

**JOANA ODETE VALÉRIO PAIXÃO TEIXEIRA DE
SOUSA**

**ESTUDO DA POTENCIAL RELAÇÃO DA
ANEUPLOIDIA COM A CONDIÇÃO FISIOLÓGICA
E O CRESCIMENTO NA AMÊIJOA-BOA *Ruditapes
decussatus***

**Orientador interno: Doutor Gonçalo Calado
Co-orientadoras: Doutora Alexandra Leitão e Mestre Domitília Matias**

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias
Faculdade de Engenharia e Ciências Naturais**

**Lisboa
2010**

**JOANA ODETE VALÉRIO PAIXÃO TEIXEIRA DE
SOUSA**

**ESTUDO DA POTENCIAL RELAÇÃO DA
ANEUPLOIDIA COM A CONDIÇÃO FISIOLÓGICA
E O CRESCIMENTO NA AMÊIJOA-BOA *Ruditapes
decussatus***

Dissertação apresentada para a obtenção
do grau de mestre em Biologia no Curso
de Mestrado em Biologia do
Desenvolvimento conferido pela
Universidade Lusófona de Humanidades
e Tecnologias.

Orientador interno: Doutor Gonçalo
Calado

Co-orientadoras: Doutora Alexandra
Leitão e Mestre Domitília Matias

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias
Faculdade de Engenharia e Ciências Naturais**

**Lisboa
2010**

Agradecimentos

Ao terminar esta dissertação, desejo manifestar o meu sincero reconhecimento pelo apoio e pelas contribuições de diversas pessoas e entidades a quem estou agradecida.

À Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, pela aceitação da intenção de mestrado.

Ao INRB/IPIMAR, Instituto Nacional de Recursos Biológicos, pela disponibilidade e facilidades concedidas durante a realização deste trabalho.

Ao projecto FCT: PTDC/MAR/72163/2006, designado “*Padrões de evolução cromossómica em Bivalvia (Mollusca): Realização de Mapas Cromossómicos por restrição in Situ e Especificidades Cromossómicas dos Genes Ribossomais (PACEB)*”: FCOMP-01-0124-FEDER-007384

Ao Doutor Gonçalo Calado, agradeço pelos ensinamentos enquanto meu professor durante a licenciatura em Biologia, por ter aceitado ser meu orientador científico e por todas as sugestões importantes para a finalização desta dissertação.

À Doutora Alexandra Leitão, agradeço antes de mais ter aceitado ser minha co-orientadora científica. Muito obrigada pelo total e incondicional apoio, dedicação e muita paciência ao longo deste último ano. Agradeço por todas as palavras sábias, conselhos preciosos, revisões cuidadas da dissertação e por todo o material fornecido na realização deste trabalho. Agradeço também por me ter apresentado aos meus novos amigos cromossomas, a minha mais recente paixão. Sinto-me privilegiada e honrada por tudo o que me ensinou, esperando continuar a aprender todos os dias, durante o máximo tempo possível.

À mestre Domitília Matias, quero igualmente agradecer ter aceitado ser minha co-orientadora científica. Obrigada pelo apoio, pelos conselhos importantes e pelas correcções imprescindíveis, para que esta dissertação ficasse o mais perfeita possível. Agradeço principalmente pela paciência nesta recta final, quando tudo parece mais difícil e também pela boa disposição contagiante.

À Dr.^a Sandra Joaquim, que apesar de oficialmente não ser minha orientadora ou co-orientadora, esteve sempre presente e acompanhou todo o meu trabalho do início ao fim. O meu sincero obrigada pela calma transmitida dia após dia, pelo apoio incondicional, por tudo

o que me ensinou e que jamais irei esquecer. E claro, obrigada pela paciência infinita e encorajamento nos momentos mais delicados.

Ao Doutor Radhouan Ben-Hamadou, pela disponibilidade e valiosíssima ajuda no tratamento estatístico, mesmo quando a agenda já dificilmente o permitia.

À Margô, pelo apoio dado, quer profissional quer pessoal, desde o início até ao final desta minha aventura. Pela força, amizade, companhia, boa disposição e por todas as gargalhadas que demos juntas. Agradeço por me ter feito ‘esquecer’ todos os dias a ausência e a distância dos meus amigos. Agradeço igualmente por algumas das fotos presentes neste trabalho.

À Janita, por ter tornado uma cidade desconhecida um sítio bem mais agradável e divertido para viver. Obrigada pelo apoio, pela amizade, pelos passeios de bicicleta, pelas corridas de fim de tarde, pelos jantares de fim-de-semana... enfim, pela companhia e muito mais! Vamos ver como me porto sem ti. Agradeço também ao Martinho, pela ajuda dada na formatação deste trabalho, pelas sugestões, pela boa disposição, e já agora pelas caipirinhas feitas com precisão a 0,0001g.

Ao Sr. Maurício, pela ajuda que me deu ao tomar conta das minhas amêijoas e por ser o excelente profissional sempre pronto para tudo e para todos. Obrigada pelas incursões matinais de fim-de-semana à Ria, para a apanha do caranguejo, da ostra, do berbigão e outros que tais.

Obrigada a todos, que foram a minha família adoptiva enquanto a biológica estava um pouco mais a Norte.

A todos os meus amigos, quer em Lisboa quer em Torres Novas, que fizeram com que cada quilómetro de auto-estrada percorrido valesse a pena. Porque mesmo com 300km de diferença a separar-nos, estiveram sempre presentes. Um bem-haja ao ‘Sr. Windows Live Messenger’, que tornou tudo mais fácil.

Finalmente, os mais importantes, a minha família. Obrigada pela paciência, apoio, estabilidade e claro, por acreditarem em mim. Este trabalho é de todos.

Resumo

Tendo em conta o elevado interesse da amêijoia-boua, *Ruditapes decussatus* em termos económicos, em Portugal, este trabalho foi importante para a compreensão de um dos principais problemas no cultivo desta espécie, o crescimento. Nos últimos anos, para além de se observar uma grande variabilidade na taxa de crescimento, o tamanho dos indivíduos capturados tem vindo a sofrer, uma acentuada diminuição. Frequentemente, numa mesma ‘cohort’, esta espécie apresenta dois tipos de indivíduos, os que crescem mais rapidamente, os chamados ‘Fast-Growers’ e os que crescem mais lentamente, os ‘Slow-Growers’. Este fenómeno ocorre, apesar dos indivíduos estarem sujeitos às mesmas condições de cultivo.

O principal objectivo deste trabalho foi estudar as possíveis diferenças entre ‘Fast-Growers’ e ‘Slow-Growers’ de uma mesma ‘cohort’ de *R. decussatus* a nível das possíveis alterações cromossómicas numéricas existentes, aneuploidia, e a nível da fisiologia, nomeadamente na avaliação do índice de condição e na análise da composição bioquímica. Foi igualmente realizado um estudo com o objectivo de identificar os cromossomas ausentes nos casos de aneuploidia.

Os resultados obtidos sugerem pela primeira vez a existência de uma correlação negativa entre a aneuploidia e o crescimento nesta espécie. Verificou-se igualmente uma perda cromossómica preferencial nos pares 1, 6, 12 e 19.

Palavras-chave - *Ruditapes decussatus*, crescimento, aneuploidia, condição fisiológica, identificação cromossómica.

Abstract

Given the commercial importance of the carpet shell, *Ruditapes decussatus* in Portugal, this work contributed to understand one of the main problems in the production of this species, the growth rate. In addition to an observed high growth rate variability, a decrease in the maximum size reached by the individuals of this species has been noticed in the last years. Usually, in the same cohort, this species presents two groups of individuals, the Fast-Growers and the Slow-Growers according to their shell length. This variability occurs, although individuals are reared under common conditions.

The main objective of this work was to study the possible differences between ‘Fast-Growers’ and ‘Slow-Growers’ of the same cohort of *R. decussatus* in terms of eventual numerical chromosomal changes, aneuploidy, and the level of physiological capacity, by assessing the condition index and the biochemical composition. The identification of the missing chromosomes in aneuploid situations was also performed.

The results of this study showed for the first time the existence of a negative correlation between aneuploidy and growth rate in this species. A preferential chromosomal loss was observed in pairs 1, 6, 12 and 19.

Keywords - *Ruditapes decussatus*, growth rate, aneuploidy, physiological condition, chromosomal identification.

Abreviaturas e Símbolos

% - Percentagem

‘Fast-Growers’ – Grupo de indivíduos da espécie *Ruditapes decussatus* que apresentam um tamanho maior que os restantes.

‘Medium-Growers’ - Grupo de indivíduos da espécie *Ruditapes decussatus* que apresentam um tamanho intermédio.

‘Slow-Growers’ - Grupo de indivíduos da espécie *Ruditapes decussatus* que apresentam um tamanho menor que os restantes.

‰ – Partes por mil

2n – Número diplóide

Ag-NOR - Argyrophilic nucleolar organizer regions

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DGPA - Direcção Geral de Pescas e Aquicultura

FISH – Fluorescent ‘in situ’ hybridization

g, mg, µg – Grama, miligrama, micrograma

h, min – Horas, minutos

INRB/L-IPIMAR – Instituto Nacional de Recursos Biológicos/ Laboratório IPIMAR

kJ – Kilojoule

l, ml, µl – Litro, mililitro, microlitro

M – Molar

mm – Milímetro

N – Normalidade

nm – Nanómetro

NOR – Nucleolar Organiser Region

°C – Graus Celsius

PCD - Premature Centromere Division

RE – Restriction Endonuclease

RNA – Ácido Ribonucleico

RNA_m – RNA mensageiro

RNA_r – RNA ribossomal

rpm – Rotações por minuto

T₀ - Primeiro tempo de amostragem, dia 0

T₁ – Segundo tempo de amostragem, dia 107

T₂- Terceiro tempo de amostragem, dia 199

TCA – Ácido tricloroacético

Índice Geral

AGRADECIMENTOS	1
RESUMO	3
ABSTRACT	4
ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	5
ÍNDICE GERAL	7
ÍNDICE DE FIGURAS	9
ÍNDICE DE TABELAS	11
INTRODUÇÃO GERAL	12
CAPÍTULO 1	17
1.1. Introdução	18
1.2. Material e Métodos	22
1.2.1. Procedimento Experimental	22
1.2.1.1. Selecção dos indivíduos	22
1.2.1.2. Aclimação dos indivíduos e realização do ensaio	23
1.2.1.3. Amostragem biológica	24
1.2.2. Procedimento Analítico	25
1.2.2.1. Caracterização do crescimento	25
1.2.2.2. Determinação do índice de condição	26
1.2.2.3. Análise da composição bioquímica e valor energético	27
1.2.2.3.1. Fraccionamento das amostras	27
1.2.2.3.2. Extração das amostras	27
1.2.2.3.3. Determinação dos componentes bioquímicos	29
1.2.2.4. Obtenção das preparações cromossómicas	31
1.2.2.5. Observação das lâminas e microfotografias	33
1.2.2.6. Determinação da taxa de aneuploidia	34
1.2.3. Tratamento estatístico	35
1.3. Resultados	37
1.3.1. Crescimento	37
1.3.2. Índice de Condição	38
1.3.3. Composição Bioquímica	39
1.3.4. Aneuploidia	45

1.3.5. Relação entre parâmetros	48
1.4. Discussão	51
1.4.1. Crescimento	51
1.4.2. Índice de condição	51
1.4.3. Composição bioquímica	52
1.4.4. Aneuploidia	54
1.4.5. Relações entre parâmetros	56
1.5. Conclusão	57
CAPÍTULO 2	58
2.1 Introdução	59
2.2. Material e Métodos	62
2.2.1. Obtenção das preparações cromossómicas	62
2.2.2. Elaboração do cariótipo standard	62
2.2.3. Elaboração de cariótipos com marcação cromossómica	63
2.2.3.1. Regiões dos organizadores nucleolares – NORs	63
2.2.3.2. Digestão ‘in situ’ com enzimas de restrição	63
2.2.3.3. Observação das lâminas e microfotografias	64
2.3. Resultados	65
2.3.1. Cariótipo standard	65
2.3.2. Regiões dos organizadores nucleolares – NOR	65
2.3.3. Enzimas de restrição	66
2.3.4. Identificação dos cromossomas ausentes em casos de aneuploidia	67
2.4. Discussão	71
2.5. Conclusão	75
CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS	76
BIBLIOGRAFIA	78
ÍNDICE REMISSIVO	90
APÊNDICE	I

Índice de Figuras

Figura 1- Exemplares de indivíduos da espécie de amêijoa-boia, <i>R. decussatus</i> . (a) - ‘Fast-Growers’. (b) - ‘Slow-Growers’.	23
Figura 2- Manutenção dos juvenis de <i>R. decussatus</i> em crivo com uma malhagem de 500 μm provido de ‘air-lift’ para aerificar a água, num tanque de 80L.	24
Figura 3- Comprimento máximo (C) (mm): Maior distância no eixo antero-posterior.	25
Figura 4- Imagem exemplificativa do efeito da colquicina, em que se induz o bloqueio temporário da divisão celular e acumulação de células em estado de metafase. a) Imagem dos cromossomas, e m metafase. b) Separação das cromátides-irmãs em anafase. (Cooper, 2000)	31
Figura 5- Dissecção e extracção das brânquias de um indivíduo da espécie <i>R. decussatus</i> .	32
Figura 6- Execução das lâminas segundo a técnica de suspensão celular de Thiriot-Quévieux & Ayraud (1982).	33
Figura 7- Observação das lâminas ao microscópio óptico com câmara de aquisição de imagem incorporada.	34
Figura 8- Variação dos valores médios ($\pm\sigma$) do comprimento (mm) dos três grupos de juvenis de <i>R. decussatus</i> , ao longo do período experimental.	37
Figura 9- Variação dos valores médios ($\pm\sigma$) do peso (g) dos três grupos de juvenis de <i>R. decussatus</i> , ao longo do período experimental.	37
Figura 10- Variação dos valores médios ($\pm\sigma$) do índice de condição dos três grupos de juvenis de <i>R. decussatus</i> , ao longo do período experimental.	38
Figura 11- Variação média ($\pm\sigma$) dos valores percentuais de proteínas, hidratos de carbono e lípidos totais dos juvenis de amêijoa-boia <i>R. decussatus</i> em relação ao total de matéria orgânica.	39
Figura 12- Variação média ($\pm\sigma$) dos valores percentuais de lípidos neutros e fosfolípidos dos juvenis de amêijoa-boia <i>R. decussatus</i> em relação ao conteúdo em lípidos totais.	41
Figura 13- Variação média ($\pm\sigma$) dos valores percentuais de açúcares redutores livres e polissacarídeos dos juvenis de amêijoa-boia <i>R. decussatus</i> em relação ao conteúdo em hidratos de carbono.	42
Figura 14- Variação média ($\pm\sigma$) da energia total (KJ.g^{-1}) dos juvenis de amêijoa-boia <i>R. decussatus</i> .	44

Figura 15- Exemplos de metafases de *R. decussatus*. A- $2n=38$; B- $2n=37$; C- $2n=36$; D- $2n=35$; E- $2n=34$. Barra de escala = $5\mu m$. 45

Figura 16- Esquema da relação entre os parâmetros estudados (ACP). a) Projecção de grupos. b) Projecção de parâmetros. 48

Figura 17- Rectas de regressão de a) Taxa de Aneuploidia (%) em função do Índice de Condição, b) Taxa de Aneuploidia em função do Comprimento, c) Fosfolípidos em função do Índice de Condição e d) Lípidos Neutros em função do Comprimento. 49

Figura 18- Cariótipo standard de *R. decussatus*, confirmando a fórmula cariotípica de seis pares de cromossomas metacêntricos, três submetacêntricos e dez subtelocêntricos (Borsa & Thiriot-Quiévreux, 1990). 65

Figura 19- A. Metafase de *R. decussatus* com marcação de Ag-NORs. As setas assinalam as Ag-NORs. B. Cromossomas assinalados em A com o respectivo ideograma representativo. 66

Figura 20- Exemplos de cromossomas de *R. decussatus* com bandeamento cromossómico obtido através da enzima de restrição HaeIII e respectivo ideograma. 67

Figura 21- Quatro cariótipos aneuploides de *R. decussatus* onde se pode observar a ausência de determinados cromossomas. Estes cariótipos são representativos dos casos mais comuns. a) Cariótipo com perda cromossómica nos pares nº 1 e 19. b) Cariótipo com perda cromossómica no par nº 19. c) Cariótipo com perda cromossómica nos pares nº 12 e 19. d) Cariótipo com perda cromossómica nos pares nº 6 e 12. 69

Índice de Tabelas

Tabela I- Índice Global de Crescimento em comprimento e peso dos três grupos de juvenis de <i>R. decussatus</i> , ao longo do período experimental.	38
Tabela II- Medições biométricas e percentagens finais de aneuploidia dos indivíduos ‘Fast-Growers’, ‘Medium-Growers’ e ‘Slow-Growers’ em T ₀ .	46
Tabela III- Medições biométricas e percentagens finais de aneuploidia dos indivíduos ‘Fast-Growers’, ‘Medium-Growers’ e ‘Slow-Growers’ em T ₁ .	46
Tabela IV- Medições biométricas e percentagens finais de aneuploidia dos indivíduos ‘Fast-Growers’, ‘Medium-Growers’ e ‘Slow-Growers’ em T ₂ .	46
Tabela V- Percentagem de perda nos diferentes pares cromossómicos que apresentaram cromossomas ausentes. A negrito encontram-se representados os pares com uma perda preferencial em casos de aneuploidia, na espécie <i>R. decussatus</i> .	70

Introdução Geral

Introdução Geral

As amêijoas são um grupo de moluscos bivalves com uma grande diversidade de espécies, sendo a amêijoia-boua, *Ruditapes decussatus* uma das mais importantes espécies de bivalves produzidas em Portugal.

A taxonomia de *R. decussatus* foi, até ao início dos anos 90, um assunto controverso. No início designada como *Venus decussata* (Linnaeus, 1758), foi sofrendo alterações ao longo dos anos: *Amydala decussata* (L.), *Tapes decussatus* (L.) e *Venerupis decussata* (F.). Hoje em dia, o nome da espécie *Ruditapes decussatus* aparece associado à espécie vulgarmente designada por amêijoia-boua, amêijoia cristã, amêijoia de cabeça, amêijoia do rochedo, amêijoia verdadeira ou amêijoia vulgar (Muzavor, 1991; Sánchez, 1992).

Actualmente a sua classificação, dentro do reino animal, é a seguinte (National Center for Biotechnology information [NCBI], 2009):

Reino: Animalia

Filo: Mollusca

Classe: Bivalvia

Ordem: Veneroida

Família: Veneridae

Género: *Ruditapes*

Espécie: *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758)

A nível mundial, *R. decussatus* distribui-se ao longo da costa atlântica, desde a Noruega até ao Congo, passando pelo Mar do Norte, restringindo-se neste apenas à Noruega e Dinamarca e pelas ilhas Britânicas, mais precisamente nas costas Oeste e Sul. Encontra-se igualmente no Mar Mediterrâneo e no Mar Vermelho, para onde esta espécie migrou pelo Canal Suez, no Egipto (Parache, 1982).

Em Portugal, predomina nas zonas abrigadas da costa, como enseadas, rias, embocaduras de rios e lagoas litorais, nomeadamente na Ria de Aveiro, Lagoa de Óbidos, margem esquerda do Tejo, Tróia e imediações da Foz do Sado, Rio Arade, Ria de Alvor e,

principalmente na Ria Formosa (Vilela, 1950). Também é encontrada na Ilha de São Jorge, Açores, mais precisamente na Lagoa da Fajã de Santo Cristo (Jordaens *et al.*, 2000).

A costa algarvia possui uma larga tradição no cultivo de moluscos bivalves sendo responsável por mais de 90% da produção nacional. *R. decussatus* representa 31% do total da produção aquícola e 56% do total da produção nacional de moluscos bivalves. A sua produção é uma actividade estratégica, uma vez que, contribui de forma significativa para a manutenção das economias locais e constitui um motor gerador de riqueza e emprego no litoral (Direcção Geral das Pescas e Aquicultura [DGPA], 2008). Para além do aspecto económico, a moluscicultura reveste-se, também, de uma importância social considerável, uma vez que estão envolvidas, directa e indirectamente, nesta actividade cerca de 10000 pessoas. A actividade de moluscicultura exerce-se, na sua maior parte na zona do Parque Natural da Ria Formosa e na Ria de Alvor, em cerca de 1700 unidades licenciadas (Dinis, 1998).

