da formamida, e repetindo a desidratação na bateria de álcool. Posteriormente, foram adicionadas as sondas nas lâminas secas (10µL de tampão de hibridização + 2,0µL de sonda), previamente desnaturada á 70°C durante 15 minutos. Uma lamínula é aplicada sobre a lâmina com a sonda e seladas com cola PVC. O material foi incubado na estufa a 37° durante 48 horas.

3.5.4.3 Lavagem de estrigência

Após o período de incubação, a lâmina foi submetida em sequências de lavagens a 42°C, para retirar as possíveis marcações inespecífica, nas seguintes soluções: em solução de formamida 50% (50 mL de formamida + 50 mL de 2xSSC) durante 1 minuto, solução salina de 2xSSC por 2 minutos e 4xTween (200 mL de 4xSSC + 100 µL de Tween) por 2 minutos.

3.5.4.4. Detecção da sonda

Para realizar a detecção das sondas de interesse marcadas com moléculas repórteres, biotina ou digoxigenina, foi necessário o preparar e aplicar sobre a lâmina solução de detecção (0,4 µL de anti-digoxigenina FITC + 100µL de 4xTween ou 0,2µL avidina CY3 ou FITC + 200µL de 4xTween) para incubação desta durante 30 minutos em câmara úmida a 37°C. Posteriormente, as lâminas foram mergulhadas em solução de de 4xSSC/Tween à temperatura ambiente por três vezes durante 3 minutos cada. Os cromossomos foram corados com 7 µL de DAPI (4'6-Diamidino-2-fenil-indol) + antifading (Vectashield H-1000 Vector), cobertos com lamínula de vidro 24 x 32mm e seladas.

Após esses procedimentos, as metáfases foram visualizadas e analisadas no microscópio de fluorescência com auxílio do programa Nis-Elements em microscópio Nikon H550S.

4. CAPÍTULO I

Estudos citogenéticos em peixe-boi (MAMMALIA, SIRENIA, TRICHECHIDAE): uma abordagem evolutiva.

Monique Costa de Souza Chagas¹, Carlos Eduardo Matos Carvalho Bastos¹, Fábila de Oliveira Luna³, Fernanda Loffler Nlemeyer Attademo³, Alex Garcia Cavalleiro de Macedo Klautau⁴, Cleusa Yoshiko Nagamachi, ^{1,2}, Julio Cesar Pieczarka ^{1,2}, Renata Coelho Rodrigues Noronha¹

Título: Estudos citogenéticos em peixe-boi (MAMMALIA, SIRENIA, TRICHECHIDAE): uma abordagem evolutiva

Autores: CHAGAS, MCS¹; BASTOS, CEMC¹, LUNA, FO³; ATTADEMO, FLN³; KLAUTAU, AGCM⁴; NAGAMACHI, CY^{1,2}; PIECZARKA, JC^{1,2}, NORONHA, RCR¹

¹Centro de Estudos Avançados em Biodiversidade, Universidade Federal do Pará, Avenida Perimetral, Belém, Pará 66.075-110, Brasil

²Pesquisador CNPq

³Centro Nacional de Manejo, Conservação e Pesquisa de Mamíferos Aquáticos (CMA/ICMBio), Estrada do Forte Orange, s/n., Ilha de Itamaracá, Pernambuco, 53900-000, Brasil

⁴Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, Centro de Pesquisa e Gestão de Recursos Pesqueiros do Litoral Norte, Avenida Tancredo Neves n. 2501, Montese, 66077-530

RESUMO

O gênero *Trichechus* (Sirenia, Trichechidae) é representado por três espécies de peixes-boi: *Trichechus senegalensis*, *T. manatus* (peixe-boi marinho) e *T. inunguis* (TI - peixe boi da amazônia). Para *T. manatus* são descritas duas subespécies: *T. manatus manatus* (TMM) e *T. manatus latirostris*. Na foz do rio Amazonas (Brasil), as espécies TMM e TI coabitam (simpátricas) e são capazes de reproduzir, gerando híbridos. No presente estudo, comparamos citogeneticamente as espécies TMM e TI e seu provável híbrido, com o objetivo de inferir processos de evolução cromossômica e organização genômica de certos marcadores de DNA repetitivo em *Trichechus*. Nossos resultados evidenciaram $2n=56$ com $NFa=86$ para TI, $2n=48$ com $NFa=82$ para TMM, e $2n=50$ com $NFa=88$ para o provável espécime híbrido. Em todos os casos, a heterocromatina constitutiva apresentou-se distribuída na região pericentromérica dos cromossomos. A análise comparativa de cariótipos G-bandeados de TI e TMM, demonstrou dez possíveis pares cromossômicos com homologias conservadas, três possíveis rearranjos robertsonianos e uma possível inversão paracêntrica. A comparação de cariótipos G-bandeados do híbrido com TI e TMM, evidenciou 4 possíveis pares de cromossomos autossomos comuns aos espécimes estudados, 4 possíveis pares homólogos à TMM, 2 possíveis pares homólogos à TI e 13 pares sem similaridade de bandas. Nossos resultados indicam que o espécime híbrido provavelmente é de segunda geração com reprodução entre parentais de $2n=52$ (híbrido de primeira geração) e 48 (peixe-boi marinho). Em todos os indivíduos, a FISH mostrou DNA ribossomal 45S localizado no braço curto do par 20 coincidindo com a

região organizadora de nucléolo (NOR), nota-se que o padrão de bandeamento G semelhante, sugerindo que o par 20 é conservado entre os *Trichechus*. O mapeamento de sequências teloméricas (TTAGGG) apresentam-se em regiões distais dos cromossomos. A distribuição do elemento transponível LINE-1 apresenta-se pericentromérica e dispersa ao longo dos cromossomos. Entretanto, no par 1 de TMM, se observou marcações de LINE-1 com padrão similar a bandas G. Essas marcações podem estar associadas a recente distribuição do retroelemento no genoma das espécies. Em TI e TMM, o U2 snDNA apresentou clusters em regiões pericentroméricas e marcações dispersas em outras regiões cromossômicas, demonstra a alta dinâmica dessas sequências. O resultado do alinhamento da sequência de U2 snDNA revelou similariedade com a espécie *Loxondonta africana*. Considerando a filogenia de *Trichechus* e os resultados do presente estudo, sugerimos que rearranjos do tipo fusão e fissão, foram os principais mecanismos responsáveis pela evolução cromossômica das espécies TI e TMM, com redução do $2n = 56$ para $2n = 48$.

Palavras-chaves: Peixe-boi, híbrido, DNAs repetitivos, Sirenia, *Trichechus*.

INTRODUÇÃO

A ordem Sirenia compreende duas famílias, Dugongidae e Trichechidae, e quatro espécies de mamíferos herbívoros que vivem totalmente no ambiente aquático (DOMNING, 1981; DOMNING, 2009). A família Trichechidae é constituída por um único gênero, *Trichechus*, que compreende três espécies de peixes-boi: *Trichechus inunguis* (peixe-boi-da-Amazônia) que habita ambientes de água doce e encontra-se difundida na Bacia Amazônica; *Trichechus senegalensis* (peixe-boi africano) habitando ambientes marinhos em regiões costeiras do Senegal a Angola; e *Trichechus manatus* distribuído desde a Flórida (EUA) a costa do nordeste brasileiro (HUSAR, 1977a,b; MARSH & LEFEBVRE, 1994; VIANNA *et al.*, 2006).

Estudos baseados na morfometria craniana sugerem a existência de duas subespécies para *T. manatus*: *T. manatus latirostris* (peixe-boi da Flórida) e *T. manatus manatus* (peixe-boi das Antilhas) (HATT, 1934; DOMNING E HAYEK, 1986); análises filogeográficas, utilizando marcadores mitocondriais e morfometria craniana em 3D, evidenciaram que a população de *T. m. manatus* encontrada no Brasil difere significativamente das demais encontradas nas Antilhas (GARCIA-RODRIGUEZ *et al.*, 1998; VIANA *et al.*, 2006; BARROS *et al.* 2016). Segundo, Barros *et al.* (2016) as diferenças detectadas nas duas populações de *T. m. manatus* (Antilhas e Brasil) podem

estar associadas ao rio Amazonas, que possivelmente constitui uma barreira geográfica e reprodutiva, influenciando na interrupção do fluxo gênico entre ambas.

Estudos filogenéticos sugerem casos de hibridação interespecífica, entre *T.m. manatus* (população do Brasil) e *T. inunguis*, por apresentarem compartilhamento de haplótipos e pela variação do número diploide (GARCIA-RODRIGUEZ *et al.*, 1998; VIANNA *et al.*, 2006). *T. inunguis* é restrito a ambientes de água doce da Bacia Amazônica (BEST, 1983; MARSH *et al.*, 1986), enquanto que a espécie marinha (*T. m. manatus*), também pode ser encontrada em ambiente estuarino e fontes de água doce (HARTMAN, 1979; LIMA *et al.*, 2011). No Brasil, foram registrados casos de hibridação entre ambas espécies na foz do Rio Amazonas, onde estas duas espécies coabitam pela necessidade alimentar e fatores abióticos propícios (LUNA *et al.*, 2008a; LUNA *et al.*, 2008b; LUNA *et al.*, 2010; LIMA *et al.*, 2011).

Estudos citogenéticos são pouco utilizados na taxonomia do gênero *Trichechus*. Até o presente momento, apenas *T. manatus latirostris* ($2n = 48$), *T. manatus manatus* ($2n = 48$) e *T. inunguis* ($2n = 56$) apresentam cariótipos descritos (ASSIS *et al.*, 1988; GRAY *et al.*, 2002; HUNTER *et al.*, 2012). Híbridos de segunda geração resultante do cruzamento *T. inunguis* x *T. manatus*, apresentam $2n = 50$ (VIANNA *et al.* 2006). Em todas as espécies analisadas há somente um par cromossômico portador de regiões organizadoras de nucléolo (NOR), e a heterocromatina constitutiva é presente na região pericentromérica (ASSIS *et al.*, 1988; GRAY *et al.*, 2002; BARROS *et al.*, 2016). Por citogenética molecular, Kellogg *et al.* (2007) realizaram mapeamento genômico comparativo, hibridizando sondas de cromossomos totais de humano (HSA) no genoma de *T. m. latirostris* (TMA); este mapeamento cromossômico apoia a associação entre as ordens Sirenia e Proboscidea na subordem Tethytheria, consequentemente apoiando a inclusão destes em categorias taxonômicas superiores, como Paenungulata e Afrotheria.

Pardini *et al.* (2007) empregaram pintura cromossômica recíproca para detectar homologias entre *Loxodonta africana* ($2n=56$), *Procavia capensis* ($2n=54$), *Trichechus manatus latirostris* ($2n=48$), essas análises contribuíram para estabelecer sentenças e variações que ocorreram entre cada uma destas espécies ao longo do processo evolutivo. Apesar da existência de bandeamento G e de sondas de cromossomos totais de espécies de *Trichechus*, nenhuma análise comparativa foi realizada com objetivo de inferir relações evolutivas dentro do gênero.

Análise de citogenética molecular utilizando elementos repetitivos é uma ferramenta importante para compreender a sua organização, distribuição, comportamento e a sua funcionalidade no genoma (MEHROTA & GOYAL, 2014). Entre sequências repetitivas, rDNA 45S e U2 snDNA são amplamente utilizadas em peixes (MANTOVANI *et al.*, 2005; UTSUNOMIA *et al.*, 2014; AYRES-ALVES, 2017), tartarugas (NOLETO *et al.*, 2006; NORONHA *et al.*, 2016), entre outros organismos. Estas famílias multigênicas são organizadas in tandem formando grandes clusters em pares cromossômicos específicos. O U2 snDNA apresenta-se em clusters na maioria dos organismos, porém, em alguns peixes sua distribuição cromossômica foi registrada de forma dispersa (UBEDA-MANZANARO *et al.*, 2010). O LINE-1 (*Long Interspersed Nuclear Element*), retrotransposon não LTR (*Long Terminal Repeat*), possui ampla distribuição no genoma de mamíferos eutheriano (WATERS *et al.*, 2004), muitas vezes atuando como elemento de reforço no processo de inativação do cromossomo X (LYON, 2000). Até o momento não foram mapeados em peixes-boi das espécies *Trichechus inunguis* e *T. m. manatus*.

No presente estudo, comparando os padrões de bandeamentos e distribuição de DNAs repetitivos em *T. m. manatus*, *T. inunguis* e do provável híbrido “Poque”, para esclarecer os rearranjos envolvidos na diferenciação cariotípica destas espécies, sua organização genômica e suas relações evolutivas.

MATERIAL E METODOS

Amostras

As amostras de sangue utilizadas no presente estudo, foram compostas por 3 de exemplares macho e 3 fêmeas de *Trichechus inunguis* (peixe-boi-da-Amazônia) e 2 machos e duas fêmeas *Trichechus manatus manatus* (peixe-boi marinho) provenientes, respectivamente, do cativeiro da Faculdades Integradas do Tapajós em Santarém no Estado do Pará (Brasil) e Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Mamíferos Aquáticos (CMA), localizado no município de Itamaracá no Estado de Pernambuco (Brasil). Um provável híbrido (“Poque”) foi coletado no cativeiro do CMA, Itamaracá-Pernambuco, Brasil. Todos os exemplares foram provenientes de cativeiro, mas originalmente da natureza. Autorização de coleta SISBIO (Número: 44915-1).