O crescimento dos organismos depende do efeito sinérgico dos factores externos e internos. Geralmente é aceite que o desenvolvimento da *R. decussatus* é condicionado por factores ambientais, como sejam a salinidade, a composição do sedimento, concentração do oxigénio dissolvido (Parache, 1982) e quantidade e qualidade do alimento (Matias, 2007). O desenvolvimento desta espécie é feito em dois períodos distintos, um de crescimento, de Março a Outubro, e outro de estagnação de Novembro a Fevereiro. No entanto, o período de crescimento pode sofrer restrições ou ser dilatado, dependendo das condições ambientais. (Banha, 1984; Monteiro *et al.*, 1988). O crescimento é, de uma forma geral, uniforme sendo mais acentuado entre Março e Julho (Banha, 1984).

Contudo, frequentemente, numa mesma ‘cohort’, *R. decussatus* apresenta dois grupos de indivíduos, os que crescem mais rapidamente, os chamados ‘Fast-Growers’ e os que crescem mais lentamente, os ‘Slow-Growers’. Este fenómeno ocorre apesar dos indivíduos estarem sujeitos às mesmas condições ambientais, revelando a influência que os factores internos podem ter no crescimento destes indivíduos.

O fenómeno citogenético da aneuploidia, mais precisamente hipodiploidia, ou seja, falta de um ou dos dois cromossomas num par de homólogos, tem sido observado em várias populações de bivalves. (*e.g.* Longwell *et al.*, 1967; Stiles & Longwell, 1973; Dixon, 1982). Uma relação negativa entre a taxa de crescimento e este fenómeno de aneuploidia foi colocada em evidência em duas espécies de ostra: *Crassostrea gigas* (Thiriot-Quiévreux *et*

al., 1988; Leitão *et al.*, 2001), *C. angulata* e os respectivos híbridos interespecíficos (Batista *et al.*, 2007). Na espécie *C. gigas* demonstrou-se igualmente que este fenómeno se encontrava associado a factores genéticos (Leitão *et al.*, 2001) e ambientais (Bouilly *et al.*, 2003). Factores genéticos poderão, de facto, estar associados a componentes fisiológicos que regulem as diferenças no crescimento intra-específico entre indivíduos que vivem no mesmo ambiente (Bayne, 1999). Essas diferenças poder-se-ão reflectir no índice de condição, bem como nos componentes bioquímicos.

A demonstração das bases genéticas deste fenómeno nas duas espécies de ostras e híbridos inter-específicos mencionadas acima revelaram ser essenciais, atendendo que os produtores de bivalves têm tendência de, numa mesma ‘cohort’, comercializar os animais que atingem o tamanho comercial mais rapidamente, os que apresentam uma taxa de aneuploidia mais baixa, e de deixar ficar nos locais de produção, durante mais tempo, os animais com taxa de crescimento mais lenta, os que apresentam uma taxa de aneuploidia mais elevada. Estes últimos irão assim ter uma participação relativa mais elevada na reprodução. Esta forma de actuar dos produtores poderá conduzir a uma selecção negativa para o factor crescimento.

Nos últimos anos, para além de se ter vindo a observar uma grande variabilidade na taxa de crescimento de *R. decussatus*, o tamanho dos indivíduos capturados tem vindo a sofrer, no geral, uma acentuada diminuição, representando um problema para produtores e mariscadores de bivalves.

A obtenção de um melhor conhecimento do fenómeno da aneuploidia em *R. decussatus* e da sua potencial relação com o crescimento e com a condição fisiológica, poderá representar um importante contributo para a gestão, quer dos bancos naturais, quer em termos de produção deste importante recurso.

O principal intuito deste projecto visou, então, analisar as possíveis diferenças no desenvolvimento entre ‘Fast-Growers’ e ‘Slow-Growers’ de uma mesma ‘cohort’ de *R. decussatus*, produzida em laboratório para este estudo, ao nível das possíveis alterações cromossómicas numéricas existentes, aneuploidia, mas igualmente a nível da capacidade fisiológica, nomeadamente, na eficácia da utilização dos nutrientes através da análise de componentes bioquímicos.

Assim esta tese encontra-se estruturada em dois capítulos, que definem os seguintes objectivos específicos:

Capítulo I - Será dedicado ao estudo da relação da aneuploidia com a condição fisiológica e com o crescimento, na espécie *R. decussatus*. Neste capítulo serão determinados os níveis de aneuploidia de ‘Fast-Growers’, ‘Medium-Growers’ e ‘Slow-Growers’ e averiguada a existência de uma potencial relação entre aneuploidia e crescimento e condição fisiológica. Esta será caracterizada com base no índice de condição e componentes bioquímicos.

Capítulo II - Será dedicado à identificação dos cromossomas ausentes em cariótipos aneuploides. Para tal será efectuada a identificação dos cromossomas, através da aplicação de técnicas de marcação diferencial: a técnica de marcação por nitrato de prata para as regiões dos organizadores nucleolares e a de bandeamento por enzimas de restrição. A identificação dos cromossomas ausentes em cariótipos aneuploides será essencial a fim de compreender melhor este fenómeno.

Na presente dissertação, a norma utilizada para citações e referenciação bibliográfica será a Norma APA.

Capítulo 1

Relação da aneuploidia com a condição fisiológica e o crescimento, na espécie *Ruditapes decussatus*

1.1. Introdução

Toda a espécie animal e vegetal tem um complemento cromossómico característico. Os cromossomas para além do seu tamanho são caracterizados igualmente em função da posição do seu centrómero. A sua organização, de acordo com normas de classificação internacionalmente acordadas quanto ao número, tamanho, morfologia e modelo de bandeamento, constitui o cariótipo. A análise cariológica tem um papel importante no estudo de patologias, evolução, programas de melhoramento animal e vegetal (Malheiro & Porto, 1999). Nas células somáticas dos eucariontes os cromossomas ocorrem, na maioria dos casos, aos pares, sendo um cromossoma de origem paterna e outro de origem materna. Cada cromossoma de um par é homólogo ao outro, ou seja, apresenta o mesmo tamanho, a mesma morfologia e os mesmos genes. Geralmente o número de cromossomas de uma espécie é constante e é mantido durante os ciclos de divisões. Apenas durante a meiose, quando se formam os gametas, ocorre uma redução para metade do número cromossómico. Em consequência os gametas são haploides, isto é, apresentam n cromossomas e as células somáticas são diploides, ou seja, apresentam $2n$ cromossomas (Junqueira & Carneiro, 2000).

As alterações no cariótipo de uma espécie que envolvam mudanças no número de cromossomas são classificadas como aneuploidias ou euploidias. As euploidias dizem respeito à alteração do complemento cromossómico na sua totalidade, enquanto a aneuploidia diz respeito a perdas ou ganhos de cromossomas individuais, relativamente ao número diploide normal.

O fenómeno da aneuploidia tem maioritariamente origem na não disjunção ou no atraso na ascensão anafásica, durante a mitose ou meiose (Martin & Rademaker, 1990), podendo igualmente ter origem na divisão centromérica prematura, PCD, isto é, a precoce separação dos centrómeros durante a prometafase/metáfase do ciclo mitótico (Major *et al.*, 1998). Estudos recentes realizados em plantas sugerem, igualmente, que existe também perda cromossómica durante a interfase, envolvendo a expulsão nuclear acompanhada pela formação de micronúcleos pós-mitóticos (Gernand *et al.*, 2005).

Este fenómeno de aneuploidia é geralmente letal em animais superiores, como os mamíferos, ou encontra-se associado, entre outros, a atrasos no crescimento e desenvolvimento, porém os seus efeitos parecem ser menos nocivos em plantas ou animais inferiores (Verma, 1990).

Factores genéticos podem estar envolvidos neste fenómeno, visto que em humanos e em algumas espécies de plantas, se pôs em evidência a existência de genes responsáveis pela não disjunção cromossómica (Bond & Chandley, 1983). Em bivalves foram observadas diferenças significativas nos níveis de aneuploidia em diferentes famílias da ostra *Crassostrea gigas*, com a mesma idade e peso e mantidas nas mesmas condições (Leitão *et al.*, 2001), sugerindo, de facto, a existência de bases genéticas envolvidas neste fenómeno. No entanto, há igualmente sugestões de que factores endógenos relacionados com a idade, bem como predisposições fisiológicas, possam estar na origem do aparecimento de aneuploidias (Verma, 1990).

Outro factor que potencialmente afecta os níveis de aneuploidias é o factor ambiental (Ramirez *et al.*, 1997). Em 1982, Dixon evidenciou a relação entre aneuploidia e poluição, descrevendo a presença de 8% de embriões aneuploides no mexilhão *Mytilus edulis* numa zona não poluída e 26% de embriões aneuploides numa zona poluída. Mais recentemente, foi observada uma correlação positiva entre os níveis de Atrazina, um herbicida muito usado na agricultura, e a aneuploidia na ostra *C. gigas* (Bouilly *et al.*, 2003). Foi demonstrado também que a descendência dos indivíduos expostos a uma percentagem maior de herbicida, exibiam um maior nível de aneuploidia do que a descendência dos indivíduos expostos a uma percentagem menor. Estes resultados demonstram a persistência ao longo do tempo do impacto da Atrazina em *C. gigas*, dentro e entre gerações diferentes. (Bouilly *et al.*, 2004).

Uma correlação negativa entre o nível de hipodiploidia somática e a taxa de crescimento foi posta em evidência na espécie de ostra do Pacífico *C. gigas*. Ou seja, os animais de grande tamanho apresentavam uma percentagem de aneuploidia inferior à apresentada pelos animais de pequeno tamanho. (Thiriot-Quiévreux, 1986; Thiriot-Quiévreux *et al.*, 1988; Thiriot-Quiévreux *et al.*, 1992; Leitão *et al.*, 2001). Noutro estudo mais recente, foram realizados cruzamentos entre a ostra portuguesa *C. angulata* e a ostra japonesa *C. gigas* a fim de se observar a relação entre a aneuploidia e a variabilidade no crescimento, ao nível individual nestas duas espécies e também nos seus híbridos interespecíficos. A sobrevivência e a taxa de crescimento foram significativamente mais elevadas em *C. gigas* do que em *C. angulata*, e os híbridos apresentaram performances intermédias. Foram observadas diferenças significativas entre as duas espécies, quer na proporção de células aneuploides, quer nos cromossomas ausentes, com a ostra *C. angulata* a apresentar os valores mais altos. Foram igualmente observados valores intermédios a este nível nos híbridos, confirmando assim a existência de predisposições genéticas para estes parâmetros. Os resultados deste estudo

também confirmaram a relação negativa entre aneuploidia e taxa de crescimento a um nível individual, em *C. angulata* e nos híbridos inter-específicos (Batista *et al.*, 2007), como previamente referido para *C. gigas* (Leitão *et al.*, 2001). No entanto, até agora nenhum estudo sobre aneuploidia foi efectuado em *R. decussatus*. Os primeiros estudos de citogenética efectuados nesta espécie referiram-se apenas à determinação do número cromossómico (Paterson review, 1969; Gerard, 1978), aferindo um número diploide de 38 cromossomas. Posteriormente, foi caracterizado o cariótipo, sendo este constituído por seis pares de cromossomas metacêntricos, três submetacêntricos e dez subtelocêntricos (Borsa & Thiriot-Quévieux, 1990). Deste modo, um bom conhecimento do fenómeno da aneuploidia e da sua potencial relação com o crescimento revela-se assim essencial.

Esta possível relação entre a aneuploidia e o crescimento, poder-se-á reflectir na qualidade fisiológica e na constituição bioquímica dos indivíduos, dado que os componentes fisiológicos reguladores das diferenças no crescimento intraespecífico entre indivíduos que vivem no mesmo ambiente, poderão ser afectados por diferenças: na aquisição de energia, ou seja, no consumo de alimento e assimilação, na repartição de energia entre a manutenção do organismo, crescimento, reprodução e outras actividades que necessitem de energia, e no custo metabólico do crescimento (Bayne, 1999).

A composição bioquímica dos bivalves depende do alimento disponível, do estado de desenvolvimento das gónadas e da actividade metabólica do indivíduo (Ruiz *et al.*, 1990). A utilização das reservas metabólicas inicia-se preferencialmente com os hidratos de carbono, sendo os açúcares redutores livres mais rapidamente metabolizados e os polissacarídeos os açúcares de reserva. O glicogénio é o polissacarídeo mais importante na reprodução dos bivalves (Benninger & Lucas, 1984). Este componente é acumulado no músculo adutor e posteriormente convertido em lípidos no processo de produção dos gâmetas (Robinson, 1992; Massapina *et al.*, 1999). De acordo com Gabbott (1976), os lípidos, especialmente os lípidos neutros, representam uma importante reserva de energia por causa do seu elevado valor calórico e são fundamentalmente usados em condições de stress crónico. Os fosfolípidos, também designados por lípidos estruturais, são os lípidos mais importantes no processo de crescimento dos bivalves, uma vez que cumprem um importante papel na formação das membranas celulares. Os lípidos são utilizados também na gametogénese e na desova (Ruiz *et al.*, 1990). As proteínas, o principal componente bioquímico dos organismos, podem ser

sujeitas a transformações metabólicas, contudo este componente não está sujeito a processos de acumulação como os lípidos e os hidratos de carbono. Assim o estudo da composição bioquímica poderá contribuir não só para um melhor conhecimento dos parâmetros condicionantes do sucesso no crescimento, mas igualmente para uma caracterização mais eficiente da condição e qualidade dos organismos (Ruiz *et al.*, 1990). Paralelamente a avaliação do índice de condição permite uma apreciação sobre o estado fisiológico das populações de bivalves e é reconhecido como um útil biomarcador (Mann, 1978; Bressan & Marin, 1985; Fernandez Castro & Vido de Mattio, 1987).

Assim visando avaliar uma possível relação entre os níveis de aneuploidia e crescimento e condição fisiológica de *R. decussatus* foram estabelecidos os seguintes objectivos específicos:

- Determinação dos níveis de aneuploidia de ‘Fast-Growers’, ‘Medium-Growers’ e ‘Slow-Growers’;
- Avaliação da condição fisiológica dos três grupos de indivíduos de *R. decussatus* através da realização do índice de condição;
- Avaliação do valor energético dos bivalves através da análise de diferentes componentes bioquímicos.
- Averiguação da existência de uma potencial relação entre aneuploidia, crescimento e condição fisiológica em *R. decussatus*.

1.2. Material e Métodos

1.2.1. Procedimento Experimental

1.2.1.1. Selecção dos indivíduos

Para a realização dos ensaios foram utilizados juvenis de amêijoia-bola, *R. decussatus* produzidos na maternidade da Estação Experimental de Moluscicultura de Tavira, INRB/L-IPIMAR. Os indivíduos resultaram de uma única postura de dez fêmeas e oito machos induzida em Junho de 2008, a um grupo de reprodutores provenientes da Ria de Aveiro, que se encontrava a acondicionar na maternidade, constituindo assim uma só ‘cohort’. Os juvenis dessa ‘cohort’, foram separados em três grupos e marcados de acordo com o comprimento da concha, por ordem decrescente: 500 indivíduos foram designados por ‘Fast-Growers’ por serem os que apresentaram um tamanho maior, 500 indivíduos denominados por ‘Medium-Growers’ e um número indeterminado de indivíduos, que por apresentarem um tamanho muito reduzido foram designados por ‘Slow-Growers’. O número indeterminado de indivíduos ‘Slow-Growers’ deve-se ao facto dos exemplares possuírem dimensões muito reduzidas, como se pode observar na Figura 1.

A marcação dos juvenis foi efectuada com cor verde, para os ‘Fast-Growers’ e cor vermelha para os ‘Medium-Growers’. Os indivíduos ‘Slow-Growers’ não foram marcados devido ao seu tamanho reduzido e maior número, o que evitava qualquer confusão entre os grupos.

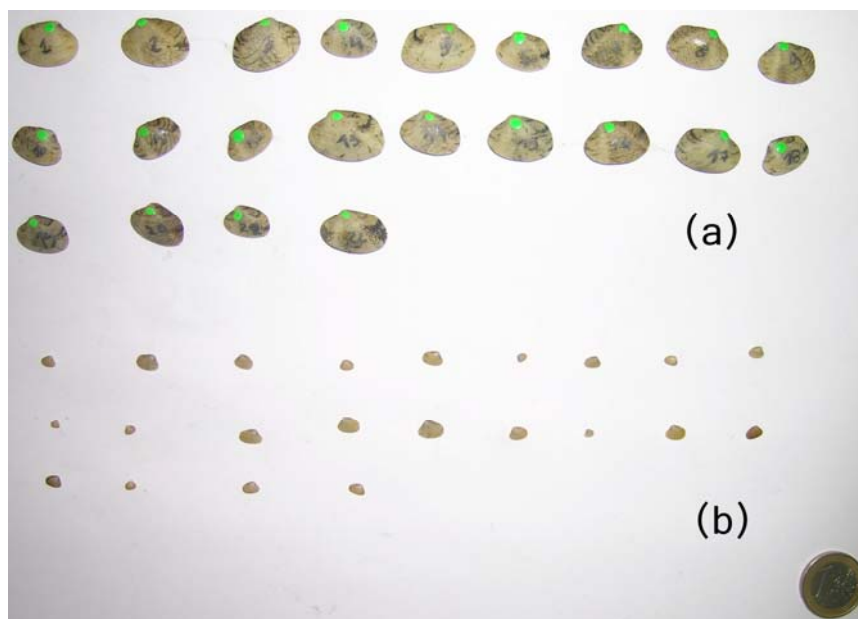


Figura 1- Exemplares de indivíduos da espécie de amêijoia-boia, *R. decussatus*. (a) - ‘Fast-Growers’. (b) - ‘Slow-Growers’.

1.2.1.2. Aclimação dos indivíduos e realização do ensaio

O processo de aclimação dos indivíduos é uma importante etapa, uma vez que proporciona aos organismos as condições adequadas ao seu desenvolvimento, nomeadamente em termos de temperatura, salinidade, pH e alimento. Em invertebrados marinhos, ao contrário das culturas celulares de vertebrados que asseguram uma obtenção regular de mitoses, por norma o índice mitótico é baixo, tornando a obtenção de mitoses dependente da condição do organismo, o que faz com que a observação microscópica exija grande persistência. A aclimação teve como principal objectivo o aumento das divisões celulares, para que apresentassem um bom índice mitótico.

Assim, os juvenis constituintes dos três grupos, devidamente identificados consoante o comprimento, foram colocados num crivo com uma malhagem de 500µm provido de ‘air-lift’ para aerificar a água, num tanque de 80l, com água do mar filtrada a 5µm, a uma temperatura constante de 20°C e salinidade de cerca de 33‰. A renovação total de água foi efectuada 3 vezes por semana (Figura 2).

O alimento foi constituído por uma mistura de algas, *Skeletonema costatum*, *Chaetoceros calcitrans* e *Isochrysis galbana*, em quantidade e qualidade suficiente para satisfazer as necessidades nutricionais dos organismos. A quantidade diária de alimento foi

dividida em três porções fornecidas em três alturas diferentes do dia, de forma a garantir a não formação de pseudo-fezes.

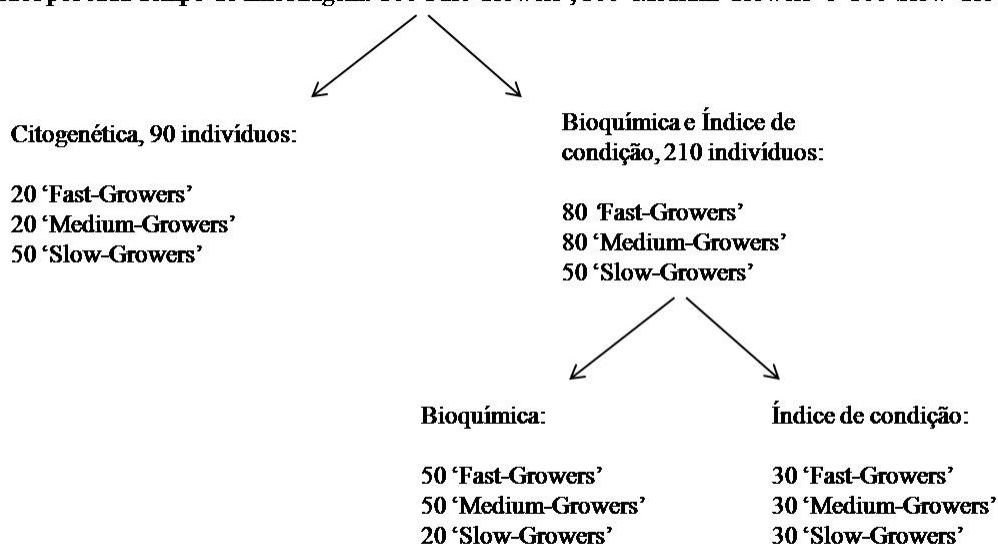


Figura 2- Manutenção dos juvenis de *R. decussatus* em crivo com uma malhagem de 500 μ m provido de ‘air-lift’ para aerificar a água, num tanque de 80L.