Análise do cariótipo

As preparações cromossômicas foram obtidas pela metodologia de cultura temporária de linfócitos segundo o protocolo desenvolvido por Moorhead *et al.* (1960), com as seguintes modificações: foram semeados 0,5 mL de sangue total em 5 mL de meio RPMI-1640 durante 96 horas. Uma hora antes do processo de incubação, foi adicionado 0,1 mL de colchicina (concentração 1:40). As amostras foram submetidas a tratamento hipotônico com KCL 0.075 M durante 20 minutos, e fixadas em solução de ácido acético e metanol (proporção 4:1).

As melhores metáfases foram fotografadas e utilizadas para análise de citogenética clássica. A detecção do padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva (bandeamento C) foi obtida pelo protocolo descrito por Summer (1972). O padrão de bandeamento G foi realizado mediante os protocolos de Seabright (1971) e Verma e Babu (1995). Os ideogramas foram construídos com o auxílio do Adobe Photoshop. As melhores metáfases foram selecionadas e utilizadas para montagem do cariótipo segundo Levan *et al.* (1994), no software Adobe Photoshop versão CS6.

Sondas e Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH)

O DNA genômico de *Trichechus inunguis* foi extraído das amostras de sangue utilizando o protocolo descrito por Sambrook *et al.* (1989).

Sonda de repetições teloméricas de vertebrados foi produzida por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando-se primers complementares (TTAGGG)_n e (CCCTAA)_n, na ausência de DNA molde segundo Idjo *et al.* (1991). Sondas rDNA 45S foram produzidas utilizando o plasmídeo pTa71, que contém a sequência completa deste rDNA isolado do genoma de *Triticum aestivum* (GERLACH & BEDBROOK, 1979). Sondas LINE-1 foram amplificadas por PCR empregando-se os primers forward 5'-ATTCTRTTCCATTGGTCTA-3' e reverse 5'-CCATGCTCATSGATTGG-3' como descrito por Dobigny, (2002) e Waters *et al.*, (2004). A amplificação de genes de U2 snDNA foi utilizado os primers F5'-TCT CGG CCT (AT)(AT)T GGC TAA-3' e R5'-G(AC)G GTA (GC)TG CAA TAC CGG-3'. (COLGAN *et al.*, 1998).

Os produtos da PCR foram examinados por eletroforese em gel de agarose 1%.

As preparações obtidas a partir das PCRs foram marcadas utilizando kits de marcação por *nick translation* com biotina através do kit BioNick Labeling System (Invitrogen) ou com digoxigenina utilizando o kit DIG-Nick Translation Mix (Roche), conforme as instruções dos fabricantes. As hibridizações *in situ* fluorescente foram realizadas seguindo o protocolo descrito por Yang *et al.*, (2003).

As lâminas passaram no pré-tratamento na pepsina durante 20 minutos, em solução salina (2xSSC) durante um minuto em cada um dos três recipientes, desidratadas em bateria de álcool (2 vezes 70% e 2 vezes 90%, ambos por 2 minutos; e 1 vez em 100% durante 15 minutos), e depositadas na estufa a 65°C durante uma hora. Em banho-maria pré-aquecida em 65°C as lâminas foram desnaturadas durante 30 segundos. Ao término do tempo necessário, as lâminas foram imersas em etanol gelado 70%, com intuito de interromper a ação da formamida, e repetindo a desidratação na bateria de álcool. Após esses procedimentos, foram adicionadas as sondas e cobertas por uma lâmina durante 48 horas.

Após o período de incubação, as lâminas foram submetidas em sequências de lavagens a 42°C, para retirar as possíveis marcações inespecífica, nas soluções: formamida 50% (50 mL de formamida + 50 mL de 2xSSC) durante 1 minuto, solução salina de 2xSSC por 2 minutos e 4xTween (200 mL de 4xSSC + 100 µL de Tween) por 2 minutos. As sondas foram detectadas com Avidina-Cy3 ou Anti-digoxigenina-FITC. Os cromossomos foram contrastados com DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) contendo antifading Vectashield (Vector).

A captura das imagens de FISH foram digitalizadas por uma câmera CCD AxioCam MRm (Nikon) acoplada ao microscópio de Epifluorescencia Nikon H550S (programa Nis-Elements AR (Nikon)).

RESULTADOS

Citogenética comparativa entre *T. inunguis* e *T. manatus*

Os espécimes de *Trichechus inunguis* (TI) analisados apresentaram cariótipo com $2n=58$ e número fundamental autossômico (NFa) igual a 86, composto por 16 pares de dois braços (metacêntrico e submetacêntrico) do conjunto cromossômico e 11 pares acrocêntricos, o sistema de determinação sexual é do tipo XY, com X submetacêntrico e Y acrocêntrico (**Figura 1**). Através da análise de bandeamento G foi possível identificar o pareamento de todos os cromossomos (**Figura 1a**). A heterocromatina constitutiva (HC) foi identificada na região pericentromérica de todos os pares (**Figura 1b**).

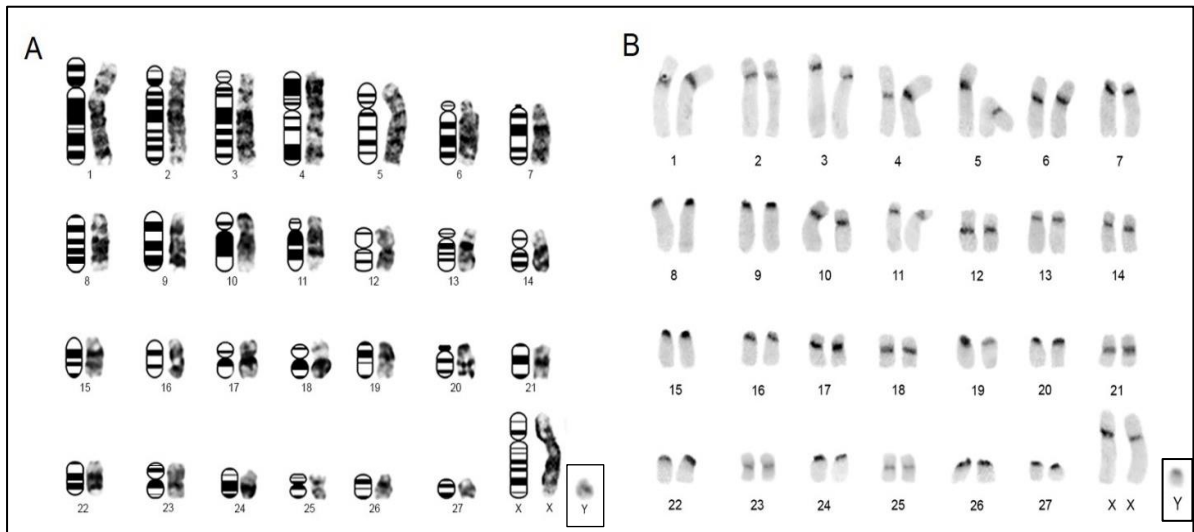


Figura 1: Cariótipos de *Trichechus inunguis* ($2n=56$): a) Bandejamento G e idiograma; b) Bandejamento C.

O exemplar de *T. m. manatus* (TMM) apresentou $2n=48$ e $NFa=82$, com 20 pares de dois braços cromossômicos e 3 pares de cromossomos acrocêntricos; o par sexual é do tipo XY, com X submetacêntrico e Y acrocêntrico (**Figura 2**). O bandejamento G permitiu identificar o pareamento de todos os cromossomos (**Figura 2a**), e a heterocromatina constitutiva apresentou distribuída na região pericentromérica de todos os cromossomos (**Figura 2b**).

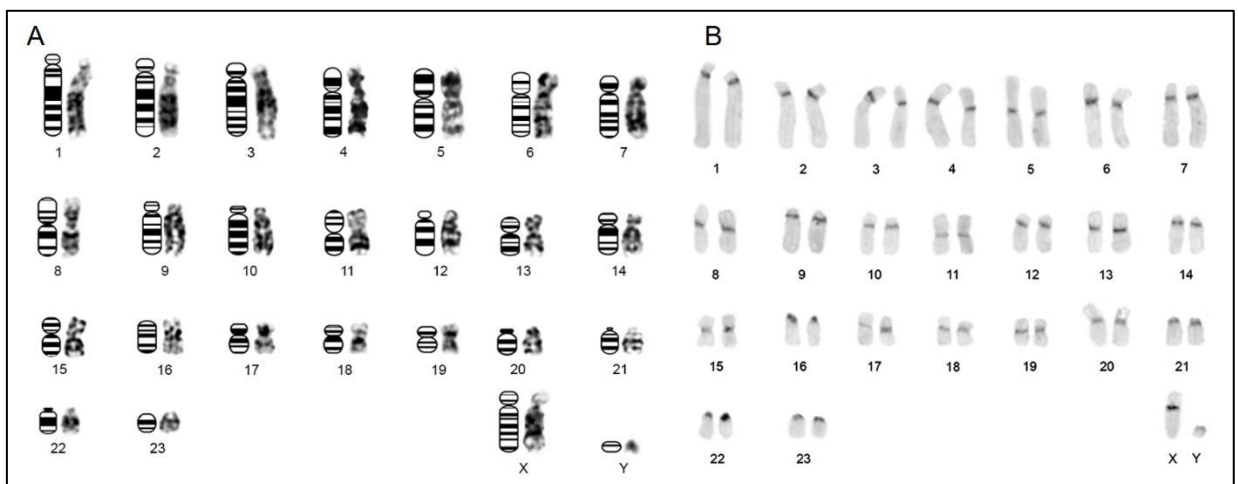


Figura 2: Cariótipos de *Trichechus manatus manatus* ($2n=48$): a) Bandejamento G e idiograma; b) Bandejamento C.

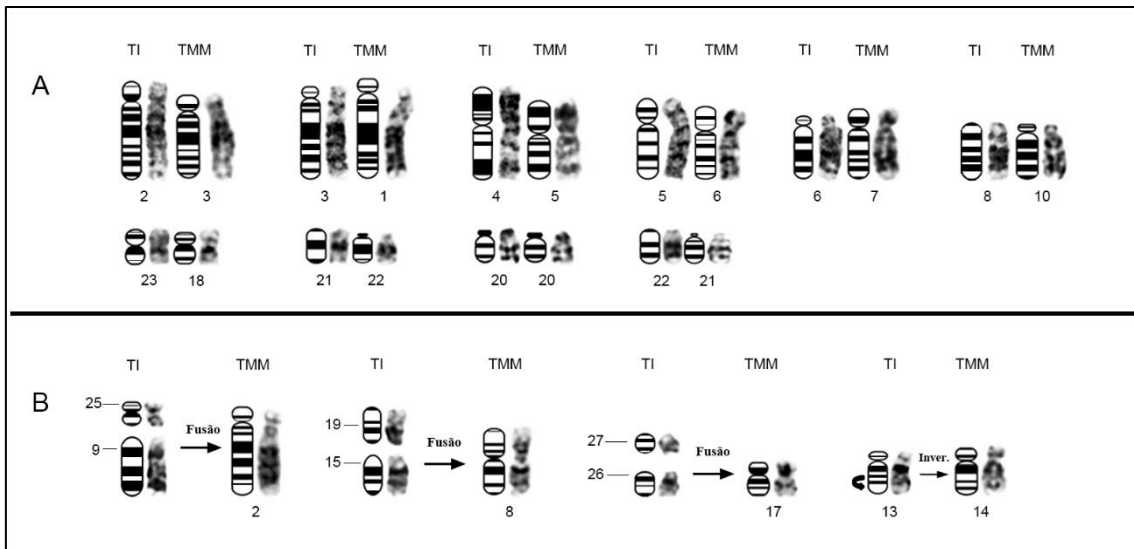


Figura 3: Análise comparativa entre *Trichechus inunguis* (TI) e *T. m. manatus* (TMM): a) Possíveis homologias cromossômicas; b) Possíveis rearranjos cromossômicos inferidos por bandeamento G e idiograma.

Análises entre TI e TMM, utilizando padrões de bandeamento G permitiu identificar possíveis homologias cromossômicas; dessa maneira, ao fazer comparações entre os cariótipos de ambas as espécies, observamos 10 pares de cromossomos conservados: o par 2 de TI (2TI) tem homologia com o cromossomo 3 de TMM (3TMM); 3TI-1TMM; 4TI-5TMM; 5TI-6TMM; 6TI-7TMM; 8TI-10TMM; 23TI-18TMM; 21TI-22TMM; 20TI-20TMM; e 22TI-21TMM (**Figura 3a**).

Do mesmo modo, pelo padrão de bandeamento G foram identificados alguns rearranjos estruturais: fusão entre os pares 25 e 9 de TI que correspondem ao cromossomo 2 de TMM; fusão entre os pares 19 e 15 de TI, correspondentes ao 8 de TMM; a fusão *in tandem* do par 27 e 26 de TI correspondendo ao par 17 de TMM; e uma inversão paracêntrica no braço longo do cromossomo 13 de TI, correspondendo ao cromossomo 14 de TMM (**Figura 3b**).

Caracterização citogenética de um provável híbrido de *Trichechus*

Entre as amostras coletadas no Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Mamíferos Aquáticos (CMA), um espécime resgatado do Amapá, é considerado um provável híbrido. O “Poque” apresentou cariótipo distinto das espécies TI e TMM, com $2n=50$ e $NFa= 88$, sendo composto por 20 pares cromossômicos com dois braços e 4 acrocêntricos, com X submetacêntrico e Y acrocêntrico (**Figura 4**). Através do

bandeamento G foi possível identificar o pareamento dos cromossomos (**Figura 4a**), e HC presente em todos os pares na região pericentromérica (**Figura 4b**).