1.2.1.3. Amostragem biológica

O ensaio decorreu por um período de 6 meses, com início em Novembro de 2008, e no decurso deste, foram efectuadas amostragens em tempos distintos (T_0 , T_1 e T_2), com um intervalo de cerca de três meses entre cada amostragem. O T_0 corresponde ao dia zero, o T_1 corresponde ao dia 107 e o T_2 corresponde ao dia 199 de amostragem. Este intervalo de tempo entre cada amostragem teve como objectivo estudar a evolução da taxa de aneuploidia, índice de condição e componentes bioquímicos dos indivíduos ao longo do tempo. Em cada amostragem foram analisados cerca de 300 indivíduos, que foram separados consoante a sua análise final, como ilustra o seguinte esquema:

300 indivíduos por cada Tempo de amostragem: 100 'Fast-Growers', 100 'Medium-Growers' e 100 'Slow-Growers'



1.2.2. Procedimento Analítico

1.2.2.1. Caracterização do crescimento

O crescimento dos juvenis foi avaliado tendo por base dois parâmetros biométricos, o comprimento máximo (Figura 3) e o peso vivo. Para avaliação do comprimento foi utilizada uma craveira digital (Mitutoyo 500-311) com precisão a 0,01mm e a determinação do peso vivo foi efectuada com uma balança (METTLER AJ100) de precisão a 0,0001g.

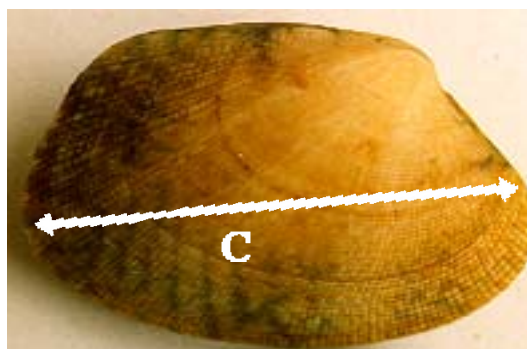


Figura 3- Comprimento máximo (C) (mm): Maior distância no eixo antero-posterior.

Para se conhecer em termos absolutos o crescimento total dos indivíduos, aplicou-se o índice global de crescimento, em comprimento e peso (IcT), que é um índice cumulativo (Rodiles, 2004).

Índice global de crescimento em comprimento e peso:

$$IcT = [(Ln A_t - Ln A_0) / t] \times 100$$

$Ln A_t$ – Logaritmo neperiano do comprimento ou peso médio no tempo t ;

$Ln A_0$ - Logaritmo neperiano do comprimento ou peso médio no tempo 0;

t – Período de tempo em dias decorrido entre o início e o fim da amostragem.

1.2.2.2. Determinação do índice de condição

O índice de condição foi determinado em amostras de 30 indivíduos de cada grupo, ‘Fast-Growers’, ‘Medium-Growers’ e ‘Slow-Growers’, recolhidos de modo aleatório em cada amostragem, nos tempos T_0 , T_1 e T_2 , e congelados.

Os indivíduos foram, previamente descongelados, levando a uma abertura das valvas e, com o auxílio de uma pinça e de um bisturi foi separada a parte edível da concha. A parte edível de cada indivíduo foi colocada em papel absorvente durante alguns minutos e seguidamente foi determinado o peso húmido da carne. O peso seco da carne e da respectiva concha foi determinado após secagem na estufa (ULE 600 Memmert), a 80°C, durante 24 horas. As pesagens foram efectuadas numa balança digital (Mettler AJ100) de precisão a 0,0001g.

O índice de condição indica, de uma forma geral a condição fisiológica dos bivalves e foi expressa pela seguinte fórmula (Walne, 1976):

$$IC = \frac{\text{Peso seco da carne (mg)}}{\text{Peso seco da concha (mg)}} \times 100$$

1.2.2.3. Análise da composição bioquímica e valor energético

Os indivíduos ‘Slow-Growers’ não permitiram uma avaliação individual, devido ao seu baixo conteúdo em carne, pelo que, por uma questão de coerência, efectuou-se um homogeneizado dos vários indivíduos, nos três grupos. Foi assim determinada a composição bioquímica média, em vez da individual.

As várias amostras de 50 indivíduos ‘Fast-Growers’, 50 ‘Medium-Growers’ e 20 ‘Slow-Growers’ dos três diferentes tempos, T₀, T₁ e T₂, foram devidamente etiquetadas e congeladas a -18°C para posterior análise dos teores em proteínas, hidratos de carbono, açúcares redutores livres, polissacarídeos, lípidos totais, lípidos neutros e fosfolípidos. Previamente à sua análise bioquímica, as amostras foram descongeladas e homogeneizadas num homogeneizador de tecidos Ultra-Turrax T25, a fim de se obter uma pasta. Posteriormente todas as amostras foram liofilizadas (Savant) e trituradas com o auxílio de um almofariz.

Procedeu-se ao fraccionamento do liofilizado segundo o procedimento proposto por Holland & Gabbott (1971), modificado, posteriormente por Holland & Hannant (1973).

1.2.2.3.1. Fraccionamento das amostras

Iniciou-se o processo de fraccionamento utilizando amostras de 1 a 2mg de material biológico, previamente liofilizado, ao qual se adicionaram 500µl de água destilada. De forma a obter a ruptura dos tecidos, as amostras foram submetidas a um tratamento de ultra-sons a frio (4°C) mediante um aparelho de ultra-sons, Vibracell Sonics & Materials. Este tratamento consistiu na aplicação de impulsos de 20 watts de potência durante três intervalos de 10 segundos evitando deste modo, o aquecimento e a consequente degradação dos tecidos. Após a homogeneização das amostras, retiraram-se duas sub-amostras de 200µl para dois tubos de ensaio, os quais sofreram diferentes esquemas de extracção.

1.2.2.3.2. Extracção das amostras

Hidratos de Carbono, Açúcares Redutores Livres e Proteínas. Partindo de uma amostra inicial de 200µl, adicionou-se 100µl de ácido tricloroacético (TCA) 15% (P/V) frio e agitou-

se durante 5 minutos. De seguida, arrefeceu-se a amostra a 4°C durante 10 minutos e centrifugou-se a 2500rpm, também durante 10 minutos. Após a centrifugação, recolheu-se o sobrenadante e lavou-se o precipitado com 200µl de TCA 5% (P/V). Por fim, centrifugou-se novamente a 2500rpm durante 10 minutos e misturou-se o lavado com o sobrenadante. Este processo permite precipitar as proteínas, separando-as dos outros componentes bioquímicos.

Sobrenadante. Para a extracção dos hidratos de carbono e dos açúcares redutores livres, retiraram-se duplicados de 100µl do sobrenadante, aos quais se adicionaram 20µl de ácido clorídrico (HCl) 6N. Seguidamente, para os hidratos de carbono, aqueceram-se as amostras durante duas horas a 95°C na estufa. No final das duas horas, arrefeceram-se as amostras em banho de gelo. Os açúcares redutores livres não sofreram este aquecimento. Posteriormente, adicionaram-se 20µl de hidróxido de sódio (NaOH) 6N e 60µl de TCA 5% às amostras, para a determinação de ambos os parâmetros.

Precipitado. A extracção das proteínas foi efectuada no material insolúvel em TCA, ao qual se adicionou 500µl de NaOH 1N, para a sua dissolução através do aquecimento a 56°C durante 30 minutos. Posteriormente procedeu-se à determinação das proteínas.

Lípidos. Partindo de uma amostra inicial de 200µl, adicionaram-se 250µl de clorofórmio e 500µl de metanol. Depois de agitadas durante 1 minuto, as amostras foram a arrefecer a 4°C durante 10 minutos. Centrifugaram-se a 2500rpm durante 10 minutos e recolheu-se o sobrenadante.

Ao sobrenadante adicionaram-se 250µl de clorofórmio, 250µl de água destilada e agitou-se durante 1 minuto. De seguida, eliminou-se a fase superior e secou-se a fase inferior a 100°C durante 15 minutos, após a centrifugação a 2500 rpm durante 10 minutos. Finalmente adicionaram-se 500µl de clorofórmio ao resíduo lipídico. Posteriormente seguiu-se a extracção dos lípidos neutros e a determinação dos lípidos totais.

A partir de 350µl dos lípidos totais, adicionou-se a cada uma das amostras, 500µl de clorofórmio e 10mg de ácido silício activado, pelo menos 2h a 120°C. Seguidamente, colocaram-se as amostras a 4°C durante 15 minutos, durante os quais estas foram agitadas 3

vezes. Centrifugaram-se a 2500rpm durante 10 minutos e recolheu-se o sobrenadante. Posteriormente seguiu-se a determinação dos lípidos neutros.

1.2.2.3.3. Determinação dos componentes bioquímicos

Proteínas. Para a determinação das proteínas foi utilizado um método modificado de Lowry, Rosenbrough, Farr & Randall, (1951).

Para a quantificação das proteínas foram utilizados os reagentes, cuja composição se apresenta de seguida:

Reagente I – 25ml de NaOH 0.8N + 18ml de reagente A + 2ml de reagente B.

Reagente A – 0.2g de disodium tartrate + 10g de carbonato de sódio + 69ml de NaOH 0.8N e perfazer a 100ml com água destilada.

Reagente B – 2g de disodium tartrate + 1g de sulfato de cobre + 12.5ml de NaOH 0.8N e perfazer a 100 ml com água destilada.

Reagente C – reagente de Folin: água destilada (1:2).

Partindo de duas subamostras de 50µl de proteínas, adicionaram-se 450µl de reagente I e 300µl de reagente C. Agitaram-se e foram adicionados mais 300µl de reagente C. Após terem sido agitadas novamente, as amostras foram a incubar durante 45 minutos no escuro. A absorvância mediu-se contra o branco a 750nm num espectrofotómetro Thermo Electron 8USA9 Genesys 6, em ‘cuvettes’ de 10mm. Utilizou-se soroalbumina bovina para a elaboração das rectas de calibração.

Hidratos de carbono e açúcares redutores livres. Na determinação dos hidratos de carbono e dos açúcares redutores livres, utilizou-se uma modificação do método Folin & Malmros, (1929). Adicionaram-se 500µl de NaOH 0.625% (P/V) e 100µl de ferricianeto de potássio 0.2% (P/V). De seguida, adicionaram-se 200µl de reagente carbonato/cianeto (500µl de carbonato de sódio a 16% + 30µl de cianeto de potássio a 5%; perfazer a 10ml com água destilada). As amostras foram aquecidas durante 15 minutos a 95°C e depois arrefecidas. Após o arrefecimento das amostras, adicionou-se 500µl de água destilada. As absorvâncias foram medidas contra o branco a 420nm num espectrofotómetro, em ‘cuvettes’ de 10mm. Utilizou-se glicose como padrão para a elaboração das rectas de calibração.

Polissacarídeos. Os níveis de polissacarídeos foram calculados pela diferença entre os hidratos de carbono e os açúcares redutores livres.

Lípidos totais e lípidos neutros. Os lípidos foram determinados pelo método de Marsh & Weinstein, (1966). As amostras foram colocadas na estufa durante 15 minutos a 100°C para evaporar o solvente (clorofórmio). Adicionaram-se 500µl de ácido sulfúrico (H₂SO₄), agitaram-se os tubos e aqueceram-se a 200°C durante 30 minutos. Após o arrefecimento foi adicionado 1,5ml de água destilada e agitaram-se novamente. Quando as amostras arrefeceram foram determinadas as respectivas absorvâncias contra o branco a 375nm, num espectrofotómetro, em cuvettes de 10mm. Utilizou-se tripalmitina como padrão para a elaboração das rectas de calibração.

Fosfolípidos. O conteúdo em fosfolípidos foi calculado pela diferença entre os lípidos totais e os lípidos neutros.

Matéria orgânica. A matéria orgânica foi calculada pela soma das proteínas, lípidos totais e hidratos de carbono.

Os resultados relativos às proteínas, lípidos totais e hidratos de carbono encontram-se expressos em percentagem de matéria orgânica. Os açúcares redutores livre e os polissacarídeos encontram-se expressos em percentagem de hidratos de carbono e os lípidos neutros e os fosfolípidos em percentagem de lípidos totais.

Os factores de conversão em energia para os lípidos, hidratos de carbono e proteínas foram 35.24, 17.16 e 18.00 KJ g⁻¹, respectivamente (Beukema & De Bruin, 1979).

1.2.2.4. Obtenção das preparações cromossómicas

Os esfregaços cromossómicos obtiveram-se mediante a técnica de suspensão celular de Thiriot-Quévieux & Ayraud (1982), que tem por base as seguintes etapas:

Bloqueio das mitoses em metafase

A colquicina é um alcalóide, que impede a formação do fuso acromático, ligando-se aos dímeros da tubulina, resultando assim na formação de um complexo tubulina-colquicina, induzindo a despolimerização dos microtubulos. Esta interferência provoca o bloqueio temporário da divisão celular e acumulação de células em estado de metafase, antes da separação das cromátides-irmãs. Pelo que, este é o estado que melhor permite a visualização dos cromossomas, devido, igualmente, a um aumento da condensação dos mesmos (Figura 4).

Deste modo, visando o bloqueio das mitoses em metafase, os juvenis de amêijoia-boia, em cada amostragem, foram colocados num pequeno aquário com água do mar aerificada juntamente com uma solução de colquicina a 0,005%, durante a noite, por um período de cerca de oito horas. A fim de incentivar os organismos a filtrar a solução de colquicina, foi adicionada uma porção de alimento constituído pela microalga *I. galbana*. Após este período os indivíduos foram dissecados e retiraram-se as brânquias. (Figura 5)

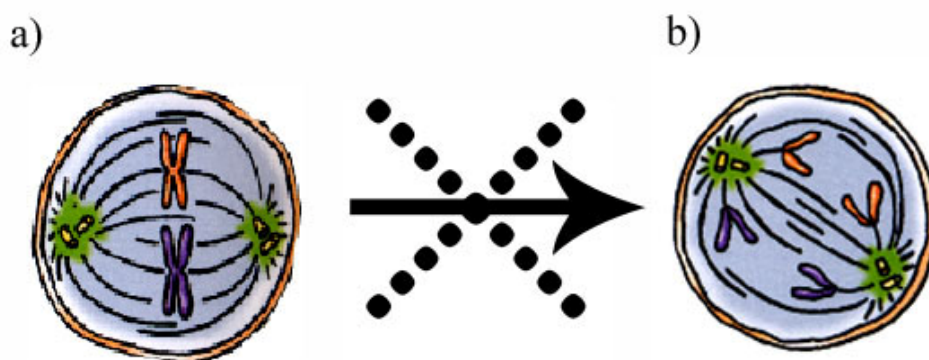


Figura 4- Imagem exemplificativa do efeito da colquicina, em que se induz o bloqueio temporário da divisão celular e acumulação de células em estado de metafase. a) Imagem dos cromossomas, em metafase. b) Separação das cromátides-irmãs em anafase. (Cooper, 2000)

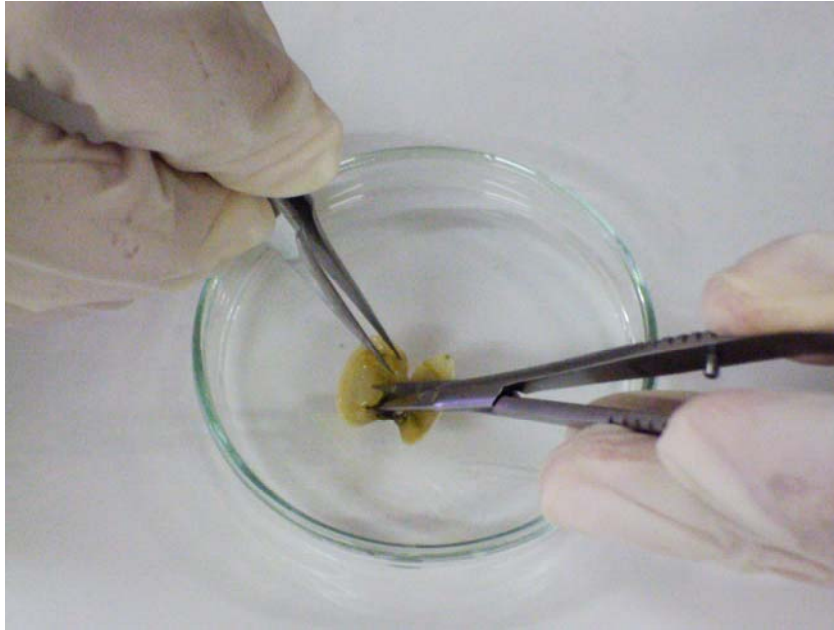


Figura 5- Dissecção e extracção das brânquias de um indivíduo da espécie *R. decussatus*.

Choque hipotónico

O tratamento com uma solução hipotónica tem por finalidade provocar a turgidez das células e uma boa dispersão dos cromossomas. Assim, após a dissecção das brânquias, estas foram colocadas numa solução de citrato de sódio a 0,9%, durante 40 minutos.

Fixação

A fixação tem como função a conservação de todas as estruturas da célula.

As brânquias foram fixadas numa solução de três volumes de etanol para um volume de ácido acético, sendo realizados três banhos sucessivos de 20 minutos cada.

A solução fixadora foi preparada no momento da sua utilização e mantida a uma temperatura de aproximadamente 4°C.

Execução das lâminas

A totalidade da brânquia, ou a sua porção segundo o tamanho, foi colocada numa lâmina escavada com água acidificada, constituída por, água destilada e ácido acético, na proporção de 1:1, durante alguns instantes, facilitando a libertação celular com o auxílio de

pinças. A suspensão celular obtida foi aspirada com uma pipeta Pasteur, sendo depois libertada a uma altura de 30cm, sobre uma lâmina colocada numa placa de aquecimento, previamente aquecida a 44°C (Figura 6). O líquido foi re-aspirado, levando à formação de duas auréolas.



Figura 6- Execução das lâminas segundo a técnica de suspensão celular de Thiriot-Quévieux & Ayraud (1982).

Coloração

A coloração com o corante Giemsa é a mais utilizada para a obtenção de cariótipos standard, uma vez que permite uma boa observação da morfologia dos cromossomas. As preparações cromossómicas foram coradas com uma solução Giemsa composta por 4 ml do corante juntamente com 4 ml de tampão fosfato (pH 6,8) e 92 ml de água destilada, durante cerca de 20 minutos, deixando-se secar ao ar.

1.2.2.5. Observação das lâminas e microfotografias

Procedeu-se à observação das lâminas num microscópio óptico Nikon Eclipse 80i com câmara de aquisição de imagem incorporada Nikon DS-Fi1 (Figura 7). As metafases aparentemente intactas e bem espalhadas foram seleccionadas e fotografadas. Posteriormente

as imagens foram tratadas na sua totalidade, no ‘software’ Adobe Photoshop 6.0, para uma melhor visualização e contagem dos cromossomas.

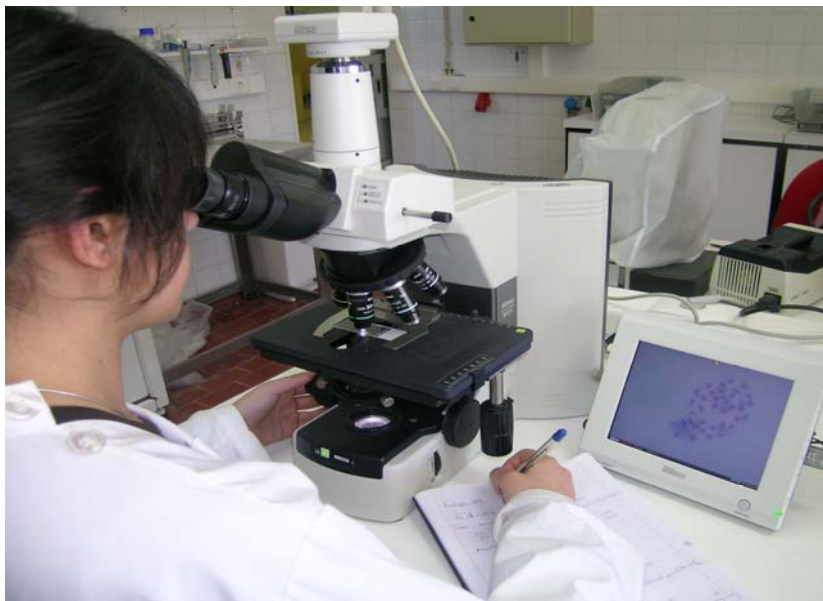


Figura 7- Observação das lâminas ao microscópio óptico com câmara de aquisição de imagem incorporada.