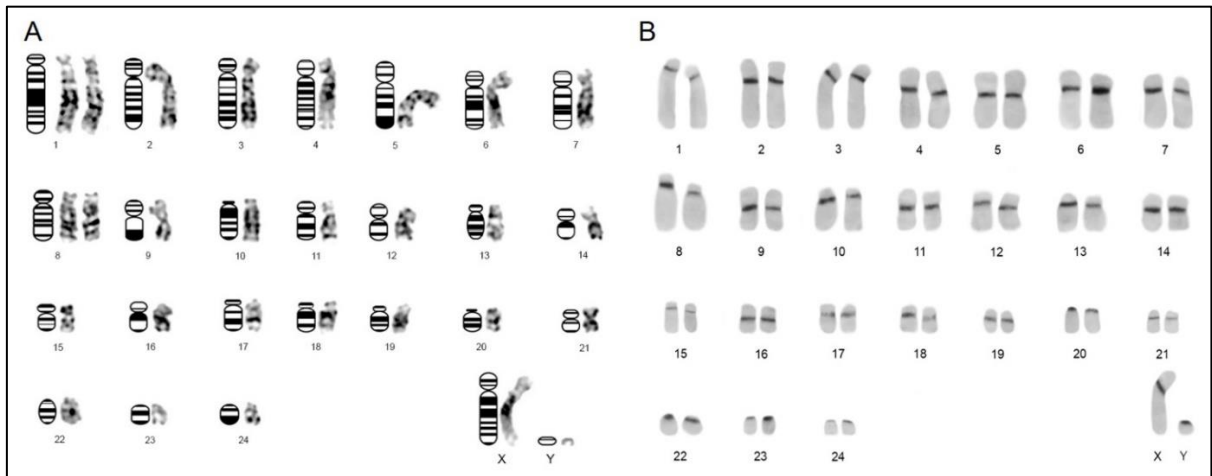


Figura 4: Cariótipos do provável híbrido “Poque” ($2n=50$): a) Bandeamento G; b) Bandeamento C.

Com base na análise comparativa entre os padrões de bandeamento G de “Poque”, TI e TMM identificamos 4 pares cromossômicos conservados e compartilhados entre as duas espécies e o provável híbrido: o cromossomo 1 do “Poque” (PQ) tem homologia com o cromossomo 3 de TI e o 1 de TMM; 4PQ com homologia com 2TI e 3TMM; 5PQ com 4TI e com 5TMM; e 20PQ com 20TI-20TMM (**Figura 5a**). Por outro lado, foram observados 4 pares que apresentaram homologias apenas entre PQ e TMM: o par 2PQ-6TMM, 7PQ-7TMM, 8PQ-8TMM e o 15PQ-17TMM (**Figura 5b**). Entre PQ e TI também foi possível estabelecer 2 pares conservados, são eles: 16PQ-17TI e 24PQ-27TI (**Figura 5c**).

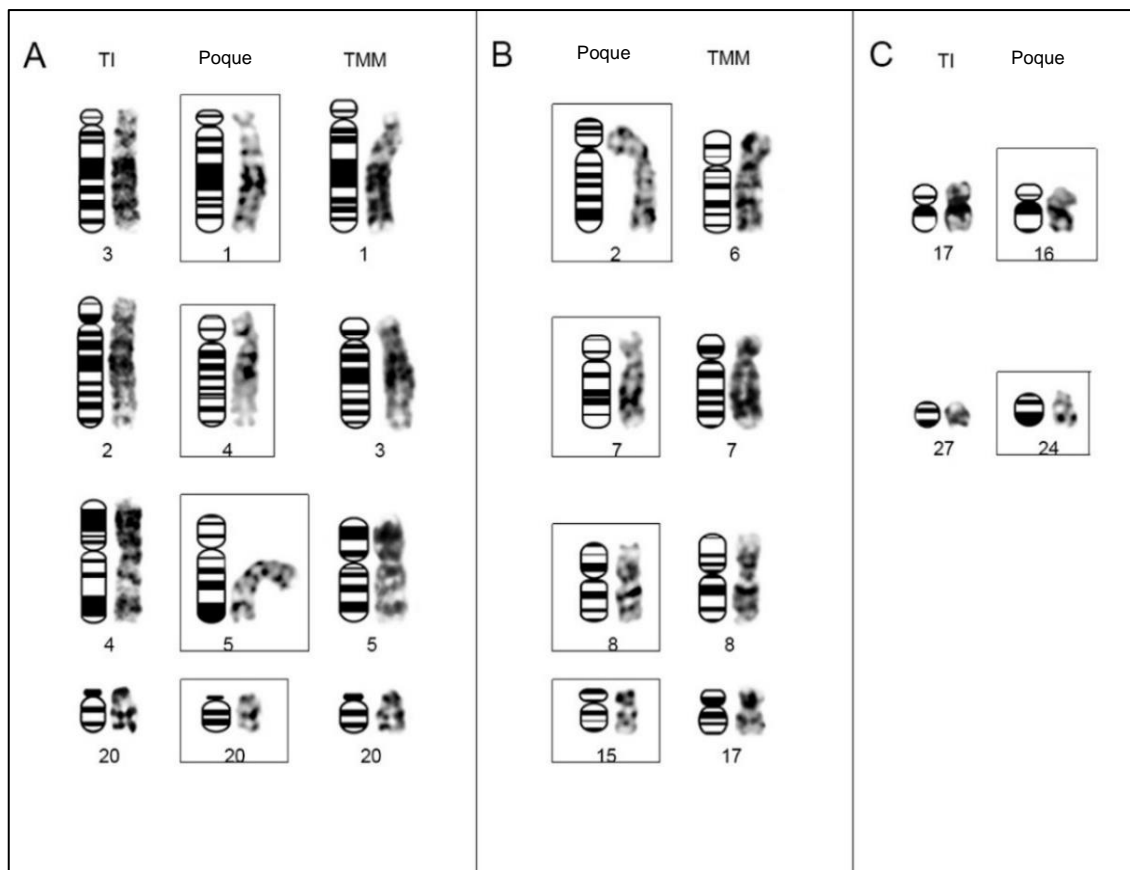


Figura 5: Análise comparativa entre *Trichechus*: a) Possíveis homologias entre *Trichechus inunguis* (TI), *T. m. manatus* (TMM) e híbrido “Poque”; b) Entre híbrido e TMM; c) Entre híbrido e TI.

Citogenética molecular

As hibridizações com sondas de sequências teloméricas (TTAGG) apresentou distribuição nas regiões distais de todos os cromossomos em TI (**Figura 6a**), TMM (**Figura 6b**) e Poque (**Figura 6c**) não sendo evidenciadas marcações nas regiões intersticiais (ITS). Sonda de rDNA 45S demonstrou que esta sequência se localiza no braço curto do par cromossômico 20, em TI (**Figura 6d**), TMM (**Figura 6e**) e Poque (**Figura 6f**).

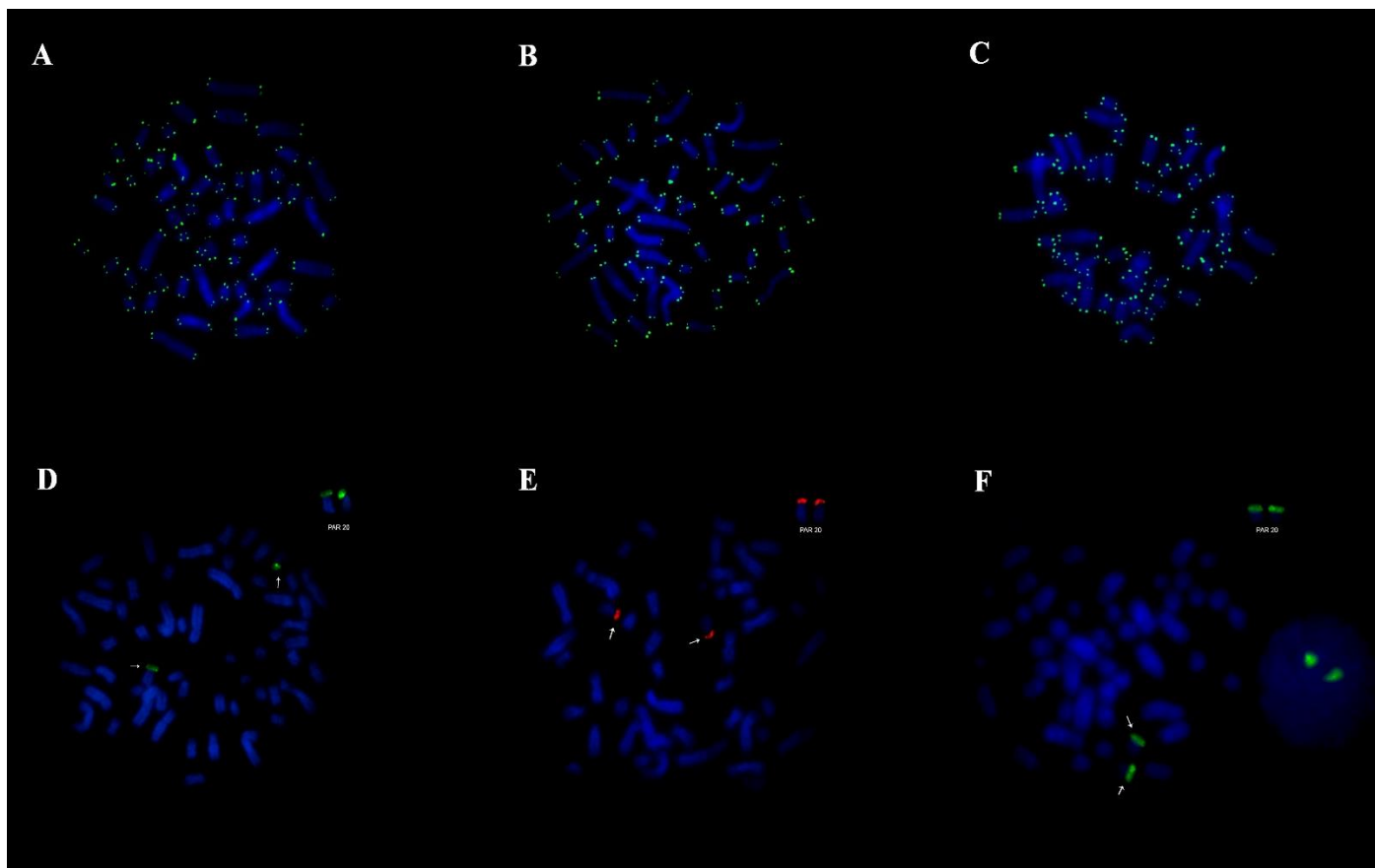


Figura 6: FISH com sonda de seqüências teloméricas (a-c) e rDNA 45S (D-F): A e D) *T. inunguis*; B e E) *T. m. manatus*; C e F) Poque.

FISH com sondas de U2 snDNA produziu sinais dispersos ao longo dos cromossomos, com acumulações na região pericentromérica em TI (**Figura 7a**) e TMM (**Figura 7b**). O resultado do alinhamento dessa seqüência foi realizado pelo programa BLAST, e revelou similariedade com *Loxodontia africana* (ordem Probociedea).

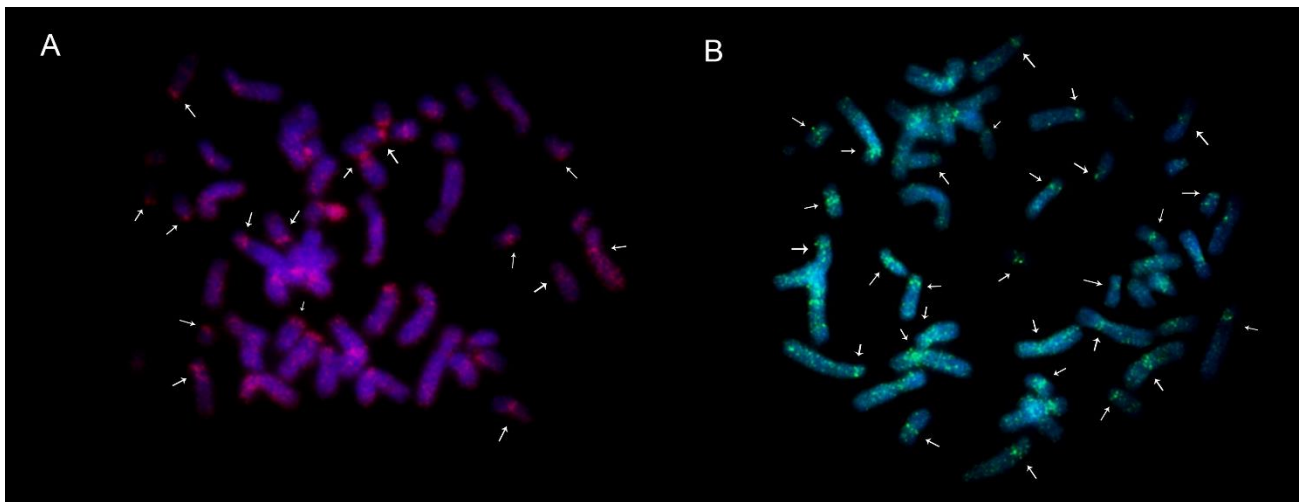


Figura 7: FISH com sonda de U2 snDNA: a) *T. inunguis*; b) *T. m. manatus*.

O retrotransposon LINE-1 (L1), apresentou padrão de distribuição disperso nas cromátides e com pontos de acumulação em regiões pericentroméricas nos cariótipos de TI (Figura 8a), TMM (Figura 8b) e Poque (Figura 7c).

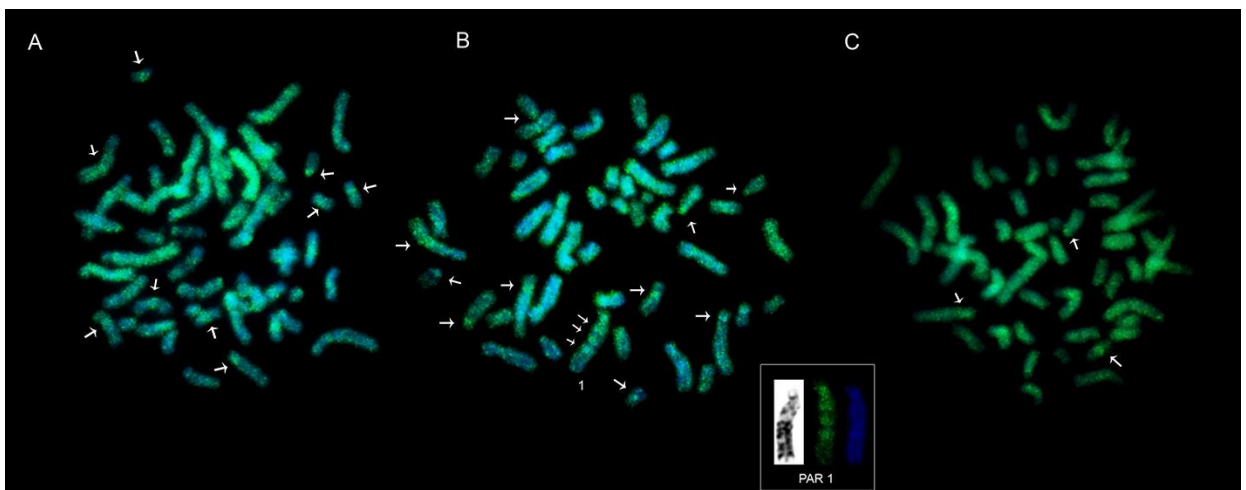


Figura 8: FISH com sonda de LINE-1: a) *T. inunguis*; b) *T. m. manatus*; c) Poque.

DISCUSSÃO

Citogenética clássica

As análises citogenéticas realizadas no presente estudo mostraram os cariótipos de *T. inunguis* com $2n=56$ e *T. m. manatus* com $2n=48$. Esses dados estão de acordo com número diploide, descrito anteriormente para ambas as espécies (LOUGHMAN *et al.*, 1970; ASSIS *et al.*, 1988; VIANNA *et al.* 2006; HUNTER *et al.*, 2012; BARROS *et al.*, 2016). No entanto, comparando nossos dados do número fundamental (NF=86 para TI e NF=82 para TMM) com os descritos na literatura, observamos diferenças entre populações da mesma espécie. Para o peixe-boi amazônico, Loughman *et al.* (1970) identificaram NF=74 para um espécime proveniente de Letícia (Colômbia), e Assis *et al.* (1988) descreveram NF=82 para espécimes coletados em Manaus (Amazonas, Brasil) e Letícia (Colômbia). As variações também foram observadas para TMM, onde Barros *et al.* (2016) descreveram NF=90 para exemplares do Brasil, enquanto Hunter *et al.* (2012) verificaram NF=92 para amostra de Porto Rico. As diferenças do número fundamental entre estas populações podem estar associadas aos rearranjos do tipo inversão pericêntrica, uma vez que não há mudança do $2n$, e demonstram a existência de variações geográficas no cariótipo das espécies de *Trichechus*.

Os resultados comparativos de nossas análises de bandeamento G entre TI e TMM demonstraram três possíveis eventos de rearranjos robertsonianos entre estas espécies. Levando em consideração que *Trichechus inunguis* é filogeneticamente basal em relação às outras espécies do gênero (DOMNING, 1994; VIANNA *et al.* 2006), sugerimos que durante a evolução cromossômica de *Trichechus*, os principais mecanismos responsáveis pela diferenciação de TI e TMM foram fusões centricas, levando a redução do número diploide 56 para 48. No presente estudo, por exemplo, encontramos três possíveis fusões entre ambas as espécies. Porém, é perceptível que outros tipos de rearranjos cromossômicos podem ter contribuído para diferenciação destas espécies, como a inversão paracêntrica do par 13 de TI, observada em nossos resultados. Gray *et al.* (2002), sugerem que rearranjos como inversões, translocações e fusão *in tandem* também podem estar associadas a evolução deste grupo.

Em sirênios, a heterocromatina constitutiva apresenta-se apenas na região pericentromérica, sem sítios intersticiais e heteromorfismos; apesar disso, as regiões de HC podem estar implicadas na ocorrência de rearranjos robertsonianos em *Trichechus*. Este tipo de rearranjo (fusão) envolvendo HC pericentromérica é muito comum em Hymenoptera (MENEZES *et al.*, 2013), Scorpiones (ALMEIDA *et al.*, 2017) e

Chiroptera (MAO *et al.*, 2008). Em alguns organismos, como em roedores (ROSA *et al.*, 2012; MALCHER *et al.*, 2017) e quelônios do gênero *Podocnemis* (NORONHA *et al.*, 2016), as variações de HC podem estar associadas ao isolamento reprodutivo.

A separação da espécie marinha em subespécie por dados morfológicos (DOMNING E HAYEK, 1986) e moleculares (VIANNA *et al.*, 2006) ainda é controversa. Por citogenética, ao comparar os resultados de BG descritos na literatura para *T. m. latirostris* (2n=48 e NF=80) com os nossos resultados de banda-G de *T. m. manatus* (2n=48 e NF=82), não observamos diferenças nos padrões de bandas. Hunter *et al.* (2012) igualmente observaram que o padrão de bandeamento é análogo. Barros *et al.*, (2016) também identificaram somente divergências quanto a morfologia cromossômica, sugerindo que os prováveis rearranjos entre as subespécies sejam balanceados.

Híbrido

A proposta de hibridação do peixe-boi “Poque” (encontrado na natureza) teve início após a observação das características morfológicas no cativeiro, onde o espécime é menor que os outros indivíduos marinhos (característica do amazônico) e pela presença de unhas na nadadeira frontal (LUNA, 2013). Análise de DNA mitocondrial, minissatélite e citogenética realizadas por Vianna *et al.* (2006), sugerem a hipótese que “Poque” seja um híbrido de segunda geração (F2) com 2n=50, através do cruzamento de uma fêmea híbrida F1 (2n=52), com um *T. manatus* (2n=48) macho. Luna (2013), por análise comparativa de bandeamento G do “Poque” x *T. manatus*, notou diferenças na morfologia do par 1 e 8, e constatou ausência do cromossomo 9 correspondentes ao peixe-boi marinho. Em nossas análises, descrevemos “Poque” com 2n=50, caracterizamos o cariótipo com todos os pares cromossômicos apresentando padrões de homologia entre si, com o heteromorfismo do par 8. Estes achados divergem daqueles obtidos por Luna (2013), que identificou diferenças estruturais do par 1. As diferenças podem estar associadas a condensação dos cromossomos. As análises de bandas G mostram que o cariótipo de “Poque” compartilha poucos pares homólogos com ambas as espécies parentais. Este resultado apoia a hipótese de Viana *et al.* (2006), que “Poque” corresponde a um híbrido de F2 com o cruzamento de uma fêmea híbrida (F1) e um macho TMM, e indicando que este indivíduo apresenta diferenciação citogenética de seus parentais.

A viabilidade reprodutiva de híbridos entre peixes-bois é bastante questionada. Pouco conhecimento se tem sobre híbridos machos de primeira geração viáveis de peixes-boi; entretanto sabe-se que, híbridos fêmeas são capazes de reproduzir, ao exemplo dos

parentais do “Poque”. De acordo com Luna (2013), “Poque” foi capaz de reproduzir em cativeiro, porém seu filhote teve morte fetal. A priori, a regra de Haldane pode ser aplicada na hibridação entre espécies de peixe-boi, onde os híbridos que apresentam sexo heterogamético (XY) geralmente são estéreis (HALDANE, 1922). Atualmente sabe-se que alguns híbridos, machos e fêmeas, possuem capacidade reprodutiva: em equinos híbridos de primeira geração ($2n=65$), fruto de cruzamento entre *Equus przewalskii* ($2n=66$) x *E. caballus* ($2n=64$), os cariótipos possuem homologias para que a meiose e a gametogênese sejam normais, onde a fertilidade do híbrido não é prejudicada com o processo de segregação irregular (SHORT *et al.*, 1974). Assim como “Poque”, o padrão de bandeamento G do híbrido equino permite identificar os pares cromossômicos. Este resultado é similar ao observado em híbridos F1 de *Muntiacus reevesi* e *M. muntjak* (LIMING *et al.*, 1980).

A conservação das homologias cromossômicas entre parentais e seus híbridos, frequentemente está associada ao emparelhamento e segregação corretos na meiose, consequentemente, a viabilidade dos híbridos (PRADO *et al.*, 2012). Em “Poque” 13 pares cromossômicos aparentemente não apresentam homologia com TI e TMM.

Citogenética molecular

Em nossas análises, os sítios de rDNA 45S mostraram-se conservados, presentes no braço curto do par 20 em TI, TMM e híbrido. A distribuição desse marcador coincide com a Região Organizadora de Núcleo (Ag-NOR), corroborando estudos citogenéticos anteriores que também mostram o par 20 como portador da NOR em TI (ASSIS *et al.*, 1988), TM da Flórida (GRAY *et al.*, 2002) e do Brasil (BARROS *et al.*, 2016). Gray *et al.* (2002), ressaltam que o cromossomo 20 da família Trichechidae é conservado, pois nota-se padrão de bandas G semelhante para todas as espécies citadas acima. Um padrão similar foi descrito para Cervídeos (*Cervus nippon*) e *Bos taurus*, e entre outros indivíduos da família Bovidae, onde o padrão de bandas G e localização da NORs sugerem conservação dos cromossomos portador do rDNA ao longo da diferenciação desses grupos (HENDERSON & BRUERE, 1979; TULNEN *et al.*, 1983).

O mapeamento físico de sequências teloméricas (TTAGGG) pode identificar sítios teloméricos interciais (ITS), que são considerados importantes para estudos de evolução cariotípica, por constituírem *hot spot* para a ocorrência de rearranjos cromossômicos ou ser resultantes dos mesmos (YONENAGA-YASSUDA, 2004). Em lagartos do gênero *Leposoma* e em integrantes da família Cervidae, a presença de ITS

está associada a fusões cromossômica (LEE *et al.*, 1993; PELLEGRINO *et al.*, 1999). No presente estudo, apesar de identificarmos rearranjos por citogenética clássica, não foram observados ITS em TI, TMM e híbrido. A ausência de ITS em *Trichechus*, especialmente no cariótipo rearranjado do híbrido, pode estar relacionada a perda de repetições durante processo de fusões entre telômeros, ou ao pequeno tamanho destas sequências, ao ponto de não serem detectadas pela técnica de FISH (MEYNE *et al.* 1990; NAGAMACHI *et al.*, 2013). Assim, os rearranjos que ocorreram em peixe-boi, não carregaram essas sequências (ITS), propiciando estabilidade cromossômica.

A distribuição de U2 snDNA em regiões pericentroméricas e dispersas ao longo dos cromossomos demonstra uma alta dinâmica genômica dessa sequência em TI e TMM. Resultados similares foram encontrados em peixes da família Batrachoididae (UBEDA-MANZANARO *et al.*, 2010) e em *Gymnotus pantanal* (UTSUNOMIA *et al.*, 2014). Diferentemente, em outros organismos, a exemplo de Scorpiones (ALMEIDA *et al.*, 2017) e Orthoptera (PALACIOS-GIMENEZ & CABRAL-DE-MELLO, 2014), esse multigene apresentam-se em *cluster* localizado em um par cromossômico conservado. A dispersão do U2 snDNA pode ser explicada por associação dessa sequência com elementos transponíveis como descrito por Anjos *et al.* (2015), que registraram múltiplos *clusters* do U1 snDNA em garfanotos. Adicionalmente, análise BLAST demonstrou alta similaridade entre U2 snDNA de peixes-boi e elefante. Este resultado apoia a hipótese de que Sirenios e Proboscidea são ordens relacionadas filogeneticamente em Tethytheria.

A distribuição de LINE-1 difere entre grupos de mamíferos: em morcegos (Phyllostomidae), há acumulação do LINE-1 na heterocromatina pericentromérica (SOTERO-CAIO *et al.*, 2017); em *Inia geoffrensis*, este retroelemento distribui-se preferencialmente em regiões centroméricas com ausência de heterocromatina constitutiva (BONIFACIO *et al.*, 2012). Waters *et al.* (2004) identificaram em espécies de Afrotheria e Xenarthra, incluindo *Trichechus manatus latirostris*, distribuição do LINE-1 associada ao processo de compensação de dose no cromossomo X. Os autores observaram que a região distal do braço curto do X teve uma fraca marcação de LINE-1, e para explicar esse resultado, sugeriram que este retroelemento está envolvido com o processo de inativação de genes do cromossomo X, e sua ausência nesta região favoreceria a expressão de genes pseudoautossômicos. A exceção desse padrão encontrado em Afrotheria, foi o mamífero aardvark, que apresentou distribuição dispersa ao longo de toda a extensão do cromossomo X e dos autossomos. Nossos resultados divergem de Waters *et al.* (2004) em relação *T. m. latirostris*, uma vez que TI, TMM e

híbrido apresentaram distribuição homogênea de LINE-1 nos autossomos e no cromossomo X. Nossos achados podem ser explicados por três hipóteses distintas: 1) recente inserção desse retroelemento no genoma das espécies analisadas; 2) eventos independentes de expansão de LINE-1 gerando diferentes padrões de distribuição; e 3) descontrole epigenético da maquinaria responsável por impedir a expansão de DNA repetitivo.