1.2.2.6. Determinação da taxa de aneuploidia

A determinação da taxa de aneuploidia foi efectuada através do número total de metafases aneuploides, sobre o número total de metafases contadas por animal. A média ponderada de cada animal deu-nos a percentagem final de aneuploidia para cada grupo de indivíduos, ‘Fast-Growers’, ‘Medium-Growers’ e ‘Slow-Growers’, ao longo do tempo. Neste estudo a contagem cromossómica de todos os indivíduos e nas várias amostragens, foi sempre efectuada pelo mesmo observador, de modo a eliminar a subjectividade inerente a diferentes observadores, na futura interpretação dos resultados. Foram consideradas aneuploides as células que apresentam $2n=34$, 35 , 36 ou 37 . Relembra-se que o número diplóide desta espécie é $2n=38$.

1.2.3. Tratamento estatístico

No sentido de identificar os indivíduos que, pelo seu comprimento não se enquadravam no grupo primeiramente inserido, foi realizado o reconhecimento dos ‘outliers’, ou indivíduos contaminantes. Para tal foi usado o ‘software’ Microsoft Office Excel 2007 através de um gráfico de Boxplot, partindo das estatísticas para o conjunto de dados: 1º quartil, mínimo, mediana, máximo e 3º quartil, sendo que, os valores de comprimento do grupo inferior que ultrapassaram o 1º quartil do grupo superior foram repostos neste e os valores do grupo superior que ultrapassaram o 3º quartil do grupo inferior foram repostos igualmente neste último.

A comparação entre médias dos vários grupos e das diferentes datas de amostragem, para os parâmetros estudados, foi efectuada através de análise de variância (ANOVA) e do teste de Kruskal-Wallis. As diferenças significativas foram verificadas para um nível de significância de 5%.

Nos dados expressos em percentagem a comparação estatística foi efectuada após a transformação arcoseno $\sqrt{}$ (Snedcor & Cochran, 1980).

A análise de variância ANOVA foi utilizada após verificação dos seus pressupostos:

- Homogeneidade de variâncias através do teste de Cochran (Winer *et al.*, 1991);
- Normalidade através do teste Kolmogorov-Smirnov.

Os resultados significativamente diferentes foram sujeitos ao teste de comparações múltiplas de Tukey.

Sempre que os pressupostos para a aplicação da ANOVA não se verificaram, procedeu-se à transformação dos dados para a estabilização das variâncias e normalidade.

O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi utilizado sempre que a transformação não permitiu normalizar os dados. Os resultados significativamente diferentes foram sujeitos ao teste não paramétrico de comparações múltiplas de Dunn’s (Zar, 1984). O ‘software’ usado para o tratamento estatístico referido foi o Sigma-Stat[®] para o Windows (Jandel, 1994).

No sentido de avaliar a relação entre os parâmetros estudados, foi realizado um teste de Análise em Componentes Principais, ACP, através do programa MATLAB[®] ‘The

language of technical computing', versão 7.1, 2005. A ACP, é um dos métodos estatísticos mais usados quando se pretendem analisar dados multivariados. Ela permite transformar um conjunto de variáveis originais, intercorrelacionadas, num novo conjunto de variáveis não correlacionadas, as componentes principais. O objectivo mais imediato da ACP é verificar se existe um pequeno número das primeiras componentes principais que seja responsável por explicar uma proporção elevada da variação total associada ao conjunto original.

Por último, e também com o objectivo de avaliar a relação entre os parâmetros estudados, foi realizado o coeficiente de correlação paramétrico de Pearson. Admitindo-se uma distribuição normal e no caso da dependência entre parâmetros, o coeficiente de correlação é uma medida da intensidade da ligação entre duas variáveis, mais propriamente, da aproximação de uma relação linear. Deste modo, calcularam-se os coeficientes de correlação entre os diferentes parâmetros e determinaram-se os níveis de significância das relações encontradas, através de uma tabela de coeficiente de correlação.

Sendo um dos principais objectivos deste trabalho, encontrar relações significativas entre os vários parâmetros estudados, das relações encontradas, as que apresentaram ligação com um intervalo de confiança superior a 95% ($p < 0,05$) e revelaram interesse biológico, foram representadas sobre o modelo estatístico de regressão linear.

Ao contrário da correlação, onde existe simetria, a relação linear é um modelo estatístico que tem como objectivo quantificar a relação algébrica, apresentada pela equação da recta de regressão, de uma quantidade y em função de uma quantidade x . Quando esta relação entre parâmetros não apresenta uma influência importante, a recta de regressão de y em x apresenta-se paralela ao eixo do xx (Schwartz, 1984).

1.3. Resultados

1.3.1. Crescimento

O crescimento médio em comprimento e peso dos três grupos de juvenis de amêijoia-boia encontra-se representado nas Figuras 8 e 9. De um modo geral, registou-se um aumento do tamanho em comprimento e peso, durante o período experimental, excepto nos ‘Slow-Growers’ entre T₁, 107º dia de cultura e T₂, 199º dia de cultura, facto que é corroborado pelas taxas de crescimento em comprimento e peso que se encontram representadas na Tabela I. O crescimento em comprimento e peso apresentou diferenças significativas entre os grupos de indivíduos estudados ($p \leq 0,001$) e diferenças significativas entre datas de amostragem ($p \leq 0,001$).

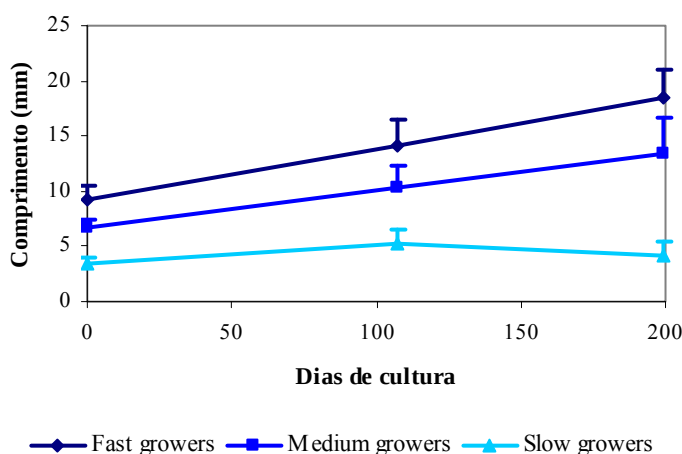


Figura 8- Variação dos valores médios ($\pm\sigma$) do comprimento (mm) dos três grupos de juvenis de *R. decussatus*, ao longo do período experimental.

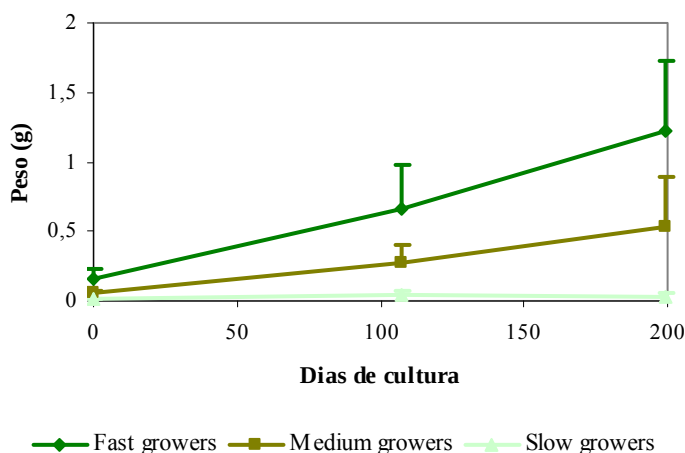


Figura 9- Variação dos valores médios ($\pm\sigma$) do peso (g) dos três grupos de juvenis de *R. decussatus*, ao longo do período experimental.

Tabela I- Índice Global de Crescimento em comprimento e peso dos três grupos de juvenis de *R. decussatus*, ao longo do período experimental.

	Índice Global de Crescimento (IcT)	
	Comprimento	Peso
‘Fast-Growers’	0,35	1,05
‘Medium-Growers’	0,35	1,14
‘Slow-Growers’	0,10	0,63

1.3.2. Índice de Condição

A variação do índice de condição ao longo do período experimental encontra-se apresentada na Figura 10.

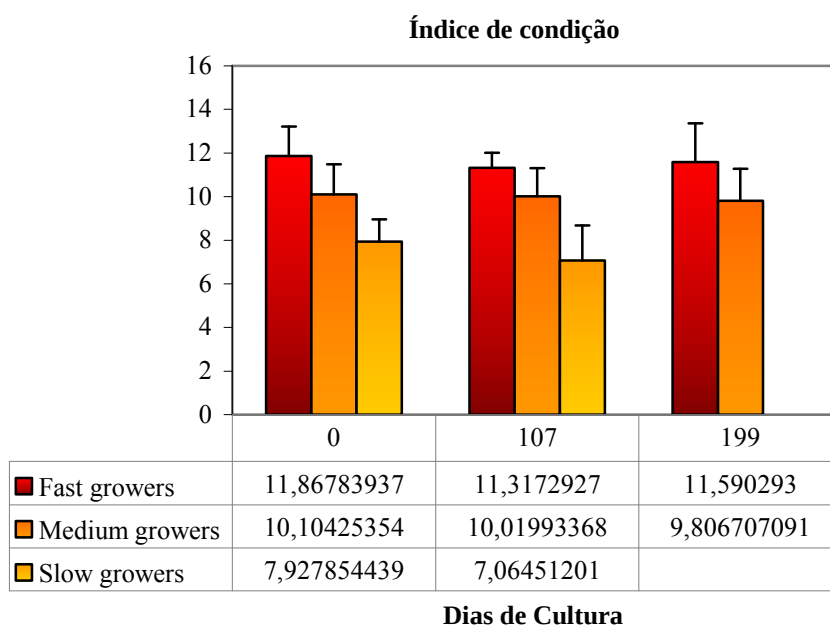


Figura 10- Variação dos valores médios ($\pm\sigma$) do índice de condição dos três grupos de juvenis de *R. decussatus*, ao longo do período experimental.

A análise da Figura 10 evidencia a existência de diferenças significativas entre grupos ($p < 0,001$), ou seja, entre ‘Fast-Growers’, ‘Medium-Growers’ e ‘Slow-Growers’, contudo as diferenças ao longo do tempo foram menos relevantes. No entanto, e relativamente

aos ‘Fast-Growers’ a maior variação ocorreu entre T_0 ($11,87 \pm 1,345$) e T_1 ($11,32 \pm 0,69$), não se verificando uma alteração notável entre T_0 e T_2 ($11,59 \pm 1,76$) e entre T_1 e T_2 . No que se refere aos ‘Medium-Growers’ os valores de índice de condição apresentaram-se praticamente constantes ao longo do tempo, com os valores médios a variarem entre $9,81 \pm 1,47$ e $10,10 \pm 1,38$. Em relação aos ‘Slow-Growers’ registou-se um pequeno decréscimo entre T_0 ($7,93 \pm 1,04$) e T_1 ($7,06 \pm 1,62$). Infelizmente não nos foi permitido tirar nenhuma conclusão em relação ao T_2 , visto não ter sido possível avaliar o índice de condição neste grupo. A justificação para este facto é o elevado nível de mortalidade que os ‘Slow-Growers’ sofreram entre T_1 e T_2 , o que impediu a obtenção de indivíduos para a análise deste parâmetro.

1.3.3. Composição Bioquímica

Os resultados das percentagens de proteínas, hidratos de carbono e lípidos totais em relação ao total de matéria orgânica encontram-se representados na Figura 11.

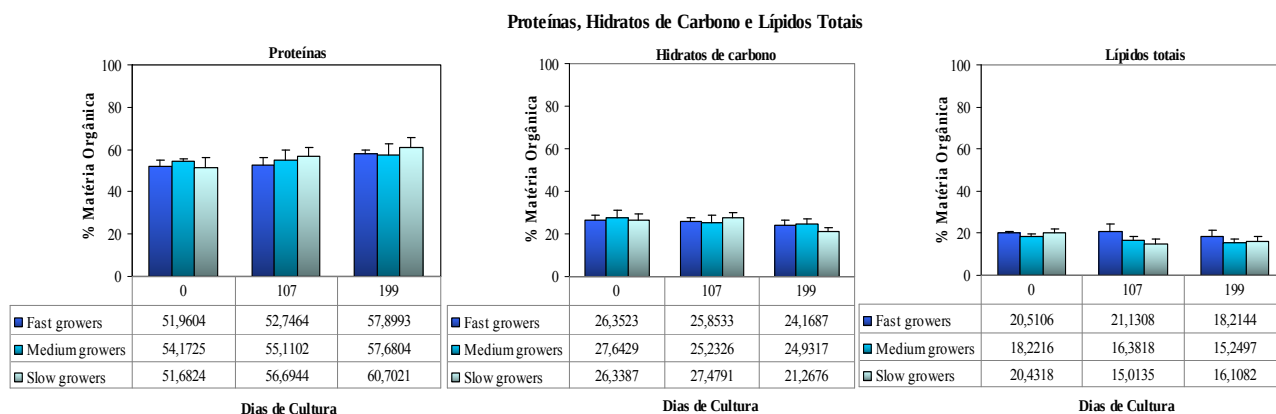


Figura 11- Variação média ($\pm\sigma$) dos valores percentuais de proteínas, hidratos de carbono e lípidos totais dos juvenis de amêijoia-boia *R. decussatus* em relação ao total de matéria orgânica.

A análise da figura mostra que a percentagem de proteínas em relação ao total da matéria orgânica aumentou ao longo do período experimental, em todos os grupos, sendo os ‘Slow-Growers’, o grupo que apresentou uma maior variação.

As proteínas variaram entre $51,96 \pm 3,11$, $54,17 \pm 1,41$ e $51,68 \pm 4,65$ % de matéria orgânica no T_0 e $57,90 \pm 2,06$, $57,68 \pm 5,20$ e $60,70 \pm 4,73$ % de matéria orgânica no T_2 , nos ‘Fast-Growers’, ‘Medium-Growers’ e ‘Slow-Growers’, respectivamente. Não se verificou a existência de diferenças significativas entre grupos ($p=0,259$), apenas foram registadas

diferenças entre os tempos T_2 e T_0 , e T_2 e T_1 ($p < 0,05$), sem que houvesse interacção entre os grupos e o tempo ($p = 0,448$).

Em relação aos hidratos de carbono, verificou-se um ligeiro decréscimo ao longo do período experimental, em todos os grupos, excepto nos ‘Slow-Growers’, onde se verificou um ligeiro aumento entre T_0 e T_1 seguido de um decréscimo no T_2 . Nos ‘Fast-Growers’, a percentagem de hidratos de carbono em relação à matéria orgânica variou entre $24,17 \pm 2,37$ no T_2 e $26,35 \pm 2,73$ no T_0 . Nos ‘Medium-Growers’ a amplitude de variação foi entre $24,93 \pm 2,23$ no T_2 e $27,64 \pm 3,57$ % de matéria orgânica no T_0 . Finalmente nos ‘Slow-Growers’, os valores encontram-se entre $21,27 \pm 1,91$ no T_2 e $27,48 \pm 2,59$ % de matéria orgânica no T_1 . Estatisticamente, apenas foram encontradas diferenças significativas entre os tempos: T_2 difere de T_1 e de T_0 ($p < 0,05$), sem que houvesse interacção entre os grupos e o tempo ($p = 0,094$).

Relativamente aos lípidos totais, nos ‘Fast-Growers’, os valores percentuais em relação à matéria orgânica encontraram-se entre $18,21 \pm 3,05$ no T_2 e $21,13 \pm 3,31$ no T_1 . Nos ‘Medium growers’, a amplitude de valores encontram-se entre $15,25 \pm 0,95$ no T_2 e $18,22 \pm 3,48$ % de matéria orgânica no T_0 . Finalmente nos ‘Slow-Growers’, os valores variaram entre $15,01 \pm 1,97$ no T_1 e $20,43 \pm 1,70$ % de matéria orgânica no T_0 . Estatisticamente, foram encontradas diferenças significativas entre grupos ($p = 0,014$), sendo os ‘Fast-Growers’ estatisticamente diferentes dos ‘Medium-Growers’ e dos ‘Slow-Growers’ ($p < 0,05$) e entre tempos de amostragem ($p < 0,05$), com T_0 a diferir de T_2 ($p < 0,05$). Contudo as diferenças entre grupos não dependem do tempo, pois não há uma interacção estatisticamente significativa entre eles ($p = 0,282$).

A variação da percentagem de lípidos neutros e fosfolípidos em relação à percentagem de lípidos totais encontra-se representada na Figura 12.

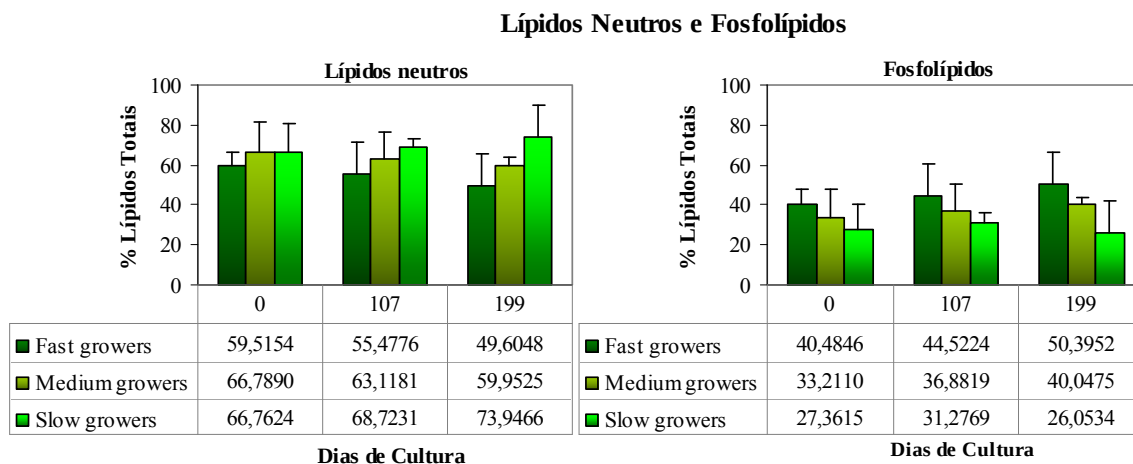


Figura 12- Variação média ($\pm\sigma$) dos valores percentuais de lípidos neutros e fosfolípidos dos juvenis de amêijoia-boia *R. decussatus* em relação ao conteúdo em lípidos totais.

Os lípidos neutros decresceram ao longo do tempo para os Fast-Growers' e 'Medium-Growers' variando entre $49,60 \pm 16,15$ e $59,95 \pm 3,56$ no T_2 e $59,51 \pm 7,03$ e $66,79 \pm 15,04\%$ de lípidos totais no T_0 , respectivamente. Inversamente, os 'Slow-Growers' apresentaram os valores percentuais mais baixos de lípidos neutros no T_0 ($66,76 \pm 13,62\%$ de lípidos totais) e os mais elevados, no T_2 ($73,95 \pm 16,06\%$ de lípidos totais). Contudo, no caso dos lípidos neutros, estatisticamente, não se registaram diferenças significativas entre grupos ($p=0,069$) nem entre tempos ($p=0,898$), não ocorrendo também nenhuma interação entre os dois parâmetros ($p=0,771$).

Relativamente aos fosfolípidos, este parâmetro teve um comportamento inverso aos verificados nos lípidos neutros para os grupos Fast-Growers' e 'Medium-Growers', aumentando ao longo do período experimental; os valores percentuais mínimos foram registados no T_0 ($40,48 \pm 7,03$ e $33,21 \pm 15,04\%$ de lípidos totais, respectivamente) e os máximos no T_2 ($50,39 \pm 16,15$ e $40,05 \pm 3,56\%$ de lípidos totais, respectivamente). O mesmo não aconteceu com os 'Slow-Growers', cujas percentagens encontram-se entre $26,05 \pm 16,06$ no T_2 e $31,28 \pm 4,63\%$ de lípidos totais no T_1 . No caso dos fosfolípidos não existiram igualmente diferenças significativas entre grupos ($p=0,069$) nem entre tempos ($p=0,898$), não ocorrendo também nenhuma interação entre os dois parâmetros ($p=0,771$).

É de realçar que a relação entre lípidos neutros e fosfolípidos foi diferente entre os grupos. Nos ‘Fast-Growers’ a diferença entre estes dois componentes foi menor do que nos ‘Medium-Growers’ e do que nos ‘Slow-Growers’. Os lípidos neutros estavam quase sempre em maior quantidade do que os fosfolípidos, à excepção dos ‘Fast-Growers’ no T₂, onde se observou um ligeiro aumento dos fosfolípidos, $50,39 \pm 16,15$ % dos lípidos totais em relação aos lípidos neutros ($49,60 \pm 16,15$ % dos lípidos totais).

A variação da percentagem de açúcares redutores livres e polissacarídeos em relação ao total de hidratos de carbono encontra-se representado na Figura 13.

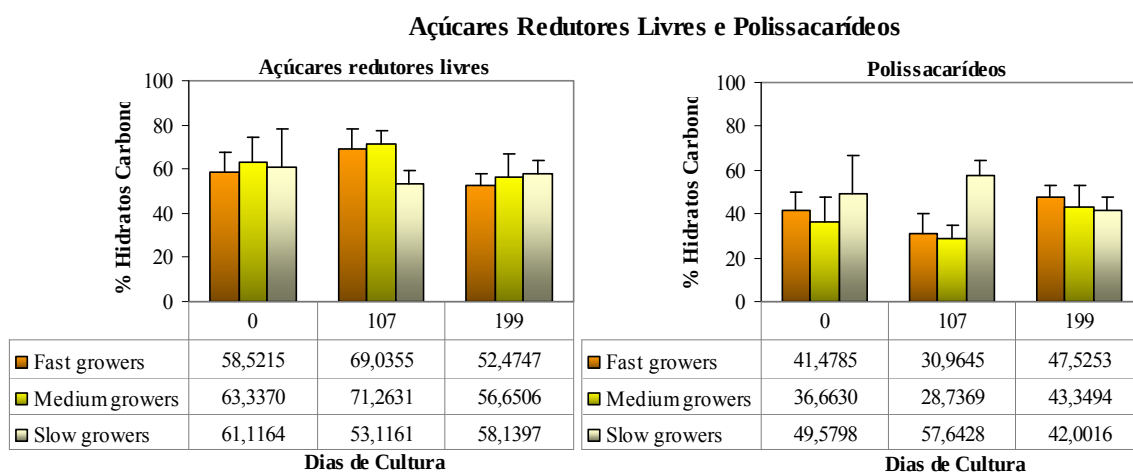


Figura 13- Variação média ($\pm\sigma$) dos valores percentuais de açúcares redutores livres e polissacarídeos dos juvenis de amêijoia-boia *R. decussatus* em relação ao conteúdo em hidratos de carbono.

Os açúcares redutores livres dos ‘Fast-Growers’ e dos ‘Medium-Growers’ variaram da mesma forma ao longo do período experimental, distinguindo-se dos ‘Slow-Growers’. Nos ‘Fast-Growers’, a percentagem de açúcares redutores livres relativamente ao total de hidratos de carbono variou entre $52,47 \pm 5,43$ no T₂ e $69,03 \pm 9,20$ % de hidratos carbono no T₁ e nos ‘Medium-Growers’, entre $56,65 \pm 10,02$ no T₂ e $71,26 \pm 6,39$ % de hidratos carbono no T₁. Nos ‘Slow-Growers’, os açúcares redutores livres variaram entre $53,12 \pm 6,61$ % no T₁ e $61,11 \pm 16,85$ % de hidratos de carbono no T₀. No entanto, não se observaram diferenças significativas entre grupos ($p=0,148$), porém foram registadas diferenças entre os tempos T₂ e T₁ ($p<0,05$) e uma interacção estatisticamente significativa entre eles ($p<0,05$). Dentro dos ‘Fast-Growers’ e dos ‘Medium-Growers’ detectaram-se diferenças entre T₁ e T₂ ($p<0,05$), ao

contrário do que sucedeu nos ‘Slow-Growers’ onde não se detectaram diferenças entre tempos.

Os polissacarídeos, apresentaram uma variação inversa aos açúcares redutores livres, ao longo do período experimental, sendo que, também neste componente bioquímico, os ‘Fast-Growers’ e os ‘Medium-Growers’ apresentaram o mesmo padrão, distinguindo-se dos ‘Slow-Growers’. Nos ‘Fast-Growers’, os valores percentuais variaram entre $30,96 \pm 9,20$ no T_1 e $47,52 \pm 5,43\%$ de hidratos carbono no T_2 , nos ‘Medium-Growers’, o range de variação foi entre $28,74 \pm 6,39$ no T_1 e $43,35 \pm 10,02\%$ de hidratos carbono no T_2 e, finalmente nos ‘Slow-Growers’, os valores percentuais variaram entre $38,88 \pm 16,85$ no T_0 e $46,88 \pm 6,61\%$ de hidratos carbono no T_1 . À semelhança do que ocorreu com os açúcares redutores livres, não foram registadas diferenças significativas entre grupos ($p=0,148$), porém foram registadas diferenças entre os tempos T_2 e T_1 ($p<0,05$) e uma interacção estatisticamente significativa entre eles ($p=0,039$). Dentro dos ‘Fast-Growers’ e dos ‘Medium-Growers’ detectaram-se diferenças entre T_1 e T_2 ($p<0,05$), ao contrário do que sucedeu nos ‘Slow-Growers’ onde não se detectaram diferenças significativas entre tempos.

O resultado da energia total para os diferentes grupos, ao longo do tempo, encontra-se representado na Figura 14.

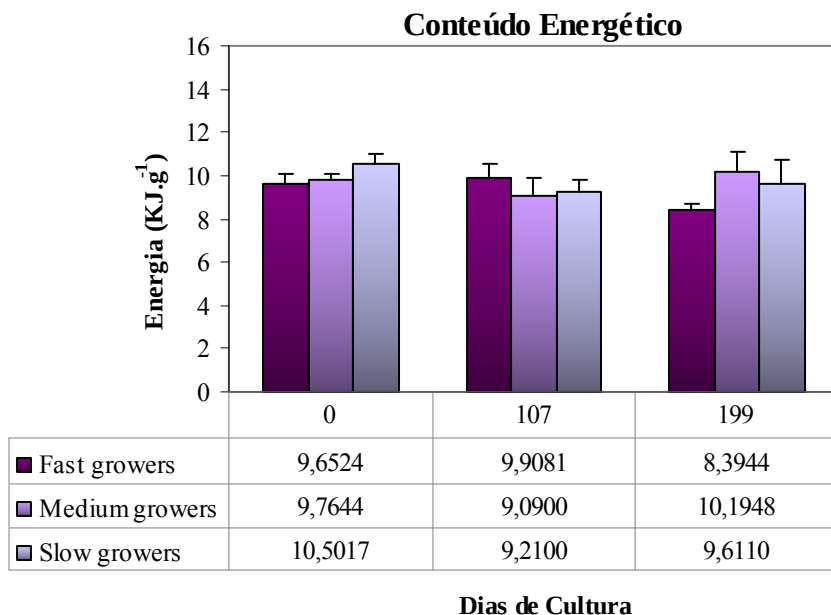


Figura 14- Variação média ($\pm\sigma$) da energia total (KJ.g^{-1}) dos juvenis de amêijoia-boia *R. decussatus*.

O conteúdo energético total manteve-se praticamente constante ao longo do período experimental. Nos ‘Fast-Growers’, os valores registados variaram entre $8,39 \pm 0,30$ no T_2 e $9,91 \pm 0,62 \text{ KJ.g}^{-1}$ no T_1 . Nos ‘Medium-Growers’, os valores de energia oscilaram entre $9,09 \pm 0,80$ no T_1 e $10,19 \pm 0,93 \text{ KJ.g}^{-1}$ no T_2 , enquanto nos ‘Slow-Growers’, variaram entre $9,21 \pm 0,62$ no T_1 e $10,50 \pm 0,54 \text{ KJ.g}^{-1}$ no T_0 . Apesar de não se terem registado diferenças significativas, quer entre grupos quer entre tempos de amostragem, observou-se a existência de uma interacção estatisticamente significativa entre eles ($p=0,028$), sendo essa interacção registada entre T_1 e T_2 , nos ‘Fast-Growers’ ($p<0,05$).

1.3.4. Aneuploidia

A contagem das várias metafases observadas permitiu a confirmação do número diplóide $2n=38$ previamente estabelecido para esta espécie (Paterson review, 1969; Gerard, 1978). Foi encontrado, no entanto, um grande número de metafases aneuploides.

Na Figura 15 encontram-se vários exemplos de metafases de *R. decussatus*, com um número cromossómico diverso, desde $2n=38$ a $2n=34$.

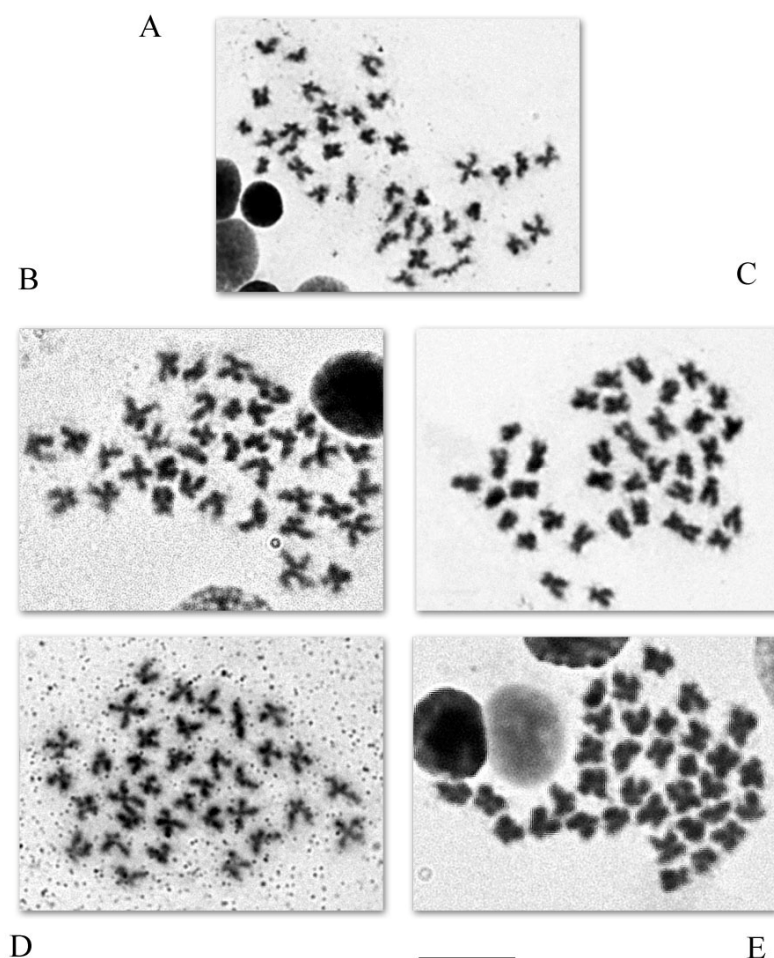


Figura 15- Exemplos de metafases de *R. decussatus*. A- $2n=38$; B- $2n=37$; C- $2n=36$; D- $2n=35$; E- $2n=34$. Barra de escala = $5\mu m$.

As tabelas abaixo apresentadas, contêm as medições biométricas e as percentagens médias finais dos resultados da estimação da taxa de aneuploidia efectuada nos três diferentes grupos de indivíduos, para cada tempo distinto, T_0 , T_1 e T_2 .

Estes resultados foram obtidos a partir da determinação em cerca de 20 indivíduos ‘Fast-Growers’, 20 indivíduos ‘Medium-Growers’ e 50 indivíduos ‘Slow-Growers’,

implicando a observação e ‘screening’ de 413 preparações microscópicas com um total de 1763 metafases analisadas (Tabelas A.I, A.II e A.III- Apêndice).

Tabela II- Medições biométricas e percentagens finais de aneuploidia dos indivíduos ‘Fast-Growers’, ‘Medium-Growers’ e ‘Slow-Growers’ em T₀.

Grupo	Peso médio (g)	Comprimento médio (mm)	% Aneuploidia
‘Fast-Growers’	0,16	9,57	19,69
‘Medium-Growers’	0,05	6,58	42,56
‘Slow-Growers’	0,01	3,36	78,69

Tabela III- Medições biométricas e percentagens finais de aneuploidia dos indivíduos ‘Fast-Growers’, ‘Medium-Growers’ e ‘Slow-Growers’ em T₁.

Grupo	Peso médio (g)	Comprimento médio (mm)	% Aneuploidia
‘Fast-Growers’	1,12	17,55	18,71
‘Medium-Growers’	0,36	11,53	31,25
‘Slow-Growers’	0,05	5,70	56,14

Tabela IV- Medições biométricas e percentagens finais de aneuploidia dos indivíduos ‘Fast-Growers’, ‘Medium-Growers’ e ‘Slow-Growers’ em T₂.

Grupo	Peso médio (g)	Comprimento médio (mm)	% Aneuploidia
‘Fast-Growers’	1,34	18,32	20,60
‘Medium-Growers’	0,54	13,05	37,5
‘Slow-Growers’	0,03	4,27	41,38

As médias finais da taxa de aneuploidia no tempo T₀ foram de 19,69%, 42,56% e de 78,69% para os ‘Fast-Growers’, ‘Medium-Growers’ e ‘Slow-Growers’, respectivamente. Em T₁ foram de 18,71%, 31,25% e de 56,14% para os ‘Fast-Growers’, ‘Medium-Growers’ e ‘Slow-Growers’, respectivamente. Finalmente, em T₂ foram de 20,60% para os ‘Fast-

Growers’, 37,5% para os ‘Medium-Growers’ e de 41,38% para os ‘Slow-Growers’. Verificou-se então que a percentagem de aneuploidia foi sempre substancialmente maior nos indivíduos que apresentaram o menor crescimento, ao longo de todo o período experimental.

Verificou-se que, no geral, existiam diferenças significativas entre grupos ($p < 0,001$), confirmando-se de seguida que existiam diferenças significativas entre todos, ‘Fast-Growers’, ‘Medium-Growers’ e ‘Slow-Growers’ ($p < 0,05$).

Posteriormente, observou-se que, no geral, em relação ao tempo, não existiram diferenças significativas ($p = 0,091$) entre a taxa da aneuploidia.

Em cada grupo de indivíduos, verificou-se que tanto para os ‘Fast-Growers’ ($p = 0,975$), como para os ‘Medium-Growers’ ($p = 0,204$) não se observaram diferenças significativas ao longo do tempo. Em relação aos ‘Slow-Growers’, observaram-se diferenças ao longo do tempo ($p = 0,005$) sendo o T_0 e o T_2 ($p < 0,05$) significativamente diferentes.

Em cada tempo de amostragem, verificou-se que tanto para o T_0 , como para o T_1 existem diferenças significativas entre grupos. Estas diferenças foram detectadas entre ‘Slow-Growers’ e ‘Fast-Growers’ e entre ‘Slow-Growers’ e ‘Medium-Growers’ ($p < 0,05$) para ambos os tempos. Em relação ao T_2 verificou-se que não existiam diferenças significativas entre grupos ($p = 0,191$).

1.3.5. Relação entre parâmetros

Na Figura 16, encontra-se a representação de ACP onde é possível observar se existem determinados parâmetros que sejam responsáveis por explicar uma proporção elevada da variação total associada ao conjunto original.

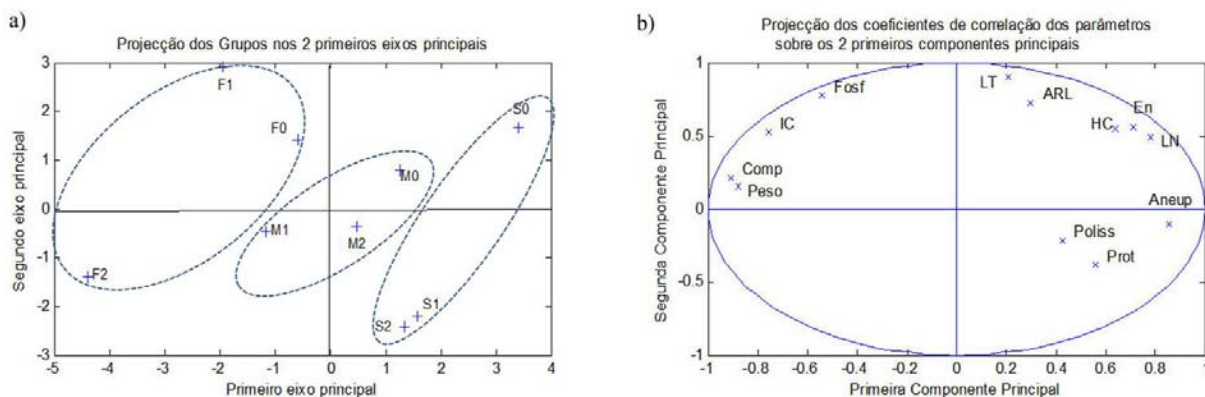


Figura 16- Esquema da relação entre os parâmetros estudados (ACP). a) Projectão de grupos. b) Projectão de parâmetros.

F0- 'Fast-Growers' em T₀; F1- 'Fast-Growers' em T₁; F2- 'Fast-Growers' em T₂; M0- 'Medium-Growers' em T₀; M1- 'Medium-Growers' em T₁; M2- 'Medium-Growers' em T₂; S0- 'Slow-growers' em T₀; S1- 'Slow-Growers' em T₁; S2- 'Slow-Growers' em T₂; Comp- Comprimento; IC- Índice de condição; Fosf- Fosfolípidos; LT- Lípidos Totais; ARL- Açúcares Redutores Livres; En- Energia; HC- Hidratos de Carbono; LN- Lípidos Neutros; Aneup- Aneuploidia; Poliss- Polissacarídeos; Prot- Proteínas.

Através da análise da Figura 16a foi possível observar que independentemente do tempo a que pertencem, os grupos foram claramente separados em 'Fast-Growers', 'Medium-Growers' e 'Slow-Growers', em especial ao longo do primeiro eixo principal.

É de realçar que, o primeiro eixo principal diferencia claramente os grupos, apresentando os indivíduos Fast-Growers em T₂ mais à esquerda em relação aos restantes. O segundo eixo principal discrimina os tempos de amostragem dentro dos grupos, como se pode observar na parte superior, onde se encontram todos os tempos de amostragem em T₀, juntamente com os indivíduos Fast-Growers em T₁, ficando os restantes na parte inferior. Relacionando estes dados com a Figura 16b, podemos assim depreender que, por exemplo, à medida que o tempo decorre, os indivíduos possuem menos quantidade de lípidos totais.

A Figura 16b representa a projecção dos coeficientes de correlação dos parâmetros estudados sobre os dois primeiros componentes principais, como tal observa-se que os parâmetros que possuem um maior peso nos resultados deste estudo foram o comprimento, o peso e a taxa de aneuploidia, pois possuem uma maior correlação com a primeira componente

principal. Através da posição destes parâmetros na Figura de projecção de parâmetros, observou-se que tanto o comprimento como o peso e o índice de condição estão negativamente relacionados com a taxa de aneuploidia. Em relação aos lípidos neutros verificou-se que estão negativamente correlacionados com o comprimento e o peso, porém encontram-se correlacionados de forma positiva, com o valor energético.

A Figura 17 representa as relações mais significativas encontradas a partir dos resultados da Correlação de Pearson, através das rectas de regressão linear. Os coeficientes de correlação e os respectivos níveis de significância estão representados na Tabela A.V-Apêndice.