No par 1 de TMM a acumulação observada do retroelemento LINE-1 coincide com o padrão de banda-G positiva rica em AT. Segundo Graham e Boissinot (2006), LINE-1 geralmente é abundante em regiões ricas em AT, com baixa taxa de recombinação, e regiões pobres em genes, em concordância com nossos achados. Resultados similares foram encontrados em roedores (DOBIGNY *et al.*, 2004) e humanos (KORENBERG & RYKOWSKI, 1988). Os dados do presente estudo demonstram que este tipo de compartimentalização deste elemento transponível não é exclusivo de mamíferos Euarchontoglires, como proposto por Waters *et al.* (2004).

A união de genomas diferentes causados pelo processo de hibridação pode acarretar mudanças na expressão de genes, metilação do DNA, rearranjos cromossômicos e mobilização de elementos transponíveis (ARKHIPOVA & RODRIGUEZ, 2013). Esse aumento na ativação de elementos transponíveis pode ser observado no caso do peixe híbrido tambacu, onde ocorreu proliferação dos retotransposons do tipo REX em relação aos seus parentais (RIBEIRO *et al.*, 2017). Anteriormente, acreditava-se que esse fenômeno era comum em mamíferos e resultava da hipometilação de transposons em híbridos (DOBIGNY *et al.*, 2006). No espécime híbrido de peixe-boi analisado no presente estudo, a distribuição de LINE-1 foi similar a TI e TMM. Em híbridos de rinocerontes não foi constatada a relação entre hipometilação e amplificação de LINE-1 (DOBIGNY *et al.*, 2006). De igual forma, acreditamos que o padrão de distribuição de LINE-1 no híbrido de peixe-boi não esteja relacionado ao conflito epigenético resultante do fenômeno da hibridação, mas à dinâmica desse retroelemento em diferentes grupos de mamíferos.

CONCLUSÃO

A variação observada entre as espécies *T. inunguis* e *T. m. manatus*, decorre principalmente de rearranjos do tipo fusão, baseados na filogenia da família Trichechidae e de nossos resultados. O espécime híbrido de segunda geração (2n=50) apresenta similaridade por citogenética clássica com seus parentais. Nossos resultados também

revelam que rDNA 45S é conservado entre as espécies. No genoma de TI e TMM, o U2 snDNA encontra-se disperso nos cromossomos mostrando uma alta dinâmica dessas sequências; análise de BLAST revelou similariedade entre Sirenios e Proboscidea corroborando análises filogenéticas. LINE-1 encontra-se de forma compartimentalizada em região pericentromérica, mas também disperso, sugerindo que este retroelemento se dispersou recentemente no genoma de TMM, TI e híbrido. Esses resultados poderão contribuir com estudos de estratégias de reprodução em cativeiro e soltura dos animais, consequentemente na conservação dos Sirenios. Análises de pintura cromossômica poderão confirmar os rearranjos encontrados por BG;

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, B.R.R.; PAIXAO, S. S. R. M.; NORONHA, R. C. R.; NAGAMACHI, C. Y.; COSTA, M.R.J.; PARDAL, P. P. O.; COELHO, J. S.; PIECZARKA, J. C. (2017). **Karyotype diversity and chromosomal organization of repetitive DNA in Tityus obscurus (Scorpiones, Buthidae)**. BMC GENETICS, v. 18, p.
- ANJOS, A.; RUIZ-RUANO, E. J.; CAMACHO, J. P. M.; LORETO, V.; CABRERO, J. SOUZA, M. J.; CABRAL-DE-MELLO. (2015). **U1 snDNA clusters in grasshoppers: chromosomal dynamics and genomic organization**. Heredity (2015) 114, 207–219.
- ARKHIPOVA, I. R. & RODRIGUEZ, F. (2013). **Genetic and Epigenetic Changes Involving (Retro)transposons in Animal Hybrids and Polyploids**. Cytogenet Genome Res 2013;140:295–311.
- ASSIS, M. F. L.; BEST, R. C.; BARROS, R. M. S.; YONENAGA-YASSUDA, Y. (1988). **Cytogenetic study of Trichechus inunguis (Amazonian manatee)**. Review Bras. Genetics, v. 11, p. 41–5
- AYRES-ALVEZ, T.; CARDOSO, A. L.; NAGAMACHI, C. Y.; SOUZA, L. M.; PIECZARKA, J. C.; NORONHA, R. C. R. (2017). **Karyotypic Evolution and Chromosomal Organization of Repetitive DNA Sequences in Species of Panaque, Panaqolus, and Scobinancistrus (Siluriformes and Loricariidae) from the Amazon Basin**. Zebrafish_ 2017 Jun;14(3):251-260
- BARROS, H. M. D. R.; MEIRELLES, A. C. O.; LUNA, F. O.; MARMONTEL, M.; CORDEIRO-ESTRELA, P.; SANTOS, N.; ASTUA, D. (2016). **Cranial and chromosomal geographic variation in manatees (Mammalia: Sirenia: Trichechudae) with the description of the Antillean manatee karyotype in Brazil**. Journal Zoological Systematics Evolutionary Research.
- BEST, R. C. (1983). **Apparent Dry-Season Fasting in Amazonian Manatees (Mammalia: Sirenia)**. Biotropica 15(1): 61-64.

- BONIFACIO, H. L.; SILVA, V. M. F.; MARTIN, A. R.; FELDBER, E. (2012). **Molecular cytogenetic characterization of the Amazon River dolphin *Inia geoffrensis***. *Genetica* (2012) 140:307–315.
- BONIFACIO, H.L.; SILVA, V. M. F.; MARTIN, A. R. & FELDBERG, E. (2012). **Molecular cytogenetic characterization of the Amazon River dolphin *Inia geoffrensis***. *Genetica*, 140: 3007-315.
- BREEN, M. & GILL, J. B. (1991). **The chromosomes of two horse x zebra hybrids; *E. cahallus* x *E. grevyi* and *E. hurchelli***. *Hereditas* 115: 169-175
- COLGAN, D. J.; MCLAUCHLAN, A.; WILSON, G. D. F.; LIVINGSTON, S. P.; EDGECOMBE, G. D.; MACARANAS, J.; CASSIS, G.; GRAY, M. R. (1998). **Histone H3 and U2 snRNA DNA sequences and arthropod molecular evolution**. *Austral J Zool* 46: 419–437.
- DOBIGNY, G. (2002). **Spéciation chromosomique chez les espèces ouest-africaines de *Taterillus* (Rodentia, Gerbillinae): implications systématiques et biogéographiques, hypothèses génomiques**. PhD Thesis, Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France.
- DOBIGNY, G.; OZOUF-COSTAZ, C.; WATERS, P. D.; BONILLO, C. COUTANCEAU, J.P.; VOLOBOUEV, V. (2004). **LINE-1 amplification accompanies explosive genome repatterning in rodents**. *Chromosome Research* 12: 787–793.
- DOBIGNY, G.; WATERS, P. D.; ROBINSON, T. J. (2006). **Absence of hypomethylation and LINE-1 amplification in a white X black rhinoceros hybrid**. *Genetica* (2006) 127:81–86.
- DOMNING D.P. (2009). **Sirenian evolution**. In: PERRIN, W.F.; WÜRSIG B. and THEWISSEN, J. G. M. *Encyclopedia of Marine Mammals*. 2 ed. San Diego, Academic Press, pp 1016-1019.
- DOMNING D.P.; HAYEK, L. C. (1986). **Interspecific and intraspecific morphological variation in manatees (Sirenia: *Trichechus*)**. *Marine Mammal Science*, 2(2): 87-144.
- DOMNING, D. P. (1981). **Distribution and status of manatees *Trichechus* spp. Near the mouth of the Amazon River, Brazil**. *Biological Conservation*, 19: 85-97
- DOMNING, D. P. (1994). **A phylogenetic analysis of the Sirenia**. In: BERTA, A. and DEMÉRÉ, T.A., (eds). *Contributions in marine mammal paleontology honoring Frank C. Whitmore Jr*. *Proceedings of the San Diego Society of Natural History* 29: 177-189.
- GARCIA-RODRIGUEZ, A. I.; BOWEN, B. W.; DOMNING, D.; MIGNUCCIGIANNONI, A. A.; MARMONTEL, M.; MONTOYA-OSPINA, R. A.; MORALESVELA, B.; RUDIN, M.; BONDE, R. K.; McGUIRE, P. M. (1998). **Phylogeography of the West Indian manatee (*Trichechus manatus*): how many populations and how many taxa?** *Molecular Ecology*, 7, 1137-1149.
- GERLACH, W. L. & BEDBROOK, J. R. (1979). **Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley**. *Nucleic Acids Res* 7: 1869-1885.

- GRAHAM, T. e BOISSINOT, S. (2006). **The genomic distribution of Ll elements: the role of insertion bias and natural selection.** Journal of Biomedicine and Biotechnology Volume 2006, Article ID 75327, Pages 1–5.
- GRAY, B. A.; ZORI, R. T.; MCGUIRE, P. M.; BONDE, R. K.; (2002). **A first generation cytogenetic ideogram for the Florida manatee (*Trichechus manatus latirostris*) based on multiple chromosome banding techniques.** Hereditas 137: 215–223.
- HALDANE, J. B. S. (1922). **Sex-ratio and unisexual sterility in hybrid animals.** Journal of Genetics 12, 101–109.
- HARTMAN, D. **Ecology and behavior of the manatee (*Trichechus manatus*) in Florida.** American Society of Mammalogists Special Publication, n. 5, p.1-153. 1979
- HATT, R. A. (1934). **A manatee collected by the American Museum Congo Expedition, with observations on the recent manatees.** Bulletin American Museum of Natural History. 533-56
- HENDERSON, L. M. & BRUERE, A. N. (1979). **Conservation of nucleolus organizer regions during evolution in sheep, goat, cattle and aoudad.** Canadian Journal of Genetics and Cytology. 21: 1-8.
- HOWELL, W. M. & BLACK, D. A. (1980). **Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method.** Experientia (36): 1014-1015.
- HUNTER, M. E.; MIGNUCCI-GIANNONI, A. A.; TUCKER, K. P.; KING, T. L.; BONDE, R. K.; GRAY, B. A.; MCGUIRE, P. M. (2012). **Puerto Rico and Florida manatees represent genetically distinct group.** Conserv. Genet 13: 1623-1635.
- HUSAR, S. L. ***Trichechus manatus*.** Mammalian Species, v. 93, p. 1-5. 1978a.
- HUSAR, S. L. ***Trichechus senegalensis*.** Mammalian Species, v. 89, p.1-3. 1978b.
- IJDO, J. W.; BALDINI, A.; WARD, D. C.; REEDERS, S. T.; & WELLS, R. A. (1991). **Origin of human chromosome 2: An ancestral telomere-telomere fusion.** Proc. Nadl. Acad. Sci. USA Vol. 88, pp. 9051-9055.
- KELLOGG, M. E.; BURKETT, S.; DENNIS, T. R.; STONE, G.; GRAY, B. A.; MCGUIRE, O. M.; ZORI, R. T.; STANYON, R.; (2007). **Chromosome painting in the manatee supports Afrotheria and Paenungulata** BMC Evolutionary Biology 2007, 1-7.
- KORENBERG, J. R. & RYKOWSKI, M. C. (1988). **Human Genome Organization: Alu, Lines, and the Molecular Structure of Metaphase Chromosome Bands.** Cell, Voi. 53, 391-400.
- LEE, C.; SASI, R.; LIN, C.C. (1993). **Intertitial localization of telomeric DNA sequences in the Indian muntjac chromosomes: further evidence for tandem chromosome fusion in the karyotypic evolution of the Asian muntjacs.** Cytogenet. Cell Genet 63: 156-159.