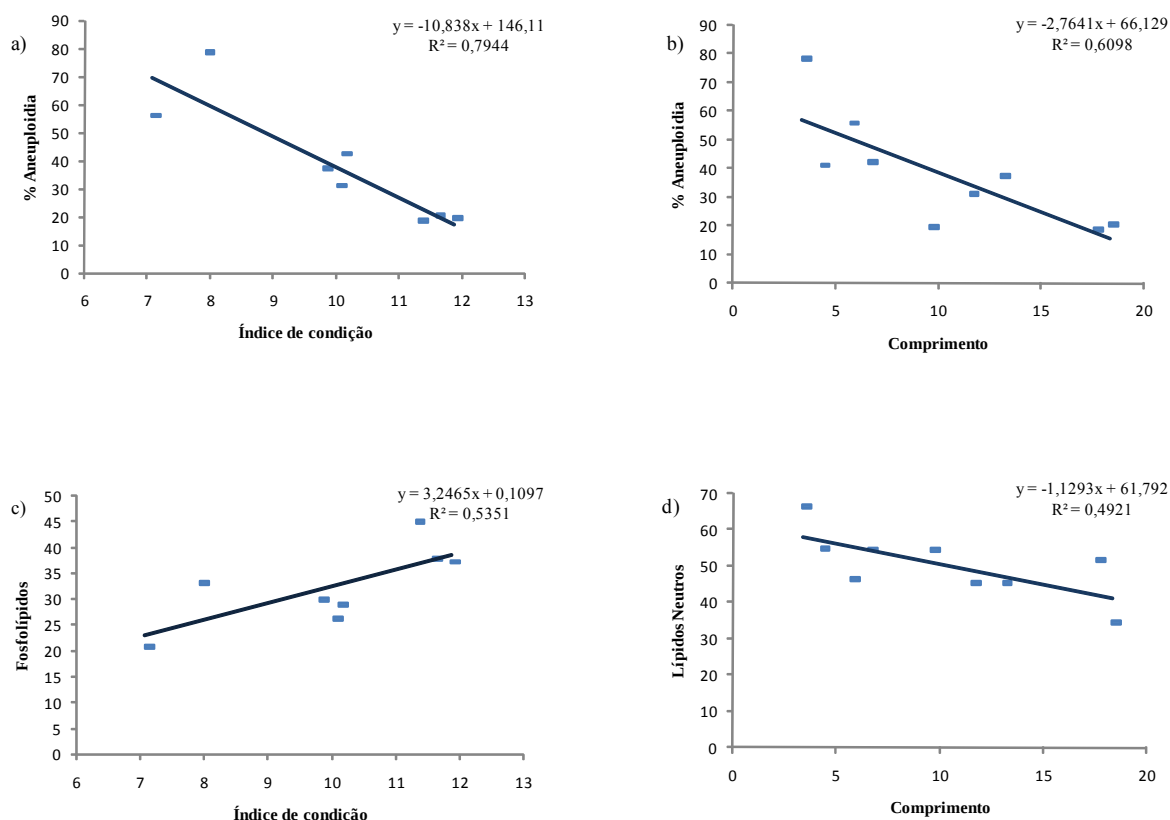


Figura 17- Rectas de regressão de a) Taxa de Aneuploidia (%) em função do Índice de Condição, b) Taxa de Aneuploidia em função do Comprimento, c) Fosfolípidos em função do Índice de Condição e d) Lípidos Neutros em função do Comprimento.

Através da análise da Figura 17, verifica-se que a taxa de aneuploidia correlaciona-se negativamente com o índice de condição, assim como com o comprimento ($0,01 < p < 0,05$).

Em relação aos fosfolípidos, estes correlacionam-se positivamente com o índice de condição, ao contrário dos lípidos neutros que se correlacionam negativamente com o comprimento ($0,01 < p < 0,05$).

Apesar de não estar representado graficamente, é também importante realçar a forte correlação positiva entre o comprimento e o peso, entre os lípidos neutros e o valor energético e entre os fosfolípidos e o comprimento ($p < 0,01$) (Tabela A.V- Apêndice).

1.4. Discussão

A análise dos dados obtidos neste trabalho foi realizada de acordo com os objectivos propostos na introdução, ou seja, a averiguação da existência, em *R. decussatus*, de uma potencial relação entre a taxa de aneuploidia, o crescimento e a condição fisiológica.

1.4.1. Crescimento

O crescimento dos moluscos bivalves é condicionado por factores internos, como genéticos e metabólicos e externos, como a temperatura e a disponibilidade de alimento (Laing *et al.*, 1987).

De um modo geral, os três grupos de juvenis de *R. decussatus*, ‘Fast growers’, ‘Medium growers’ e ‘Slow growers’, estudados neste trabalho, aumentaram de tamanho em comprimento e peso ao longo do período experimental. Salienta-se, contudo, que os juvenis pertencentes ao grupo dos ‘Slow growers’ apresentaram uma pequena diminuição de ambos os parâmetros entre o T₁, 107º dia de cultura e T₂, 199º dia de cultura. Esta pequena diminuição pode ser devida ao facto de neste grupo de indivíduos se ter registado uma mortalidade mais acentuada, em especial dos juvenis de maiores dimensões. Os valores de crescimento, tanto em comprimento como em peso, apresentaram diferenças significativas entre os grupos de indivíduos estudados e ao longo do tempo.

Os índices globais de crescimento em comprimento e peso dos três grupos de juvenis de *R. decussatus*, ao longo do período experimental, demonstraram que os indivíduos ‘Fast-Growers’ e ‘Medium-Growers’ apresentaram um crescimento mais acentuado do que os ‘Slow-Growers’. Os índices globais de crescimento apresentados por estes dois grupos de juvenis foram similares aos previamente referenciados para a mesma espécie (Matias, 2007), contudo os indivíduos ‘Slow-Growers’ apresentaram índices globais de crescimento mais baixos, quer em comprimento quer em peso.

1.4.2. Índice de condição

Os resultados do índice de condição que, de uma forma geral, avalia a condição fisiológica dos bivalves, à semelhança dos resultados de crescimento evidenciaram a

existência de diferenças significativas entre grupos, ou seja, entre ‘Fast-Growers’, ‘Medium-Growers’ e ‘Slow-Growers’. Em todas as amostragens os indivíduos ‘Fast-Growers’ foram os que apresentaram os valores mais elevados de índice de condição, seguindo-se os ‘Medium-Growers’ e por último os ‘Slow-Growers’. A partir destes resultados podemos concluir que os indivíduos ‘Fast-Growers’, como seria de esperar, são os que apresentam uma melhor condição fisiológica, seguindo-se os ‘Medium-Growers’ e por último os ‘Slow-Growers’. As diferenças ao longo do tempo foram menos relevantes. Relativamente aos ‘Fast-Growers’ a maior variação ocorreu entre o T_0 e T_1 . No que se refere aos ‘Medium-Growers’ os valores de índice de condição apresentaram-se praticamente constantes ao longo do tempo. Finalmente, em relação aos ‘Slow-Growers’ registou-se um pequeno decréscimo entre os valores de índice de condição entre o T_0 e o T_1 . Infelizmente não podemos tirar nenhuma conclusão em relação ao T_2 , pois não foi possível avaliar o índice de condição nestes indivíduos. O elevado nível de mortalidade que os ‘Slow-Growers’ sofreram entre o T_1 e o T_2 , impediu a obtenção de indivíduos para a análise deste parâmetro, e que será mais uma prova de que estes realmente possuem grandes diferenças a nível fisiológico. Como sugerido por Goulletquer (1989), a mortalidade poderá estar associada ao decréscimo das reservas metabólicas, especialmente glicogénio. De facto ao contrário do que aconteceu com os grupos ‘Fast-Growers’ e ‘Medium-Growers’, os ‘Slow-Growers’ apresentaram uma diminuição da percentagem de hidratos de carbono e de polissacarídeos entre o tempo de amostragem T_1 e T_2 . Estes dois componentes bioquímicos são a principal fonte de reservas energéticas nos bivalves (Albentosa *et al.*, 1996; Robert *et al.*, 1993).

1.4.3. Composição bioquímica

As proteínas, o principal componente bioquímico dos organismos, podem ser sujeitas a transformações metabólicas, contudo elas não são sujeitas a processos de acumulação como os lípidos e os hidratos de carbono. Os lípidos representam uma importante reserva de energia devido ao seu elevado valor calórico e são fundamentalmente usados em condições de stress crónico, enquanto as reservas em glicogénio são geralmente usadas nos processos de gametogénese (Gabbott, 1976).

As proteínas e os hidratos de carbono (constituídos por $\approx 60\%$ de açúcares redutores e $\approx 40\%$ de polissacarídeos) são os constituintes bioquímicos que mais contribuem para o

total da matéria orgânica nos juvenis de *R. decussatus*, enquanto os lípidos (constituídos por $\approx$ 60% de lípidos neutros e $\approx$ 40% de fosfolípidos) estão presentes em menor quantidade. Estas proporções têm sido amplamente observadas na literatura para juvenis desta e de outras espécies de bivalves (*e.g.* Robert *et al.*, 1993; Albentosa *et al.*, 1996; Okumus & Stirling, 1998; Albentosa *et al.*, 2006).

De um modo geral, a síntese dos componentes bioquímicos não apresentou diferenças significativas entre os três grupos de indivíduos estudados, excepto o conteúdo em lípidos totais que apresentou diferenças significativas entre os ‘Fast-Growers’ e os outros dois grupos. Assim, estes resultados mostraram que a síntese da maior parte dos componentes bioquímicos ocorreu da mesma forma e nas mesmas proporções nos três tipos de indivíduos, sugerindo que a síntese destes componentes se encontra mais relacionada com os factores extrínsecos, como o alimento e a temperatura, do que com os factores intrínsecos dos organismos.

Relativamente aos lípidos totais, os valores percentuais em relação à matéria orgânica encontram-se entre 15,01% e 21,13%. O decréscimo de lípidos totais observado no T₁, para os grupos ‘Medium-Growers’ e ‘Slow-Growers’, leva a crer que estes não acumulam este componente, na mesma proporção que os ‘Fast-Growers’. Perante estes resultados e tendo em conta a importância dos lípidos no balanço energético (Beninger & Lucas, 1984) supõe-se que os dois primeiros grupos canalizaram um maior conteúdo lipídico para a manutenção metabólica (Albentosa *et al.*, 1996).

No entanto, apesar de, de uma forma geral, não se terem registado diferenças significativas entre os três grupos de indivíduos, existem variações em determinados componentes que evidenciam o funcionamento metabólico destes organismos. A percentagem de hidratos de carbono em relação à matéria orgânica variou entre 21,27 % e 27,64%, verificando-se um ligeiro decréscimo ao longo do período experimental, em todos os grupos, o que reforça a ideia de que os juvenis desta espécie utilizam preferencialmente hidratos de carbono como fonte de energia em período em que o crescimento é mais acentuado (Albentosa *et al.*, 1996).

Os polissacarídeos, sendo maioritariamente constituídos por glicogénio (Robert *et al.*, 1993), são a principal fonte de reservas energéticas nos bivalves, representando cerca de 50% do total de hidratos de carbono (Robert *et al.*, 1993). Assim, o aumento destes entre o T₁ e o T₂, tanto nos ‘Fast-Growers’ como nos ‘Medium-Growers’, pode ser devido ao facto de,

possivelmente, estes indivíduos terem acumulado essas reservas de energia neste período, para iniciarem a fase de gametogénese.

Os lípidos neutros decresceram ao longo do tempo para os ‘Fast-Growers’ e para os ‘Medium-Growers’, ao contrário dos ‘Slow-Growers’ que apresentaram um aumento ao longo do período experimental. Tendo os lípidos neutros uma função de reserva (*e.g.* Labarta *et al.*, 1999), provavelmente, os ‘Fast-Growers’ e os ‘Medium-Growers’ canalizaram mais energia para a biosíntese da concha. Contrariamente, os ‘Slow-Growers’ acumulam mais lípidos de reserva. Relativamente aos fosfolípidos, este parâmetro teve um comportamento inverso ao verificado nos lípidos neutros, aumentando, ao longo do período experimental, nos grupos ‘Fast-Growers’ e ‘Medium-Growers’, e diminuindo no caso dos ‘Slow-Growers’. É de realçar que a relação entre lípidos neutros e fosfolípidos foi diferente entre os grupos. Nos ‘Fast-Growers’ a diferença entre estes dois componentes foi menor do que nos ‘Medium-Growers’ e do que nos ‘Slow-Growers’. Os lípidos neutros estiveram quase sempre em maior quantidade do que os fosfolípidos. Sendo os fosfolípidos os constituintes principais das membranas celulares, ou seja, são lípidos estruturais (Fabrice *et al.*, 2008), compreende-se que os indivíduos que possuam um crescimento mais acentuado possuam um conteúdo mais elevado de fosfolípidos.

Os ciclos sazonais do índice de condição, lípidos e glicogénio estão relacionados com o ciclo reprodutivo anual (Gabbot, 1983). Os baixos valores de lípidos encontrados neste estudo, justificam-se pelo facto dos indivíduos não se encontrarem no seu período anterior à postura, aquando são atingidos os níveis máximos de lípidos nos gâmetas e os valores mínimos de glicogénio (Massapina *et al.*, 1999).

1.4.4. Aneuploidia

Foi possível verificar que todos os casos de aneuploidia observados corresponderam a casos de hipodiploidia. Esta é uma observação esperada, pois a hipodiploidia parece ser, regra geral, mais frequente do que a hiperdiploidia, como se pôde observar, por exemplo, nos humanos e em outros bivalves (*e.g.* Martin & Rademaker, 1990; Leitão *et al.*, 2001).

Através da observação dos resultados, foi verificada a existência de uma correlação negativa entre o crescimento e o nível de aneuploidia, mais precisamente hipodiploidia, somática, obtendo-se percentagens de taxa de aneuploidia que variaram entre cerca de 19% para indivíduos ‘Fast-Growers’ e de cerca de 79% para ‘Slow-Growers’. Estes valores são

substancialmente superiores aos observados em estudos anteriores em bivalves, como por exemplo na espécie de ostra *C. gigas* (Thiriot-Quiévreux *et al.*, 1988; Leitão *et al.*, 2001).

No que diz respeito aos valores da taxa de aneuploidia nos vários grupos de *R. decussatus* estudados, verificou-se a existência de diferenças estatisticamente significativas entre todos, ‘Fast-Growers’, ‘Medium-Growers’ e ‘Slow-Growers’. Deste modo, os ‘Fast growers’ apresentam sempre os valores mais baixos de aneuploidia, seguindo-se os ‘Medium-Growers’ e por último os ‘Slow-Growers’ que é o grupo que apresentou sempre os níveis mais elevados.

Em estudos anteriores em bivalves, como por exemplo na espécie de ostra *C. gigas*, foi observada a presença de uma percentagem substancial de células somáticas que possuíam menos cromossomas que o complemento cromossómico normal de $2n=20$ (Thiriot-Quiévreux, 1986; Thiriot-Quiévreux *et al.*, 1988; Thiriot-Quiévreux *et al.*, 1992; Leitão *et al.*, 2001). As diferenças em percentagem de aneuploidia, entre ‘Fast-Growers’ e ‘Slow-Growers’ nessa espécie, variaram de 5% a 22%, tendo sido a correlação entre o crescimento e a taxa de aneuploidia, altamente significativa. Em vários estudos realizados durante 20 anos em populações naturais ou cultivadas de *C. gigas*, os ‘Fast-Growers’ mostraram sempre uma menor percentagem de aneuploidia do que os ‘Slow-Growers’. (Leitão *et al.*, 2001).

Outro estudo relevante foi realizado em *C. angulata*, *C. gigas* e nos híbridos interespecíficos. Os resultados deste estudo confirmaram novamente a relação negativa entre aneuploidia e taxa de crescimento, verificando-se que a espécie *C. gigas* possuía uma taxa de crescimento e de sobrevivência mais elevada do que a espécie *C. angulata*, estando ambas sob as mesmas condições e que os híbridos apresentaram valores intermédios para todos os parâmetros. Foram observadas então as diferenças significativas na proporção de células aneuploides e de cromossomas ausentes, com a espécie *C. angulata*, a apresentar os valores mais elevados a este nível (Batista *et al.*, 2007).

Porém, tendo em conta a evolução ao longo do tempo de todos os grupos, não existem diferenças estatisticamente significativas entre cada amostragem, T_0 , T_1 e T_2 , sugerindo que a percentagem de aneuploidia se manteve ‘constante’ ao longo de todo o período de amostragem. Este foi o primeiro estudo efectuado em *R. decussatus*, tendo em conta o fenómeno da aneuploidia e a sua relação negativa com o crescimento. Foi igualmente o primeiro estudo da evolução dos valores de aneuploidia ao longo do tempo em bivalves. Estes resultados revelam-se assim importantes para a compreensão da evolução dos níveis de aneuploidia nesta espécie, contudo é necessário realçar que o presente estudo teve apenas a

duração de 9 meses e por essa razão é possível que pudessem vir a existir alterações posteriores.

1.4.5. Relações entre parâmetros

Através da análise dos componentes principais, e da realização de correlações de Pearson, verificou-se que os parâmetros que possuem uma maior influência nos resultados são o comprimento, o peso e a taxa de aneuploidia. Foi possível observar que tanto o comprimento, como o peso e o índice de condição estão negativamente relacionados com a taxa de aneuploidia. Estes resultados demonstram uma vez mais a existência de uma correlação negativa significativa entre o nível de aneuploidia e crescimento nesta espécie.

Em relação aos lípidos neutros podemos observar que estão negativamente correlacionados com o comprimento e o peso, pois tendo os lípidos neutros uma função de reserva é possível que tenham canalizado essas mesmas reservas para o seu crescimento. Porém, encontram-se correlacionados de forma positiva, com o valor energético, pois como foi referido acima, os lípidos são o componente bioquímico de maior importância no balanço energético dos bivalves marinhos.

Verificou-se igualmente que em relação aos fosfolípidos, estes correlacionam-se positivamente com o índice de condição e com o comprimento, como já foi referido, sendo os fosfolípidos os constituintes principais das membranas celulares (Fabrice *et al.*, 2008), compreende-se que os indivíduos que possuam um crescimento mais acentuado, contenham uma maior percentagem destes.

1.5. Conclusão

Os resultados obtidos neste capítulo permitiram:

1. Demonstrar a presença de uma percentagem considerável de células aneuploides (hipodiploides) nos tecidos somáticos da espécie *R. decussatus*.
2. Evidenciar a existência de uma correlação negativa significativa entre o nível de hipodiploidia e o crescimento nesta espécie.
3. Concluir, no geral, que ao longo do tempo a percentagem de aneuploidia não sofreu alterações significativas, verificando-se apenas uma redução no que diz respeito aos ‘Slow Growers’.
4. Sugerir que no que diz respeito aos componentes bioquímicos, os ‘Slow-Growers’ se distinguiram dos outros dois grupos pelo conteúdo em lípidos.
5. Demonstrar que a condição fisiológica dos indivíduos não se relacionou com a taxa de aneuploidia.

Capítulo 2

Aplicação da identificação cromossômica ao fenómeno da aneuploidia na espécie *Ruditapes decussatus*

2.1 Introdução

Os primeiros estudos de citogenética efectuados em *R. decussatus* referiram-se apenas à determinação do número cromossómico (Paterson review, 1969; Gerard, 1978), aferindo um número diplóide de 38 cromossomas.

Posteriormente, a análise morfométrica dos cariótipos permitiu a caracterização morfológica dos cromossomas, baseada no tamanho relativo e na posição do centrómero, permitindo a caracterização do cariótipo de *R. decussatus*, sendo este constituído por seis pares de cromossomas metacêntricos, três submetacêntricos e dez subtelocêntricos (Borsa & Thiriot-Quiévreux, 1990).

Mais recentemente, técnicas de marcação diferencial têm sido aplicadas ao cariótipo desta espécie. As regiões dos organizadores nucleolares ou NORs, são regiões dos cromossomas que contêm genes que codificam as subunidades do RNA ribossomal (RNAr), que por sua vez, é sintetizado e processado no nucléolo e que posteriormente se torna parte dos ribossomas maduros no citoplasma da célula (Sumner, 1990). A utilização do método de marcação por precipitação argêntica amoniacal para detecção, nas metafases, dos locais cromossómicos onde se situam os NORs (Howell *et al.*, 1975), mostrou ser uma ferramenta taxonómica importante, permitindo o estudo comparativo das variações intra e interespecíficas dos NORs (Anemiya & Gold, 1990). Esta técnica fundamenta-se na redução da prata por proteínas não histónicas (ácidas), (*eg.*, Schwarzachner & Wachtker, 1983) que se encontram na vizinhança dos genes ribossomais (Matsui *et al.*, 1986) e na sua deposição no local dos NORs. Esta técnica de marcação por precipitação argêntica amoniacal, que detecta NORs activos na interfase precedente, tem sido aplicada a várias espécies de bivalves de oito famílias diferentes, tendo como principal finalidade compreender a evolução cromossómica nos bivalves e a clarificação de relações filogenéticas neste grupo.

A localização dos NORs nos cariótipos de seis espécies de ostras do género *Crassostrea* e *Saccostrea* permitiu, de facto, o estabelecimento de relações filogenéticas dentro deste grupo de animais (Leitão *et al.*, 1999). No entanto, a maioria dos estudos de localização dos NORs têm sido efectuados apenas nas famílias Mytilidae, Ostreidae e Pectinidae, tendo sido muito escassos na família Veneridae (Leitão & Chaves, 2008). Nesta última, apenas foi efectuada a localização cromossómica por FISH, hibridação ‘in situ’, dos

genes de RNA ribossomal nas espécies *Dosinia exoleta* (Hurtado & Pasantes, 2005) e *Mercenaria mercenaria* (Wang & Guo, 2001).

A aplicação da técnica de digestão ‘in situ’ por enzimas de restrição, REs, que cortam o DNA em sequências alvo específicas, produzem padrões de bandas longitudinais cromossoma-específicos em cromossomas de mamíferos e insectos (*e.g.*, Leitão *et al.*, 2006). Nos bivalves, esta técnica foi aplicada com sucesso a mexilhões (Martinez-Lage *et al.*, 1994), vieiras (Gajardo *et al.*, 2002) e ostras (Leitão *et al.*, 2004; Bouilly *et al.*, 2005; Cross *et al.*, 2005).

Neste último grupo, esta técnica permitiu igualmente estudar a evolução cromossómica dentro da família Ostreidae (Leitão *et al.*, 2006), bem como a confirmação da hibridização interespecífica entre as ostras *C. angulata* e *C. gigas* (Leitão *et al.*, 2007). Neste último estudo, através desta marcação cromossómica foi possível observar que, em cada par de cromossomas, um dos homólogos apresentava um modelo de bandeamento consistente com o de *C. gigas* e o outro homólogo apresentava um modelo de bandeamento consistente com o de *C. angulata*. (Leitão *et al.*, 2007).

O bandeamento através de REs apresenta também uma grande vantagem, pois foi demonstrado em mamíferos, que é compatível com a hibridação ‘in situ’ fluorescente, FISH. (Chaves *et al.*, 2002). O uso em simultâneo de diferentes REs pode ser também útil na detecção de diferentes tipos de heterocromatina, não reveladas pelas técnicas de bandeamento standard (Leitão *et al.*, 2006).

A aplicação de enzimas de restrição constitui um passo fundamental para o mapeamento genético, podendo oferecer uma nova abordagem nos problemas específicos na taxonomia e filogenia dos veneroides. Na espécie *R. decussatus*, depois da digestão com REs, foi obtido um modelo de bandeamento cromossómico longitudinal específico, permitindo a identificação individual de todos os pares de cromossomas e o estabelecimento dos cariótipos precisos (Leitão *et al.*, 2006).

Neste trabalho foram então aplicadas duas técnicas de marcação diferencial para uma melhor identificação dos cromossomas: a técnica de marcação argêntica para as regiões dos organizadores nucleolares, Ag-NORs, aplicada aqui pela primeira vez nesta espécie e a de bandeamento por enzimas de restrição. A aplicação, neste estudo, da técnica de marcação diferencial por enzimas de restrição foi realizada pela primeira vez com a finalidade de

identificar os cromossomas ausentes em cariótipos aneuploides, o que permitirá uma melhor compreensão deste fenómeno.

2.2. Material e Métodos

Todos os indivíduos utilizados neste capítulo tiveram a selecção e acondicionamento previamente descritos no capítulo I.

2.2.1. Obtenção das preparações cromossómicas

Quer para a elaboração dos cariótipos padrão, quer para a elaboração dos cariótipos com marcação cromossómica, as preparações cromossómicas obtiveram-se mediante a técnica de suspensão celular de Thiriot-Quévieux & Ayraud (1982), apresentada em detalhe no capítulo I e que consiste nas várias etapas descritas de seguida:

- Bloqueio das mitoses em metafase;
- Choque hipotónico;
- Fixação;
- Execução das lâminas;

2.2.2. Elaboração do cariótipo standard

Na elaboração do cariótipo padrão realizaram-se as duas etapas seguintes:

- Coloração standard com o corante Giemsa;
- Observação das lâminas e microfotografia

Na metafase mitótica, para a elaboração do cariótipo padrão, cada um dos cromossomas foi caracterizado pelo seu tamanho e forma, sendo assim, os cromossomas foram recortados e ordenados em função destas características, a fim de se organizar o cariótipo de acordo com o publicado para esta espécie. (Borsa & Thiriot-Quévieux, 1990).

2.2.3. Elaboração de cariótipos com marcação cromossómica

2.2.3.1. Regiões dos organizadores nucleolares – NORs

As regiões dos organizadores nucleolares foram coradas pela técnica do nitrato de prata amoniacal de Howel & Black (1980), modificada por Gold & Ellison (1982).

Prepararam-se as duas soluções seguintes:

- Solução 1: solução coloidal, composta por 2g de gelatina, 1 ml de ácido fórmico e 10 ml de água destilada;
- Solução 2: solução de nitrato de prata, composta por 4g de nitrato de prata e 8 ml de água destilada.

As preparações cromossómicas foram tratadas com duas gotas da solução 1 e quatro gotas da solução 2. A lâmina foi coberta com uma lamela e incubada sobre uma placa de aquecimento a 44°C durante cerca de 8 minutos. Ao fim deste tempo, a lâmina foi lavada com água destilada. Depois de secas, as lâminas foram observadas ao microscópio, fotografando-se as metafases de melhor qualidade.

Na observação microscópica, os núcleos apresentaram uma coloração amarelo dourada, enquanto a coloração dos NORs e dos nucléolos apresentaram um tom mais escuro. As lâminas com marcação das regiões organizadoras nucleolares, devem ser observadas e fotografadas o mais rapidamente possível, uma vez que a cor e a preparação tendem a deteriorar-se rapidamente.

2.2.3.2. Digestão ‘in situ’ com enzimas de restrição

Antes do tratamento com a enzima de restrição, as preparações cromossómicas foram envelhecidas durante 6 h numa incubadora a 65°C. A enzima de restrição HaeIII (GG/CC) foi seleccionada para este trabalho, visto ter sido demonstrado ser a mais adequada nos estudos prévios de bandeamento com enzimas de restrição em bivalves (Leitão *et al.*, 2004; Leitão *et al.*, 2006). Esta foi diluída no ‘buffer’ correspondente e em água pura, tendo-se obtido o volume final de 100µl. Cada 100µl desta solução foi colocado em cada lâmina e esta coberta por uma lamela. Seguidamente, as lâminas foram incubadas numa câmara húmida durante

cerca de 16h, durante a noite, a 37°C. Por último as lâminas foram lavadas com água destilada, secas ao ar e coradas com uma solução Giemsa a 4%, diluída em tampão fosfato a pH 6,8.

2.2.3.3. Observação das lâminas e microfotografias

Tanto na marcação cromossómica através do nitrato de prata, como através da digestão com enzimas de restrição, as metafases foram fotografadas num microscópio Nikon Eclipse 80i, com câmara de aquisição acoplada Nikon DS-Fi1. Posteriormente as imagens foram tratadas de forma integral, no ‘software’ Adobe Photoshop 6.0, para uma melhor visualização e contagem dos cromossomas.

Na metafase mitótica, e agora no caso da elaboração de cariótipos com marcação cromossómica, foram tidos em conta as categorias de classificação morfológica (Levan *et al.*, 1964) e igualmente o modelo de bandeamento obtido.

2.3. Resultados

2.3.1. Cariótipo standard

Foram realizados 23 cariótipos standard.

Confirmou-se a fórmula cariotípica de seis pares de cromossomas metacêntricos, três submetacêntricos e dez subtelocêntricos, previamente determinada, por Borsa & Thiriot-Quévieux, 1990 - Figura 18.

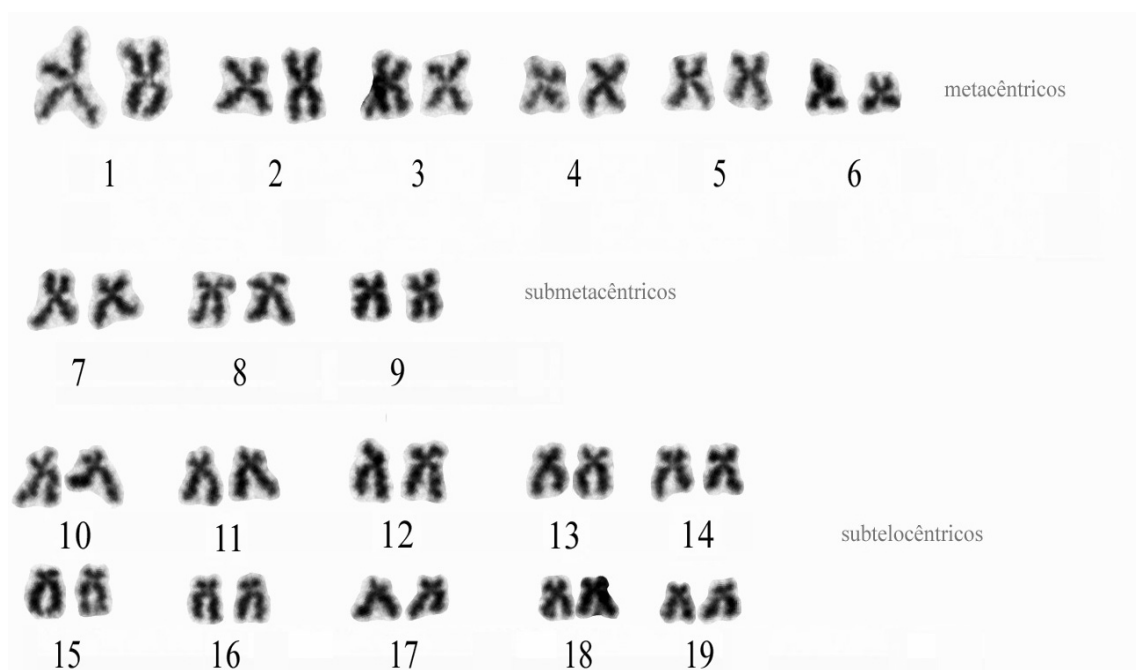


Figura 18- Cariótipo standard de *R. decussatus*, confirmando a fórmula cariotípica de seis pares de cromossomas metacêntricos, três submetacêntricos e dez subtelocêntricos (Borsa & Thiriot-Quévieux, 1990).

2.3.2. Regiões dos organizadores nucleolares – NOR

Este foi o primeiro estudo efectuado para a localização dos Ag-NORs nesta espécie.

Infelizmente não foi possível obter um número suficiente de metafases de qualidade com marcação de Ag-NORs, adequadas para a realização de cariótipo. No entanto, foi possível pela primeira vez, determinar a localização dos Ag-NORs nesta espécie. Foi observada marcação nos telómeros dos braços longos de um cromossoma metacêntrico e nos

telómeros dos braços longos de um cromossoma submetacêntrico. Não foi, no entanto, possível estabelecer a sua localização no cariótipo - Figura 19.

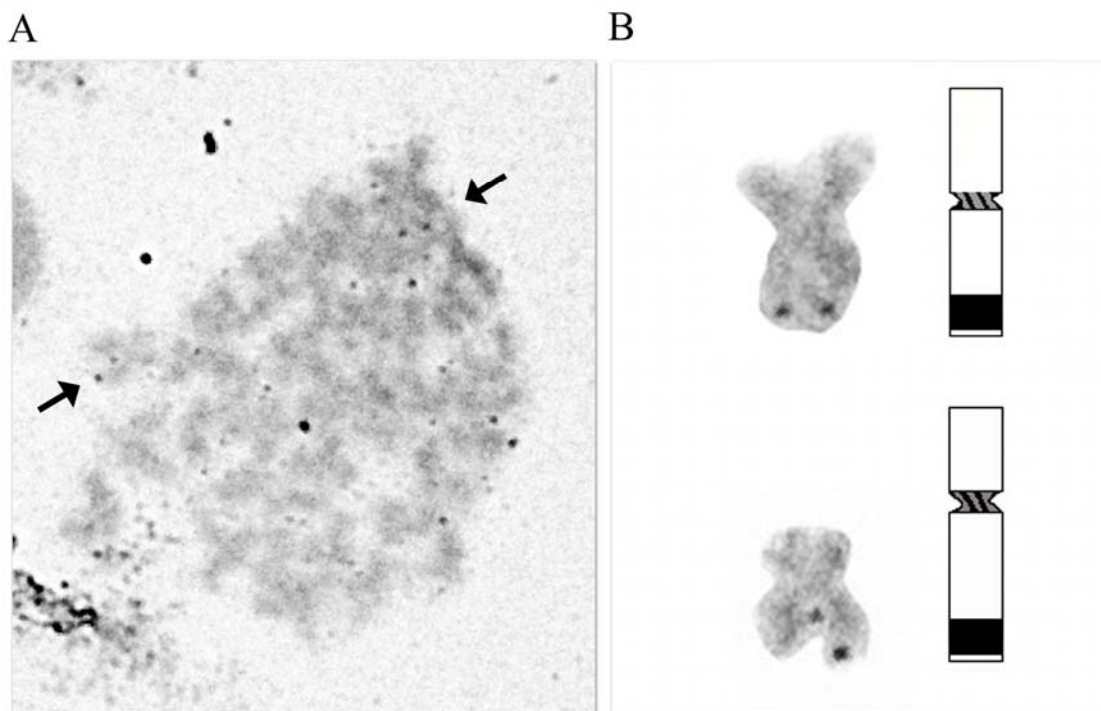


Figura 19- A. Metafase de *R. decussatus* com marcação de Ag-NORs. As setas assinalam as Ag-NORs. B. Cromossomas assinalados em A com o respectivo ideograma representativo.

2.3.3. Enzimas de restrição

Foram realizados sete cariótipos com modelo de bandeamento, através da digestão com enzimas de restrição.

Apesar de não ter sido possível obter uma condensação cromossómica ideal para este tipo de bandeamento diferencial, a utilização desta técnica permitiu uma identificação mais precisa dos cromossomas nesta espécie, visto apresentarem um modelo de bandeamento específico.

Esta caracterização mais precisa contribuiu, pela primeira vez, para a identificação dos cromossomas ausentes em cariótipos aneuploides desta espécie - Figura 20.

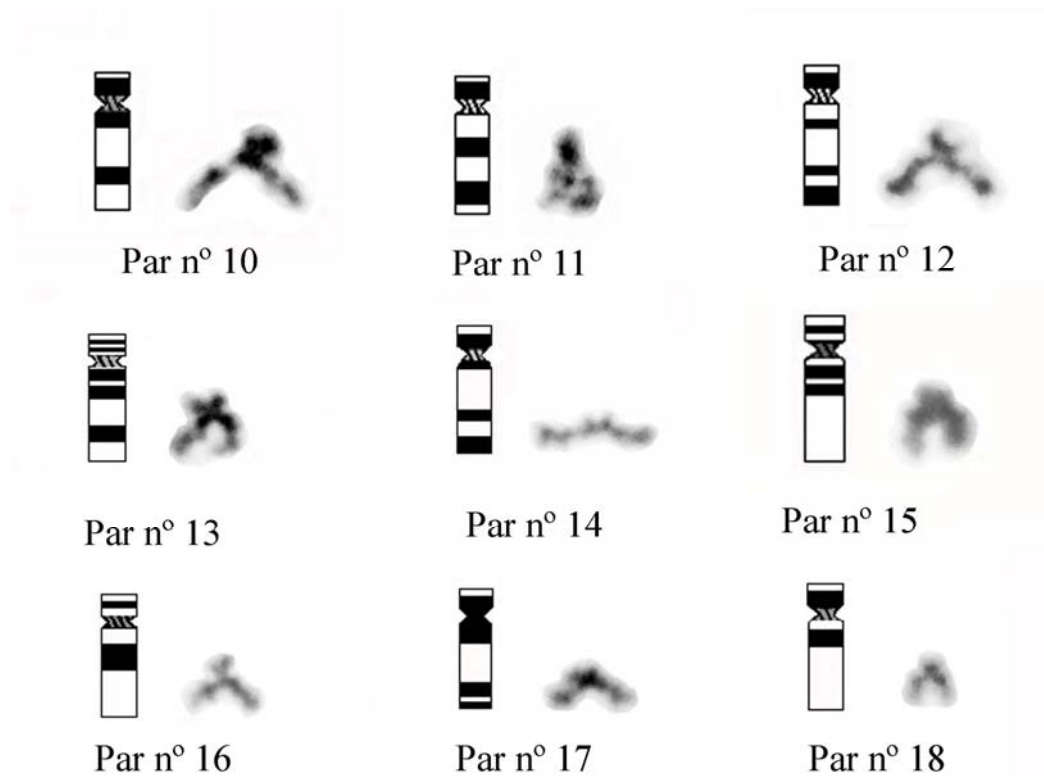


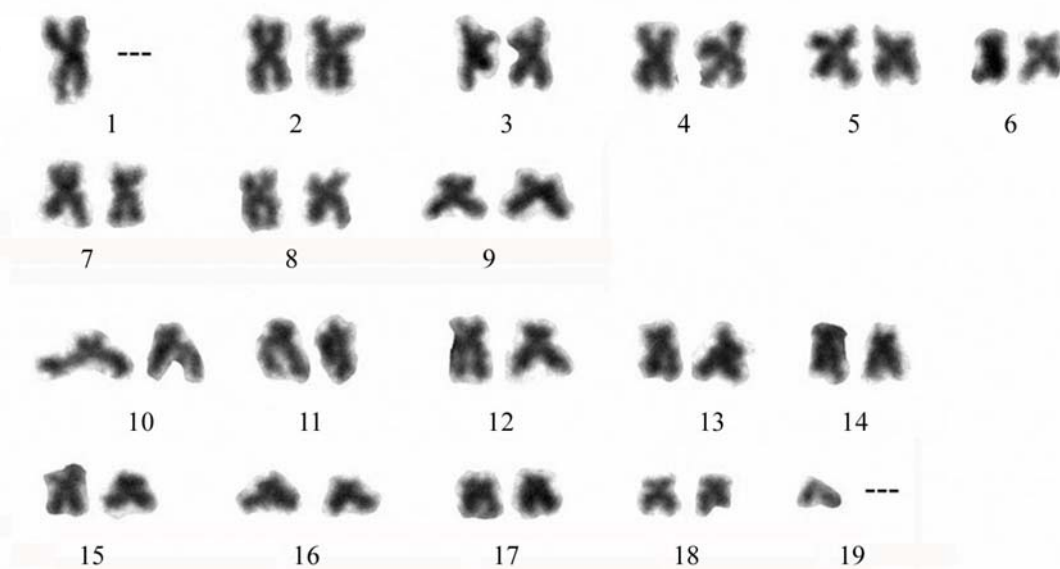
Figura 20- Exemplos de cromossomas de *R. decussatus* com bandeamento cromossómico obtido através da enzima de restrição HaeIII e respectivo ideograma.

2.3.4. Identificação dos cromossomas ausentes em casos de aneuploidia

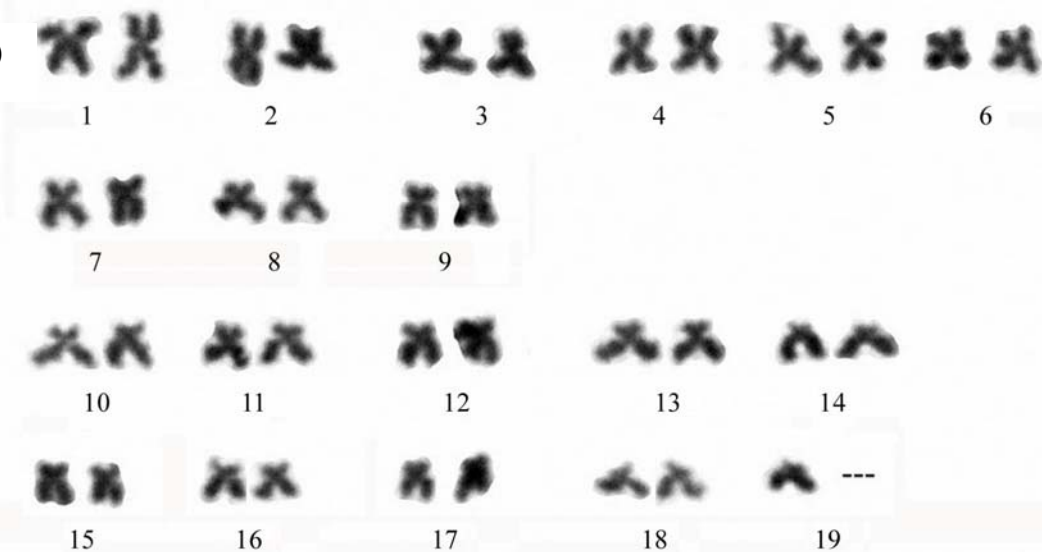
Na Figura 21 apresentam-se quatro cariótipos, onde se pode observar a ausência de determinados cromossomas. Estes cariótipos são representativos dos casos mais comuns encontrados nos 30 analisados.