- LEVAN, A.; FREDGA, K.; & SANDRERG, A. A. (1964). **Nomeclature for centromeric position on chromosomes.** *Hereditas*. Vol 52, p. 201-220.
- LIMA, R. P.; PALUDO, D.; SOAVINSKI, R. J.; SILVA, K. G.; OLIVEIRA, E. M. A. (2011). **Levantamento da distribuição, ocorrência e status de conservação do Peixe-Boi Marinho (*Trichechus manatus*, Linnaeus, 1758) no litoral nordeste do Brasil.** *Natural Resources, Aquidabã*, v.1, n.2, p.41-57
- LIMING, S.; YINGING, Y.; XINGSHENG, D. (1980). **Comparative cytogenetic studies on the red munjac, Chinese munjac, and their F₁ hybrids.** *Cytogenet. Cell Genet.* 26: 22-27.
- LOUGHMAN, W; FRYE F.; HERALD, E. (1970). **The chromosomes of a male manatee.** *International Zoo Yearbook* 10: 151-152
- LUNA, F. O. (2013). **Population genetics and conservation strategies for the West Indian manatee (*Trichechus manatus* Linnaeus, 1758) in Brazil.** PhD thesis, Universidade Federal de Pernambuco, Brazil.
- LUNA, F. O.; ARAUJO, J. P. OLIVEIRA, E. M.; HAGE, L. M.; PASSAVANTE, J. Z. O. (2010). **Distribuição do peixe-boi marinho, *Trichechus manatus manatus*, no litoral norte do Brasil.** *Arq. Ciên. Mar, Fortaleza*, 43(2): 79 – 86.
- LUNA, F. O.; ARAÚJO, J. P.; PASSAVANTE, J. Z. O; MENDES, P. P.; PESSANHA, M. M.; SOAVINSKI, R. J.; OLIVEIRA, E. M. (2008b). **Ocorrência do peixe boi marinho (*Trichechus manatus manatus*) no litoral norte do Brasil.** *Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão*, v. 23, p. 37-49
- LUNA, F. O.; LIMA, R. P.; ARAÚJO, J. P.; PASSAVANTE, J. Z. O. (2008a). **Status de conservação do peixe-boi marinho (*Trichechus manatus manatus* Linnaeus, 1758) no Brasil.** *Revista Brasileira de Zoociências*, v. 10, n. 2, p. 145-153.
- LYON, M. F. (2000). **LINE-1 elements and X chromosome inactivation: a function for “junk” DNA.** *PNAS*. Vol. 97, 6248-6249.
- MALCHER, S. M.; PIECZARKA, J. C.; GEISE, L.; ROSSI, R. V.; PEREIRA, A. L.; O'BRIEN, P. C. M.; ASFORA, P. H.; SILVA, V. F.; SAMPAIO, M. I.; FERGUSON-SMITH, M. A.; NAGAMACHI, C. Y. (2017). **Oecomys catherinae (Sigmodontinae, Cricetidae): Evidence for chromosomal speciation?** *PLOS ONE*; 12(7) <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181434>
- MANTOVANI, M.; ABEL, L. D. S.; MOREIRA-FILHO, O. (2005). **Conserved 5S and variable 45S rDNA chromosomal localisation revealed by FISH in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae).** *Genetica* (2005) 123: 211–216.
- MAO, X.; NIE, W.; WANG, J.; SU, W.; FENG, Q.; WANG, Y.; DOBIGNY, G.; YANG, F. (2008). **Comparative cytogenetics of bats (Chiroptera): The prevalence of Robertsonian translocations limits the power of chromosomal characters in resolving interfamily phylogenetic relationships.** *Chromosome Research*, 16:155–17.

- MARSH, H.; LEFEBVRE, L. W. (1994). **Sirenian status and conservation efforts.** *Aquatic Mammals*, 20.3, 155-170
- MEHROTRA, S. & GOYAL, V. (2014). **Repetitive Sequences in Plant Nuclear DNA: Types, Distribution, Evolution and Function.** *Genomics Proteomics Bioinformatics* 12, 164–171.
- MENEZES, R. S. T; SILVA, T. M.; CARVALHO, A. F.; ANDRADE-SOUZA, V.; SILVA, J. G.; COSTA, M. A. (2013). **Numerical and structural chromosome variation in the swarm 40 founding wasp *Metapolybia decorate* Gribodo 1896 (Hymenoptera, Vespidae).** *Genetica* 141:273-280.
- MEYNE, J.; BAKER, R. J.; HOBART, H. H.; HSU, T. C.; RYDER, O. A.; WARD, O. G.; WILEY, J. E.; WURSTER-HILL, D. H.; YATES, T. L.; MOYZIS, R. K. (1990). **Distribution of non-telomeric sites of the (TTAGGG)_n telomeric sequence in vertebrate chromosomes.** *Chromosoma (Berl)* (1990) 99:3 10.
- MOORHEAD, P. S.; NOWELL, P. C.; MELLMAM, W. J.; BATTIPS, D. M.; HUNGERFORD, D. A. (1960). **Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood.** *Expi Cell Res* 20: 613-616.
- NAGAMACHI, C.Y.; PIECZARKA, J. C.; O'BRIEN, P. C. M.; PINTO, J. A./MALCHER, S. M.; PEREIRA, A. L.; RISSINO, J. D.; MENDES-OLIVEIRA, A. C.; ROSSI, R. V.; FERGUSON-SMITH, M. A. (2013). **FISH with whole chromosome and telomeric probes demonstrates huge karyotypic reorganization with ITS between two species of *Oryzomyini* (Sigmodontinae, Rodentia): *Hylaeamys megacephalus* probes on *Cerradomys langguthi* karyotype.** *Chromosome Res.*; 21(2): 107–11.
- NEI M, ROONEY AP (2005) Concerted and Birth-and-Death Evolution of Multigene Families. *Ann. Rev. Gen.* 39:125-152.
- NOLETO RB, KANTEK DLZ, SWARÇA AC, DIAS AL, FENOCCHIO AS, CESTARI MM (2006) **Karyotypic characterization of *Hydromedusa tectifera* (Testudines, Pleurodira) from the upper Iguaçu River in the Brazilian state of Paraná.** *Genetics and Molecular Biology*, 29, 2, 263-266.
- NORONHA, R. C. R.; BARROS, L. M. R.; ARAÚJO, R. E. F.; MARQUES, D. F.; NAGAMACHI, C. Y.; MARTINS, C.; PIECZARKA, J. C. (2016) **New insights of karyoevolution in the Amazonian turtles *Podocnemis expansa* and *Podocnemis unifilis* (Testudines, Podocnemidae).** *Molecular Cytogenetics.* 9:73 DOI 10.1186/s13039-016-0281-5.
- PALACIOS-GIMENEZ, O. M. E CABRAL-DE-MELLO, D. C. (2014). **Repetitive DNA chromosomal organization in the cricket *Cycloptiloides americanus*: a case of the unusual X1X20 sex chromosome system in Orthoptera** *Mol Genet Genomics* DOI 10.1007/s00438-014-0947-9.
- PARDINI, A. T.; O'BRIEN, P. C. M.; FU, B.; BONDE, R. K.; ELDER, F. F. B.; FERGUSON-SMITH, M. A.; YANG, F.; ROBINSON, T. J. (2007). **Chromosome painting among Proboscidea, Hyracoidea and Sirenia: support for Paenungulata (Afrotheria, Mammalia) but not Tethytheria.** *Proceedings of the Royal Society B*, 274, 1333-1340.

PELEGRINO, K. C. M.; RODRIGUES, M. T.; YONENAGA-YASSUDA, Y. (1999). **Chromosomal evolution in the Brazilian lizards of genus *Leposoma* (Squamata, Gymnophthalmidae) from Amazon and Atlantic rain forests: banding patterns and FISH of telomeric sequences.** *Hereditas* 131: 15-21.

PRADO, F. D.; NUNES, T. L.; SENHORINI, J. A.; BORTOLOZZI, J.; FORESTI, F.; PORTO-Forest, F. (2012). **Cytogenetic characterization of F1, F2 and backcross hybrids of the Neotropical catfish species *Pseudoplatystoma corruscans* and *Pseudoplatystoma reticulatum* (Pimelodidae, Siluriformes).** *Genetics and Molecular Biology*, 35, 1, 57-64.

REFERÊNCIAS REFERÊNCIAS

RIBEIRO, L. B.; MORAES-NETO, A.; ARTONI, R. F.; MATOSO, D. A.; FELDBERG, E. (2017). **Chromosomal Mapping of Repetitive Sequences (Rex3, Rex6, and rDNA Genes) in Hybrids Between *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) and *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887).** *ZEBRAFISH* Apr;14(2):155-160.

ROSA, C. C.; PIECZARKA, J. C.; ROSSI, R. V.; SAMPAIO, M. I. C.; RISSINO, J. D.; AMARAL, P. J. S.; NAGAMACHI, C. Y. (2012). **Genetic and morphological variability in South American rodent *Oecomys* (Sigmodontinae, Rodentia):evidence for a complex of species.** *Journal of Genetics*, Vol. 91, No.3, 265-277.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual.** 2a ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA, 1989.

SEABRIGHT, M. **A rapid banding technique for human chromosomes.** *Lancet*, 2: 971-972. 1971.

SHORT, R. V.; CHANDLEY, A. C.; JONES, R. C. ALLEN, W. R. (1974). **Meiosis in interspecific equine hybrids II. The Przewalski house / domestic horse hybrid (*Equus przewalskii* x *E. caballus*).** *Cytogenet. Cell Genet.* 13: 465-478.

SOTERO-CAIO, C. G.; CABRAL-DE-MELLO, D. C.; CALIXTO, M. S. C.; VALENTE, G. T.; MARTINS, C.; LORETO, V.; SOUZA, M. J.; SANTOS, N. (2017). **Centromeric enrichment of LINE-1 retrotransposons and its significance for the chromosome evolution of Phyllostomid bats.** *Chromosome Res.* DOI: 10.1007/s10577-017-9565-9.

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

TULNEN, P. V.; ROBINSIN, T. J.; FELDHAMER, G. A. (1983). **Chromosome banding and NOR location in sika deer.** *The Journal of Heredity* 74:473-474.

UBEDA-MANZANARO, M.; MERLO, M. A.; PALAZON, J. L.; CROSS, I.; SARASQUETE, C.; REBORDINOS, L. (2010) **Chromosomal mapping of the major and minor ribosomal genes, (GATA)n and U2 snRNA gene by double-colour FISH in species of the Batrachoididae family.** *Genetica* 138: 787-794.

UTSUNOMIA, R.; SCACCHETTI, P. C.; PANSONATO-ALVES, J. C.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. (2014) **Comparative chromosome mapping of U2 snRNA and 5S rRNA genes in Gymnotus species (Gymnotiformes, Gymnotidae): evolutionary dynamics and sex chromosome linkage in *G. pantanal***. *Cytogenet Genome Res* 142:286–292.

VERMA, R.S. AND BABU, A. (1995). **Human Chromosomes: Principles and Techniques**. McGraw-Hill Inc., New York, pp. 8-14.

VIANNA, J. A.; BONDE, R. K.; CABALLERO, S.; GIRALDO, J. P.; LIMA, R. P.; CLARL, A.; MARMONTEL, M.; MORALES-VELA, B.; SOUZA, M. J.; PARR, L.; RODRIGUEZ-LOPEZ, M. A.; MIGNUCCI-GIANNONI, A. A.; POWELL, J. A.; SANTOS, F. R. (2006). **Phylogeography, phylogeny and hybridization in trichechid sirenians: implications for manatee conservation**. *Molecular Ecology* 15, 433-447.

WATERS, P. D.; DOBIGNY, G.; PARDINI, A. T.; ROBINSON, T. J. (2004). **LINE-1 distribution in Afrotheria and Xenarthra: implications for understanding the evolution of LINE-1 in eutherian genomes**. *Chromosoma* (2004) 113: 137–144.

YANG, F.; ALKALAEVA, E. Z.; PERELMAN, P. L.; PARDINI, A. T.; HARRISON, W. R.; O'BRIEN, P. C. M.; FU, B.; GRAPHODATSKY, A. S.; FERGUSON-SMITH, M. A. & ROBINSON, T. J. (2003). **Reciprocal chromosome painting among human, aardvark, and elephant (superorder Afrotheria) reveals the likely eutherian ancestral Karyotype**. *PNAS* 4: 1062-1066.

YONENAGA-YASSUDA, Y. (2004). **Contribuição da FISH à citogenética de mamíferos e répteis**. In *FISH conceitos e aplicações*. Ribeirão Preto - Sociedade Brasileira de Genética. 184.

5. CONCLUSÃO GERAL

- As espécies e *T. manatus manatus* apresentam, respectivamente $2n=56$ e $NF=86$, e $2n=48$ e $NF=82$. A variação observada entre as espécies, decorre principalmente de rearranjos do tipo fusão, baseados na filogenia da família Trichechidae e de nossos resultados.
- O espécime híbrido de segunda geração ($2n=50$) apresenta similaridade por citogenética clássica com seus parentais.
- LINE-1 encontra-se de forma compartimentalizada em região pericentromérica, mas também disperso, sugerindo que este retroelemento se dispersou recentemente no genoma de TMM, TI e provável híbrido “Poque”.
- Esses resultados poderão contribuir com estudos de estratégias de reprodução em cativeiro e soltura dos animais, conseqüentemente na conservação dos Sirenios.
- Análises de pintura cromossômica poderão confirmar os rearranjos encontrados por BG.

6. REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, B.R.R.; PAIXAO, S. S. R. M.; NORONHA, R. C. R.; NAGAMACHI, C. Y.; COSTA, M.R.J.; PARDAL, P. P. O.; COELHO, J. S.; PIECZARKA, J. C. (2017). **Karyotype diversity and chromosomal organization of repetitive DNA in *Tityus obscurus* (Scorpiones, Buthidae)**. BMC GENETICS, v. 18, p.
- ALVES-COSTA, WASKO, A. P.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F.& MARTINS, C. (2006). **Genomic organization and evolution of the 5S ribosomal DNA in Tilapiini Fishes**. Genetica, 127:243–252.
- ARNASON, U. & BEST, P. B. 1991. **Phylogenetic relationships within the Mysticeti (*Whalebone whales*) based upon studies of highly repetitive DNA in all extant species**. Hereditas 114:263-269.
- ARNOLD, M. L. (1992). **Natural hybridization as an evolutionary process**. Annual Review of Ecology and Systematics, 23:237-261.
- ASSIS, M. F. L.; BEST, R. C.; BARROS, R. M. S.; YONENAGA-YASSUDA, Y. (1988). **Cytogenetic study of *Trichechus inunguis* (Amazonian manatee)**. Review Bras. Genetics, v. 11, p. 41–50.
- BARROS, H. M. D. R.; MEIRELLES, A. C. O.; LUNA, F. O.; MARMONTEL, M.; CORDEIRO-ESTRELA, P.; SANTOS, N.; ASTUA, D. (2016). **Cranial and chromosomal geographic variation in manatees (Mammalia: Sirenia: Trichechudae) with the description of the Antillean manatee karyotype in Brazil**. Journal Zoological Systematics Evolutionary Research.
- BARTON, N.H. (2001). **The role of hybridization in evolution**. Molecular Ecology. 10, 551-568.
- BÉRRUBÉ, M. & AGUILAR, A. (1998). **A new hybrid between a blue whale, *Balaenoptera musculus*, and a fin whale, *B. physalus*: frequency and implications of hybridization**. Marine Mammal science, 14 (1): 82-98.
- BERTA, A.; SUMICH, J. L.; KOVACS, K. M. **Marine mammals: evolutionary biology**. 2 ed. Academic Press, 2015, 89-107p.
- BERTRAM, G. C. L.; BERTRAM, C. K. (1973). **The modern Sirenia: Their distribution and status**. Biol. J. Linn. Soc. 5: 297-338.
- BEST, R. C. (1983). **Apparent Dry-Season Fasting in Amazonian Manatees (Mammalia: Sirenia)**. Biotropica 15(1): 61-64.
- BIÉMONT, C. & VIEIRA, C. (2006). **Junk DNA as na evolutionary force**. Nature, vol. 443, 521-524.
- BISCOTTI, M. A.; CANAPA, A; OLMO, E.; VARUCCA, M.; TEO, C. H.; SCHWARZACHER, T.; DENNERLEIN, S.; RICHTER, R. & HESLOP-HARRISON, J. S. (2007). **Repetitive DNA, molecular cytogenetics and genome organization in the Kign scallop (*Pecten maximus*)**. Gene, 406, 91-98.

- BISCOTTI, M. A.; OLMO, E. & HESLOP-HARRISON, J. S. (2015). **Repetitive DNA in eukaryotic genomes**. *Chromosome Res*, 23: 415-420.
- BOEKE, J. D. (1997). **LINEs and Alus- the polyA connection**. *Nature genetics*. V 16.
- BRUNNER, S. (2002). **A probable hybrid sea Lion – *Zalophus californianus* x *Otaria byronia***. *Journal of Mammalogy*, 83 (1): 135-144.
- CABALLERO, S. & AND BAKER, C. S. (2010). **Captive-born intergenetic hybrids of a Guiana bottlenose dolphin: *Sotalia guianensis* X *Tursiops truncatus***. *Zoo Biology* 29: 647-657.
- CABRAL-DE-MELLO; MOURA, R. C. & MARTINS, C. (2010a). **Chromosomal mapping of repetitive DNAs in the beetle *Dichotomius geminatus* provides the first evidence for an association of 5S rRNA and histone H3 genes in insects, and repetitive DNA similarity between the B chromosome and A complement**. *Heredity*, 104, 393–400.
- CABRAL-DE-MELO, D. C. & MARTINS, C. (2010b). **Breaking down the genome organization and karyotype differentiation through the epifluorescence microscope lens: insects and fish as models**. *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education A*. Méndez-Vilas and J. Díaz (Eds.) 659.
- CANTANHEDE, A. M.; DA SILVA, V. M. F.; FARIAS, I. P.; HRBEK, T.; LAZZARINI, S. M.; ALVES-GOMES, J. (2005). **Phylogeography and population genetics of the endangered Amazonian manatee, *Trichechus inunguis* Natterer, 1883 (Mammalia, Sirenia)**. *Molecular Ecology* 14: 401- 413.
- CARARETO, C. M. A.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; & SLUYS, M. V. **Elementos de Transposição: diversidade, evolução, aplicações e impactos nos genomas dos seres vivos**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Genética. Editora: FIOCRUZ, 2015.
- CHARLESWORTH, B.; SNLEGOWSHI, P. & STEPHAN, W. (1994). **The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes**. *Nature* 371: 215-220.
- COLARES, I. G. & COLARES, E. P. (2002). **Food plants eaten by Amazonian manatees (*Trichechus inunguis*, Mammalia: Sirenia)**. *Brazilian Archives of Biology and Technology* Vol. 45, N. 1, pp. 67 – 72.
- COLGAN, D. J.; MCLAUCHLAN, A.; WILSON, G. D. F.; LIVINGSTON, S. P.; EDGECOMBE, G. D.; MACARANAS, J.; CASSIS, G.; GRAY, M. R.; (1998). **Histone H3 and U2 snRNA DNA sequences and arthropod molecular evolution**. *Austral J Zool* 46: 419–437.
- DE JONG, W. W. & ZWEERS, A. (1980). **Confirmação da relação entre peixes-bois, “hyraxes” elefantes, por meio do estudo da proteína das lentes dos olhos**. *ACTA Amazonica*, 10 (4): 897-902.
- DE JONG, W. W.; ZWEERS, A. & GOOGMAN, M. (1981). **Relationship of armadillo to elephants, hyraxes and sea cows from α -crystallin sequences**. *Nature*. Vol 292 (5823): 538-540.

DOBIGNY, G. (2002). **Spéciation chromosomique chez les espèces ouest-africaines de Taterillus (Rodentia, Gerbillinae): implications systématiques et biogéographiques, hypothèses génomiques.** PhD Thesis, Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France.

DOMNING D.P. (2001). **Sirenians, seagrasses, and Cenozoic ecological change in the Caribbean.** *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 166: 27-50.

DOMNING D.P. (2009). **Sirenian evolution.** In: PERRIN, W.F.; WÜRSIG B. and THEWISSEN, J. G. M. *Encyclopedia of Marine Mammals*. 2 ed. San Diego, Academic Press, pp 1016-1019.

DOMNING D.P.; HAYEK, L. C. (1986). **Interspecific and intraspecific morphological variation in manatees (Sirenia: *Trichechus*).** *Marine Mammal Science*, 2(2): 87-144.

DOMNING, D. P. (1981). **Distribution and status of manatees *Trichechus* spp. Near the mouth of the Amazon River, Brazil.** *Biological Conservation*, 19: 85-97.

DOMNING, D. P. (1994). **A phylogenetic analysis of the Sirenia.** In: BERTA, A. and DEMÉRÉ, T.A., (eds). *Contributions in marine mammal paleontology honoring Frank C. Whitmore Jr.* *Proceedings of the San Diego Society of Natural History* 29: 177-189.

FORSTEN, A. & YOUNGMAN, P. M. (1982). ***Hydrodamalis gigas*.** *Mammalian Species*, v. 165, p.1-3.

GARCIA-RODRIGUEZ, A. I.; BOWEN, B. W.; DOMNING, D.; MIGNUCCI-GIANNONI, A. A.; MARMONTEL, M.; MONTOYA-OSPINA, R. A.; MORALES-VELA, B.; RUDIN, M.; BONDE, R. K.; MCGUIRE, P. M. (1998). **Phylogeography of the West Indian manatee (*Trichechus manatus*): how many populations and how many taxa?** *Molecular Ecology*, 7, 1137-1149.

GERLACH, W. L. & BEDBROOK, J. R. (1979). **Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley.** *Nucleic Acids Res* 7: 1869-1885.

GRAY, B. A.; ZORI, R. T.; MCGUIRE, P. M.; BONDE, R. K.; (2002). **A first generation cytogenetic ideogram for the Florida manatee (*Trichechus manatus latirostris*) based on multiple chromosome banding techniques.** *Hereditas* 137: 215–223.

GRIFFIHS, A. J.; WESSLER, S.R.; LEWONTIN, R. C. & CARROL, L.S.B. **Introdução à genética.** 9 ed. Editora Guanabara Koogan S. A. 417-434, 2009.

GUERRA, M. (1988). **Introdução à Citogenética Geral.** Rio de Janeiro: Ed. Guanabara, pp. 13-35.

GUERRA, M. **FISH: conceitos e aplicações na citogenética.** Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2004. 184p.

GUTHRIE, C. & PATTERSON, B. (1998). **SPLICEOSOMAL snRNAs.** *Annu. Rev. Genet.* 22:387-419.

- HARDMAN, N. (1986). **Structure and function of repetitive DNA in eukaryotes.** Biochem. J. (1986) 234, 1-11.
- HARTMAN, D. **Ecology and behavior of the manatee (*Trichechus manatus*) in Florida.** American Society of Mammalogists Special Publication, n. 5, p.1-153. 1979.
- HATT, R. A. (1934). **A manatee collected by the American Museum Congo Expedition, with observations on the recent manatees.** Bulletin American Museum of Natural History. 533-566.
- HOULGUIN-MEDINA, V. E. H. (2008). **Comportamento do peixe-boi (*Trichechus manatus manatus*) nos oceanários de Itamaracá: manejo e condições abióticas.** Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Pernambuco.
- HUNTER, M. E.; MIGNUCCI-GIANNONI, A. A.; TUCKER, K. P.; KING, T. L.; BONDE, R. K.; GRAY, B. A.; McGUIRE, P. M. (2012). **Puerto Rico and Florida manatees represent genetically distinct group.** Conserv. Genet 13: 1623-1635.
- HUSAR, S. L. ***Dugong dugon*.** Mammalian Species, v. 93, p. 1-7. 1978c.
- HUSAR, S. L. **The West Indian Manatee (*Trichechus manatus*).** Washington, D.C.: Department of the Interior, U. S. Fish and Wildlife Service. 1977a, 145p.
- HUSAR, S. L. ***Trichechus inunguis*.** Mammalian Species, v. 72, p.1-4. 1977b.
- HUSAR, S. L. ***Trichechus manatus*.** Mammalian Species, v. 93, p. 1-5. 1978a.
- HUSAR, S. L. ***Trichechus senegalensis*.** Mammalian Species, v. 89, p.1-3. 1978b.
- IJDO, J. W.; BALDINI, A.; WARD, D. C.; REEDERS, S. T.; & WELLS, R. A. (1991). **Origin of human chromosome 2: An ancestral telomere-telomere fusion.** Proc. Nadl. Acad. Sci. USA Vol. 88, pp. 9051-9055.
- INAFUKU, J.; NABEYAMA, M.; KIHUMA, Y.; SAITOH, J.; KUBOTA, S. & KOHNO, S. (2000). **Chromosomal location and nucleotide sequences of 5S ribosomal DNA of two cyprinid species (*Osteichthyes*, *Pisces*).** Chromosome Research 8: 193-199.
- JEFFERSON, T.; LEATHERWOOD, S.; WEBBER, M. A.; **Marine mammals of the World.** Food & Agriculture (org), 1993, 2004-2013.
- JUAN, C.; VAZQUEZ, P.; RUBIO, J. M.; PETITPIERRE, E. & HEWITT, G. M. (1993). **Presence of highly repetitive DNA sequences in *Tribolium* flour-beetles.** Heredity, 70, 1-8.
- KASAHARA, S. **Introdução à pesquisa em citogenética de vertebrados.** 1 ed. Ribeirão Preto, S. P.: Sociedade Brasileira de Genética, 2009. 160 páginas.
- KAZAZIAN, H. H. (2004). **Mobile elements: drivers of genome evolution.** Science, 303, 1626-1632.

KELLOGG, M. E.; BURKETT, S.; DENNIS, T. R.; STONE, G.; GRAY, B. A.; MCGUIRE, O. M.; ZORI, R. T.; STANYON, R.; (2007). **Chromosome painting in the manatee supports Afrotheria and Paenungulata** BMC Evolutionary Biology 2007, 1-7.

KLEIN, S. J. & O'NEILL (2018). **Transposable elements: genome innovation, chromosome diversity, and centromere conflict.** Chromosome Res. <https://doi.org/10.1007/s10577-017-9569-5>

KUBIS, S.; SCHMIDT, T. & HESLOP-HARRISON, J. S. (1998). **Repetitive dna elements as a major component of plant genomes.** Annals of Botany 82 (Supplement A): 45-55.

LEVAN, A.; FREDGA, K.; & SANDRERG, A. A. (1964). **Nomeclature for centromeric position on chromosomes.** Hereditas. Vol 52, p. 201-220.

LIMA, R. P.; PALUDO, D.; SOAVINSKI, R. J.; SILVA, K. G.; OLIVEIRA, E. M. A. (2011). **Levantamento da distribuição, ocorrência e status de conservação do Peixe-Boi Marinho (*Trichechus manatus*, Linnaeus, 1758) no litoral nordeste do Brasil.** Natural Resources, Aquidabã, v.1, n.2, p.41-57.

LONG, E. O. & DAVID, J. B. (1980). **Repeated genes in eukaryotes.** Ann. Ver. Biochem., v.49, p.727-764.

LOUGHMAN, W; FRYE F.; HERALD, E. (1970). **The chromosomes of a male manatee.** International Zoo Yearbook 10: 151-152.

LUNA, F. O. (2013). **Population genetics and conservation strategies for the West Indian manatee (*Trichechus manatus* Linnaeus, 1758) in Brazil.** PhD thesis, Universidade Federal de Pernambuco, Brazil.

LUNA, F. O.; ARAUJO, J. P. OLIVEIRA, E. M.; HAGE, L. M.; PASSAVANTE, J. Z. O. (2010). **Distribuição do peixe-boi marinho, *Trichechus manatus manatus*, no litoral norte do Brasil.** Arq. Ciên. Mar, Fortaleza, 43(2): 79 – 86.

LUNA, F. O.; ARAÚJO, J. P.; LIMA, R. P.; PESSANHA, M. M.; SOAVINSKI, R. J.; PASSAVANTE, J. Z. O. (2008b). **Captura e utilização do peixe-boi marinho (*Trichechus manatus manatus*) no litoral Norte do Brasil.** Biotemas, v. 21, n. 1, p. 115-123.

LUNA, F. O.; ARAÚJO, J. P.; PASSAVANTE, J. Z. O; MENDES, P. P.; PESSANHA, M. M.; SOAVINSKI, R. J.; OLIVEIRA, E. M. (2008c). **Ocorrência do peixe boi marinho (*Trichechus manatus manatus*) no litoral norte do Brasil.** Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão, v. 23, p. 37-49.

LUNA, F. O.; LIMA, R. P.; ARAÚJO, J. P.; PASSAVANTE, J. Z. O. (2008a). **Status de conservação do peixe-boi marinho (*Trichechus manatus manatus* Linnaeus, 1758) no Brasil.** Revista Brasileira de Zoociências, v. 10, n. 2, p. 145-153.

LUNA, F. O.; SILVA, V. M. F.; ANDRADE, M. C. M.; MARQUES, C. C.; NORMANDE, I. C.; VELOSO, T. M. G.; SEVERO, M. H. **Plano de ação nacional para a conservação dos sirênios: peixe-boi-da-Amazônia: *Trichechus inunguis* e peixe-**

boi-marinho: *Trichechus manatus*. Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, ICMBio, (2011). 80p

LYON, M. F. (2000). **LINE-1 elements and X chromosome inactivation: a function for “junk” DNA.** PNAS. Vol. 97, 6248-6249.

MALLET, J. (2005). **Hybridization as na invasion of the genome.** TRENDS in Ecology and Evolution. Vol. 20 No.5, 229-237.

MARSH, H.; LEFEBVRE, L. W. (1994). **Sirenian status and conservation efforts.** Aquatic Mammals, 20.3, 155-170.

MARSH, H.; O’SHEA, T. J.; BEST, R. C. (1986). **Research on Sirenians.** Ambio. Vol. 15, n. 3, 177-180.

MARSH, H.; O’SHEA, T. J.; REYNOLDS III, J. E.; (2011). **Ecology and conservation of the Sirenia: dugongs and manatees.** New York, Cambridge University Press, 536p.

MARTINS, C. & WASKO, A. P. (2004). **Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish genome.** In Williams CR (Ed) Focus on Genome Research. Nova Science Publishers Hauppauge NY 335-363.

MARTINS, C. **Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome.** In: Fish Cytogenetics. Eds: PISANO, E; OZOUF-COSTAZ, C; FORESTI, F.; KAPOOR BG. Science Publisher, Inc., USA. 2006.

MARTINS, C.; CABRAL-DE-MELLO, D. C.; VALENTE, G. T.; MAZZUCHELLI, J.; OLIVEIRA, S. G. & PINHAL, D. (2011). **Animal genomes under the focus of cytogenetics.** New Hampshire: Nova Science Publisher.

MCKENNA, M. C. (1975). **Toward a phylogenetic classification of the Mammalia.** In: LUCKETT, F. S. and SZALAY, F. S. Phylogeny of the primates. New York, NY: Plenum Press, p.21-46.

MEHROTRA, S. & GOYAL, V. (2014). **Repetitive Sequences in Plant Nuclear DNA: Types, Distribution, Evolution and Function.** Genomics Proteomics Bioinformatics 12, 164–171.

MOORHEAD, P. S.; NOWELL, P. C.; MELLMAM, W. J.; BATTIPS, D. M.; HUNGERFORD, D. A. (1960). **Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood.** Expi Cell Res 20: 613-616.

NIRCHIO, M.; FENOCCHIO, A. S.; SWARÇA, A. C.; PEREZ, J. E.; GRANADO, A.; ESTRADA, A. & RON, E. (2003). **Cytogenetic characterization of hybrids Offspring between *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) and *Piaractus brachypomus* (Cuvier, 1817) from Caicara del Orinoco, Venezuela.** CARYOLOGIA Vol. 56, no. 4: 405-411.

NISHIHARA, H.; SATTA, Y.; NIKAIDO, M.; THEWISSEN, J. G. M.; STANHOPE, M. J.; OKADA, N. (2005). **A retropsoson analysis of Afrotherian phylogeny.** Mol. Biol. Evol. 22(9): 1823-1833.

- O'DONNELL, K. A. & BURNS, K. (2010). **Mobilizing diversity: transposable element insertions in genetic variation and disease.** BioMed Central Ltd., 1-10.
- O'SHEA, T. J. Manatees. **Scientific American.** p. 66-72, 1994.
- ORGEL, L. E. & CRICK, F. H. C. (1980). **Selfish DNA: the ultimate parasite.** Nature, vol. 284, 604-607.
- OZOUF-COSTAZ, C.; BRANDT, J.; KORTING, C.; PISANO, E.; BONILLO, C.; COUTANCEAU, JP. & VOLFF. (2004). **Genome dynamics and chromosomal localization of the non-LTR retrotransposons *Rex1* and *Rex3* in Antarctic fish.** Antarctic Science 16 (1): 51–57.
- PARDINI, A. T.; O'BRIEN, P. C. M.; FU, B.; BONDE, R. K.; ELDER, F. F. B.; FERGUSON-SMITH, M. A.; YANG, F.; ROBINSON, T. J. (2007). **Chromosome painting among Proboscidea, Hyracoidea and Sirenia: support for Paenungulata (Afrotheria, Mammalia) but not Tethytheria.** Proceedings of the Royal Society B, 274, 1333-1340.
- PATHAK, D. & ALI, S. (2012). **Repetitive DNA: A Tool to Explore Animal Genomes/Transcriptomes. Functional Genomics.** Doi: org/10.5772/48259.
- PRISTA, G. A. (2012). **Evolução, hegemonia e desaparecimento dos sirenios dos mares europeus ao longo do Cenozoico.** Dissertação. Universidade de Lisboa.
- PROIETTI, M. C.; REISSER, J.; MARTINS, L. F.; MARCOVALDI, M. A.; SOARES, L. S.; MONTEIRO, D. S.; WIJERATNE, S.; PATTIARATCHI, C. & SECCHI, R. (2014). **Hawksbill X loggerhead sea turtle hybrids at Bahia, Brazil: where do their offspring go?** *PeerJ*, 1-14.
- RAO, S. R.; TRIVEDI, S.; EMMANUEL, D.; MERITA, K. & HYNNEWTA. (2010). **DNA repetitive sequences-types, distribution and function: A review.** Journal of Cell and Molecular Biology 7(2) & 8(1): 1-11, 2010.
- REYNOLD III, J. E.; POWELL, J. TAYLOR, C. B.; (2009). **Manatees: *Trichechus manatus*, *T. senegalensis* and *T. inunguis*.** In: PERRIN, W. F.; WURSIG, J. G. M.; THEWISSEN, J. G. M. Encyclopedia of marine mammals. 2 ed. Academic Press. 682-691 p.
- RHYMER, J. M. & SIMBERLOFF (1996). **Extinction by hybridization and introgression.** Annual Review of Ecology and Systematics. Vol. 27 (1996), pp. 83-109.
- RONALD, K.; SELLEY, L. J. & AMOROSO, E. C. (1978). **Biological Synopsis of the Manatee.** College of biological Science, University of Guelph, Ontario. 112p.
- ROSAS, F. C. W. (1994). **Biology, conservation and status of the Amazonian manatee *Trichechus inunguis*.** Mammal Review, v. 24, No. 2, p.49-59.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual.** 2a ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA, 1989.

SANTOS, G. M.; SANTOS, A. C. M. (2005). **Sustentabilidade da pesca na Amazônia**. ESTUDOS AVANÇADOS v. 19, n 54, 165-182 p.

SATHASIVAM, K. **Marine mammals of India**. Universities Press, 2004, 125-127p.

SCHAURICH, M. N.; LOPES, F. R. V. & OLIVEIRA, L. R. (2012). **Hybridization phenomenon in cetacean and pinniped species**. Neotropical Biology and Conservation 7.3 (2012): 199-209.

SEABRIGHT, M. **A rapid banding technique for human chromosomes**. Lancet, 2: 971-972. 1971.

SHAPIRO, J. A. & STERNBERG, R. (2005). **Why repetitive DNA is essential to genome function**. Biol. Rev. (2005), 80, pp. 1–24.

SIMPSON, G. G. 1945 **The principles of classification and a classification of mammals**. Bull. Am. Mus. Nat. Hist. 85, 1–350.

SPRINGER, M. S.; AMRINE, H. M.; BURK, A.; STANHOPE, M. (1999). **Additional support for Afrotheria and Paenungulata, the performance of mitochondrial versus nuclear genes, and the impact of data partitions with heterogeneous base composition**. Systematic Biology. Vol. 48, 65-75.

SPRINGER, M. S.; MURPHY, W. J.; EIZIRIK, E. & O'BRIEN, S. J. (2003). **Placental mammal diversification and the Cretaceous-Tertiary boundary**. Proc Natl Acad Sci U S A, 100(3): 1056-1061.

SUMNER A (2003) **Chromosomes Organization and Functions**. Blackwell Science Ltd. Cap 7- pag.:84-96.

THEWISSEN, J. G. M. & DOMNING, D. P. (1992). **The role of phenacodontids in the origin of the modern orders of ungulate mammals**. Journal of Vertebrate Paleontology, 12:4, 494-504.

UBEDA-MANZANARO, M.; MERLO, M. A.; PALAZON, J. L.; CROSS, I.; SARASQUETE, C.; REBORDINOS, L. (2010) **Chromosomal mapping of the major and minor ribosomal genes, (GATA)n and U2 snRNA gene by double-colour FISH in species of the Batrachoididae family**. Genetica 138: 787–794.

UTSUNOMIA, R.; SCACCHETTI, P. C.; PANSONATO-ALVES, J. C.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. (2014) **Comparative chromosome mapping of U2 snRNA and 5S rRNA genes in Gymnotus species (Gymnotiformes, Gymnotidae): evolutionary dynamics and sex chromosome linkage in G. pantanal**. Cytogenet Genome Res 142:286–292.

VALADKHAN, S. (2005). **snRNAs as the catalysts of pre-mRNA splicing**. Current Opinion in Chemical Biology 2005, 9:603–608.

VERANI, A. M.; CARVALHO, L. C. B.; ZERILLO, M. M. & MONTEIRO-VITORELLO. **Elementos de Transposição: Classificação e Mecanismos de Mobilização**. In: CARARETO, C. M. A.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; & SLUYS, M. V. (Org). **Elementos de Transposição: diversidade, evolução, aplicações e**

impactos nos genomas dos seres vivos. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Genética. Editora: FIOCRUZ, 2015

VERÍSSIMO, J. A **Pesca na Amazônia.** Coleção Amazônica/Série José Veríssimo - UFPA, 1970. 130p.

VERMA, R.S. AND BABU, A. (1995). **Human Chromosomes: Principles and Techniques.** McGraw-Hill Inc., New York, pp. 8-14.

VIANNA, J. A.; BONDE, R. K.; CABALLERO,S.; GIRALDO, J. P.; LIMA, R. P.; CLARL, A.; MARMONTEL, M.; MORALES-VELA, B.; SOUZA, M. J.; PARR, L.; RODRIGUEZ-LOPEZ, M. A.; MIGNUCCI-GIANNONI, A. A.; POWELL, J. A.; SANTOS, F. R. (2006). **Phylogeography, phylogeny and hybridization in trichechid sirenians: implications for manatee conservation.** *Molecular Ecology* 15, 433-447.

WATERS, P. D.; DOBIGNY, G.; PARDINI, A. T. & ROBINSON, T. J. (2004). **LINE-1 distribution in Afrotheria and Xenarthra: implications for understanding the evolution of LINE-1 in eutherian genomes.** *Chromosoma*, 113: 137–144.

WHITE, J. R.; HARKNESS, D. R.; ISAACKS, R. E.; DUFFIELD, D. A. (1976). **Some studies on blood of the florida manatee, *Trichechus manatus latirostris*.** *Camp Biochem. Physiol.* Vol 55A. p. 413- 417.

WILLIS, P. M.; CRESPI, B. J.; DILL, L. M.; BAIRD, R. W. & HANSON, M. B. (2004). **Natural hybridization between Dall's porpoises (*Phocoenoides dalli*) and harbour porpoises (*Phocoena phocoena*).** *Can. J. Zool.* 82: 828-824.

WOOD, J. R. WOOD, F. E. & CRITCHLEY, K. (1983). **Hybridization of *Chelonia mydas* and *Eretmochelys imbricata*.** Vol. 1983, No. 3,p. 839-842.

YANG, F.; ALKALAEVA, E. Z.; PERELMAN, P. L.; PARDINI, A. T.; HARRISON, W. R.; O'BRIEN, P. C. M.; FU, B.; GRAPHODATSKY, A. S.; FERGUSON-SMITH, M. A. & ROBINSON, T. J. (2003). **Reciprocal chromosome painting among human, aardvark, and elephant (superorder Afrotheria) reveals the likely eutherian ancestral Karyotype.** *PNAS* 4: 1062-1066.

YAZDDI, P. (2002). **A possible hybrid between the dusky dolphin (*Lagenorhynchus obscurus*) and the southern right whale dolphin (*Lissodelphis peronii*).** *Aquatic Mammals*, 28.2, 211-217.