A observação de 30 cariótipos aneuploides com e sem marcação por enzimas de restrição, permitiu-nos identificar os cromossomas ausentes nos casos de aneuploidia e a percentagem de perda destes (Tabela V).

a)



b)



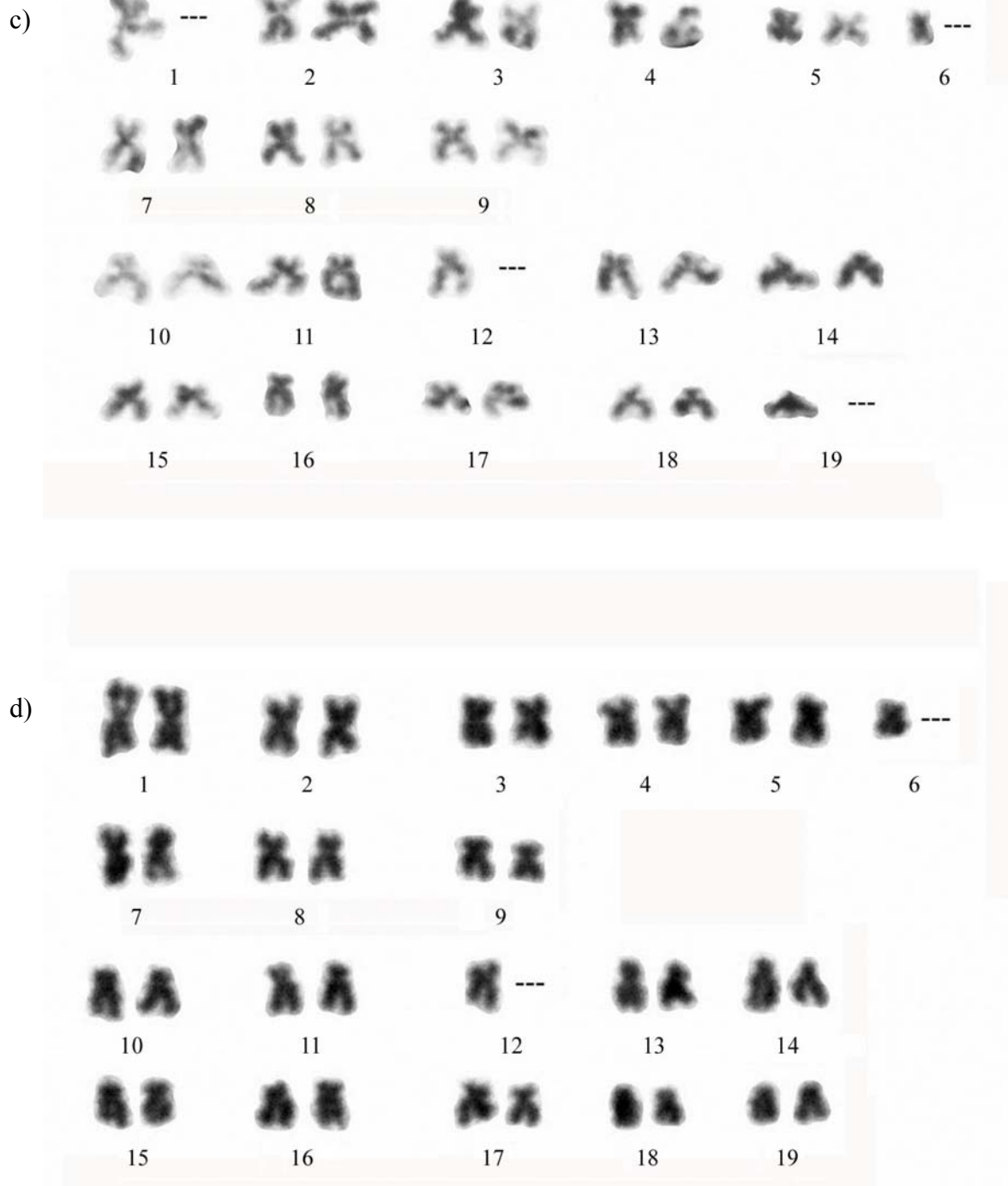


Figura 21- Quatro cariótipos aneuploides de *R. decussatus* onde se pode observar a ausência de determinados cromossomas. Estes cariótipos são representativos dos casos mais comuns. a) Cariótipo com perda cromossómica nos pares nº 1 e 19. b) Cariótipo com perda cromossómica no par nº 19. c) Cariótipo com perda cromossómica nos pares nº 12 e 19. d) Cariótipo com perda cromossómica nos pares nº 6 e 12.

Através da observação da Tabela V podemos concluir que cromossomas dos pares nº 1, 6, 12 e 19 são os preferencialmente perdidos. Em nenhum caso foi observada a perda dos dois cromossomas de um par de homólogos. Para além desta informação foi também possível determinar quais os pares cromossómicos que apresentaram uma perda preferencial, no caso da aneuploidia ser de $2n=34$, 35, 36 ou 37 cromossomas (Tabela A.IV- Apêndice).

Tabela V- Percentagem de perda nos diferentes pares cromossómicos que apresentaram cromossomas ausentes. A negrito encontram-se representados os pares com uma perda preferencial em casos de aneuploidia, na espécie *R. decussatus*.

Par nº	% Total	% de perda cromossómica			
		% $2n=34$	% $2n=35$	% $2n=36$	% $2n=37$
1	37	80	40	30	20
5	3	0	20	0	0
6	27	80	20	20	10
7	17	60	20	10	0
8	3	0	20	0	0
9	10	20	0	20	0
10	3	0	20	0	0
12	40	40	40	50	30
13	3	20	0	0	0
14	3	0	20	0	0
15	7	20	0	0	10
17	3	0	20	0	0
19	47	60	20	70	30

2.4. Discussão

No primeiro capítulo deste trabalho, foi demonstrada pela primeira vez uma correlação negativa entre o crescimento e a taxa de aneuploidia na espécie *R. decussatus*. Com o intuito de melhor compreender este fenómeno foram realizados os cariótipos e aplicadas técnicas de marcação diferencial, Ag-NORs e de bandeamento por enzimas de restrição com a finalidade de identificar os cromossomas ausentes nos cariótipos aneuploides.

O número de Ag-NORs, a sua localização e a sua posição no cariótipo, podem ser considerados como características específicas de uma espécie (Sumner, 1990). Os resultados deste estudo, referentes à marcação cromossómica através da técnica de marcação por precipitação argêntica, são originais para a espécie *R. decussatus*. Foi então observada marcação nos telómeros dos braços longos de um cromossoma metacêntrico e nos telómeros dos braços longos de um cromossoma submetacêntrico. No entanto não foi possível estabelecer a sua localização no cariótipo. A localização dos genes de RNA ribossomal nos telómeros, parece ser a mais comum nos bivalves (Leitão & Chaves, 2008), incluindo na família Veneridae à qual pertence *R. decussatus*, como se verificou pela localização cromossómica por FISH, hibridação ‘in situ’, dos genes de RNA ribossomal nas espécies *Dosinia exoleta* (Hurtado & Pasantes, 2005) e *Mercenaria mercenaria* (Wang & Guo, 2001).

No caso da digestão ‘in situ’ com endonucleases de restrição, a utilização desta técnica, e apesar de não ter sido possível obter uma condensação cromossómica ideal, contribuiu, pela primeira vez, para a identificação dos cromossomas ausentes em cariótipos aneuploides desta espécie.

Neste capítulo foram analisados 30 cariótipos aneuploides. Este número é o número mínimo estatisticamente aceitável para a credibilização na identificação de cromossomas ausentes (e.g., Wenger *et al.*, 1984). As perdas cromossómicas ocorreram preferencialmente nos pares nº 1, 6, 12 e 19, nas proporções de 37%, 27%, 40% e 47%, respectivamente. Nos bivalves, mais precisamente em *C. gigas*, estudos anteriores revelaram uma perda não aleatória nos casos de aneuploidia. Uma perda preferencial de certos pares de cromossomas foi igualmente observada, preferencialmente nos pares nº 1, 9 e 10, nas proporções de 56%, 33% e 44% (e.g. Leitão *et al.*, 2001). Posteriormente, ainda em *C. gigas* foi analisada a

descendência de indivíduos contaminados com o herbicida Atrazina, mostrando que os mesmos pares de cromossomas eram afectados. Este estudo de aneuploidia induzida por poluentes demonstrou, também, uma vez mais, a não aleatoriedade da perda cromossómica (Bouilly *et al.*, 2005). No presente estudo mostrou que a perda ocorreu preferencialmente em certos pares cromossómicos, sendo o primeiro e o último par de cromossomas os que revelaram uma maior percentagem de perda, tal como foi observado em ambos os estudos anteriores.

A perda preferencial de cromossomas nos pares nº 1, 6, 12 e 19, leva-nos a sugerir as seguintes hipóteses justificativas:

I- Perda cromossómica relacionada exclusivamente com o tamanho.

Esta hipótese justificaria a perda cromossómica nos pares nº 6 e 19, devido ao seu pequeno tamanho, de acordo com a evidência de uma relação directa entre tamanho pequeno e perda cromossómica observada em humanos (e.g. Martin & Rademaker, 1990) e em bivalves, como o caso da espécie *C. gigas*, sendo esta a hipótese sugerida para a perda observada nos pares 9 e 10 nessa espécie (Leitão *et al.*, 2001). No entanto, esta hipótese por si só não é suficiente para explicar os altos níveis de perda cromossómica nos pares nº1 e 12.

II- Perda cromossómica relacionada com a presença de heterocromatina.

Esta hipótese poderia justificar a perda cromossómica no par nº1. Tendo em conta que é o cromossoma de maior dimensão, e como tal ter uma maior possibilidade de abranger um maior número de genes, será de estranhar que a sua perda não resulte na inviabilidade celular. Uma hipótese a considerar é o facto deste cromossoma, possivelmente, conter uma grande quantidade de heterocromatina, que, como se sabe, na maior parte dos casos, é constituída por DNA altamente repetitivo e não codificante (Verma, 1988). Desta forma, a perda deste cromossoma específico poderia ser melhor tolerado pela célula.

III- Desequilíbrio na dosagem de genes provocado pela aneuploidia.

Dada a elevada percentagem de perda cromossómica observada nos pares nº 1, 6, 12 e 19, podemos sugerir que ocorreu um desequilíbrio na dosagem de genes provocados pela aneuploidia. A alteração massiva da expressão de genes pode provocar alterações qualitativas

na fisiologia e metabolismo de células e tecidos. (Rasnick & Duesberg, 1999). Estudos recentes em plantas demonstram que alterações fenotípicas ocorrem devido a mudanças quantitativas no padrão da expressão de genes, causadas pela aneuploidia,. (Makarevich & Harris, 2010).

IV- Presença de organizadores nucleolares e não disjunção.

Tem sido sugerido por vários autores, uma relação entre a presença de NORs e o fenómeno da não disjunção (*e.g.* Verma, 1983; Hassold *et al.*, 1987; Lee Gould & Martin De Leon, 1987). No caso da ostra *C. gigas*, os NORs estão localizadas no par nº10 (Thiriot-Quiévreux & Insua, 1992), o que poderia explicar o alto nível de perda cromossómica nesse par, observada nessa espécie (*e.g.* Leitão *et al.*, 2001). No entanto, como já foi referido anteriormente, apesar de ter sido observada marcação nos telómeros dos braços longos de um cromossoma metacêntrico e nos telómeros dos braços longos de um cromossoma submetacêntrico, neste trabalho, não foi possível estabelecer a sua localização no cariótipo. Desta forma não é possível retirar conclusões sobre se a localização dos NOR estaria num dos pares que sofreram perda cromossómica e nesse caso a sua perda seria justificada por esta hipótese. No entanto abre perspectivas para um futuro estudo.

Para além de apurar quais os pares cromossómicos com maior tendência de perda em caso de aneuploidia, foi também possível determinar, quais os que têm uma perda preferencial no caso de a aneuploidia ser de $2n=34$, 35 , 36 ou 37 cromossomas.

Concluiu-se que, no caso de a aneuploidia ser de $2n=37$, a perda cromossómica verificou-se nos pares nº 1, 6, 12 e 19, já referidos como preferenciais, verificando-se, no entanto, ainda no par nº 15. No caso de a aneuploidia ser de $2n=36$, esta perda foi observada, para além dos já referidos pares nº 1, 6, 12 e 19, nos pares nº 7 e 9. No caso de a aneuploidia ser de $2n=35$, a perda ocorreu nos pares nº 1, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 14, 17 e 19. Finalmente, no caso de a aneuploidia ser de $2n=34$, houve perda cromossómica nos pares nº 1, 6, 7, 9, 12, 13, 15 e 19.

A análise destes dados permitiu-nos confirmar a perda preferencial dos cromossomas dos pares nº 1, 6, 12 e 19, pois em qualquer um dos casos de perda cromossómica, ou seja, com uma aneuploidia de $2n=34$, 35 , 36 ou 37 , estes foram os cromossomas que estavam sempre ausentes. Para além do cromossoma do par nº 15, foram também os únicos a estarem ausentes em metafases aneuploides de $2n=37$, ou seja, com perda de 1 só cromossoma,

confirmando assim novamente a sua maior susceptibilidade de perda. É de realçar que em nenhum dos casos de aneuploidia observados, os cromossomas ausentes pertenciam ao mesmo par de homólogos.

2.5. Conclusão

Neste trabalho, foi detectada pela primeira vez a localização nas regiões cromossómicas dos organizadores nucleolares, Ag-NORs, em *R. decussatus*. Foi também realizado o primeiro estudo de bandeamento através de enzimas de restrição com a finalidade de identificar os cromossomas ausentes em cariótipos aneuploides na espécie *R. decussatus*. Infelizmente, tanto para a técnica de Ag-NORs como para a digestão através de enzimas de restrição, dispomos de uma população muito pequena. Seria interessante aumentar a população a fim de testar as hipóteses aqui sugeridas.

Através da observação de 30 cariótipos aneuploides de *R. decussatus*, neste capítulo, foi possível identificar os cromossomas ausentes, assim como a percentagem de perda destes. Com estes dados, uma vez que as proporções de perda dos cromossomas dos pares nº 1, 6, 12 e 19 são evidentes, foi possível formular hipóteses para explicar a perda dos mesmos.

Os resultados obtidos abrem perspectivas para novos estudos, que envolvam uma busca para uma melhor compreensão do fenómeno de aneuploidia na espécie *R. decussatus* e a da sua correlação negativa com o crescimento.

Com este intuito, será necessário a observação de um maior número de metafases aneuploides, marcadas com REs. Será também importante a aplicação da técnica de marcação diferencial, bandas C, que coloca em evidência as zonas de heterocromatina constitutiva, de forma a testar as hipóteses sugeridas.

Conclusões gerais e Perspectivas

Conclusões gerais e Perspectivas

Os resultados do estudo do fenómeno da aneuploidia obtidos, permitiram constatar a presença de uma taxa de células aneuploides (hipodiploides) nos tecidos somáticos da amêijoa-boia *R. decussatus*, em todos os três tipos de indivíduos estudados, ‘Fast-Growers’, ‘Medium-Growers’ e ‘Slow-Growers’. A relação negativa aneuploidia - crescimento pôde ser observada em todas as classes estudadas, sendo que os animais de crescimento rápido apresentaram sempre um nível de aneuploidia inferior aos animais de crescimento lento. Para uma melhor compreensão deste fenómeno foram posteriormente realizados os cariótipos e aplicadas pela primeira vez nesta espécie, técnicas de marcação diferencial, Ag-NORs e de bandeamento por enzimas de restrição com o objectivo de identificar os cromossomas preferencialmente ausentes nos cariótipos aneuploides.

Tendo em conta que a relação entre a aneuploidia e o crescimento, poderia reflectir-se na qualidade fisiológica e na constituição bioquímica dos indivíduos, estes dois parâmetros foram também avaliados paralelamente. No entanto, apesar da correlação negativa encontrada entre a taxa de aneuploidia e o índice de condição, reflectindo este o crescimento em peso, não foi encontrada nenhuma correlação significativa entre a taxa de aneuploidia e os componentes bioquímicos. Estes resultados levam-nos a sugerir que os componentes bioquímicos analisados neste estudo, não reflectem a relação entre a aneuploidia e o crescimento, contudo, outros processos fisiológicos/metabólicos associados ao crescimento deverão ser equacionados em estudos futuros sobre esta problemática.

Esta confirmação do carácter constante da relação aneuploidia – crescimento pode ser de grande utilidade para as culturas desta espécie, visto existir uma certa tendência de comercializar indivíduos com crescimento rápido, mantendo os animais de crescimento lento mais tempo nos locais de produção, que desta forma irão participar em maior número na reprodução.

Será importante no futuro, verificar a existência de uma predisposição genética, de um carácter hereditário para este fenómeno, observado noutras espécies de bivalves, a fim de evitar que os produtores e mariscadores de bivalves conduzam a uma selecção negativa, incentivando a contribuição dos reprodutores de crescimento lento na obtenção de futuras gerações. O fenómeno da aneuploidia pode de facto vir a ser um parâmetro importante a ter em conta em programas de melhoramento genético da amêijoa-boia.

Bibliografia

- Albentosa, M., Fernández-Reiriz, M., Labarta, U., & Pérez-Camacho, A. (2007). Response of two species of clams, *Ruditapes decussatus* and *Venerupis pullastra*, to starvation: Physiological and biochemical parameters. *Comparative Biochemistry and Physiology* (146), 241-249.
- Albentosa, M., Labarta, U., & Fernández-Reiriz, M. (1996). Fatty acid composition of *Ruditapes decussatus* spat fed on different microalgae diets. *Comparative Biochemistry and Physiology* (113A), 113-119.
- Anemiya, C., & Gold, J. (1990). Cytogenetic studies in North American minnows (Cyprinidae). XVII. Chromosomal NOR phenotypes of 12 species, with comments on cytosystematic relationship among 50 species. *Hereditas* (112), 231-247.
- Banha, M. (1984). *Aspectos da biologia (crescimento e reprodução) de Ruditapes decussatus Lineu, 1789 (Mollusca, Bivalvia) na Ria Formosa- Algarve*. Relatório de Estágio de Licenciatura em Biologia, Faculdade de Ciências de Lisboa, Portugal. 119p.
- Barnes, R. (1980). *Invertebrate zoology*. Saunders WB. Philadelphia: Company, 1089p.
- Batista, F., Leitão, A., Fonseca, V., Ben-Hamadou, R., Ruano, F., Henriques, M., et al. (2007). Individual relationship between aneuploidy of gill cells and growth rate in cupped oysters *Crassostrea angulata*, *C. gigas* and their reciprocal hybrids. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* (352), 226-233.
- Bayne, B. (1999). Physiological components of growth differences between individual oysters (*Crassostrea gigas*) and a comparison with *Saccostrea commercialis*. *Physiology Biochemistry and Zoology* (72), 705-713.
- Bayne, B., & Newell, R. (1983). Physiological energetic of marine molluscs. In: Wilbur KM, Saleuddin ASM (Eds). *The Mollusca, Physiology 4 (1)* Academic press, New York, 407-515.
- Beninger, P., & Lucas, A. (1984). Seasonal variations in condition, reproductive activity, and gross biochemical composition of two species of adult clam reared in a common habitat: *Tapes decussatus* L. (Jeffreys) and *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* (79), 19-35.

- Beukema, J., & De Bruin, W. (1979). Calorific values of the soft parts of the tellinid bivalve *Macoma balthica* (L.) as determined by two methods. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* (37), 19–30.
- Bond, D., & Chandley, A. (1983). *Aneuploidy IN*. Oxford: Oxford University Press.
- Borsa, P., & Thiriot-Quiévreux, C. (1990). Karyological and allozymic characterization of *Ruditapes philippinarum*, *R. aureus* and *R. decussatus* (Bivalvia, Veneridae). *Aquaculture*, 209-227.
- Bouilly, K., Leitão, A., Chaves, R., Guedes-Pinto, H., Boudry, P., & Lapègue, S. (2005). Endonuclease banding reveals that atrazine induced aneuploidy resembles spontaneous chromosome loss in *Crassostrea gigas*. *Genome* (48), 177–180.
- Bouilly, K., Leitão, A., McCombie, H., & Lapègue, S. (2003). Impact of atrazine on aneuploidy in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 219–223.
- Bouilly, K., McCombie, H., Leitão, A., & Lapègue, S. (2004). Persistence of atrazine impact on aneuploidy in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Marine Biology* (145), 699–705.
- Bressan, M., & Marin, M. (1985). Seasonal variations in biochemical composition and condition index of cultured mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lmk) in the lagoon of Venice (North Adriatic). *Aquaculture* (48), 13-21.
- Chaves, R., Adegas, F., Santos, S., Heslop-Harrison, J., & Guedes-Pinto, H. (2002). In situ hybridization and chromosome banding in mammalian species. *Cytogenetics and Genome Research* (96), 113-116.
- Chícharo, L. (1996). *Sistemática, ecologia e dinâmica de larvas e pós-larvas de bivalves na Ria Formosa*. Tese de doutoramento, Universidade do Algarve, Faro, Portugal. 450p.
- Cooper, G. (2000). *The Cell*. Washington DC, USA: Sinauer.
- Cross, I., Sánchez, I., & Rebordinos, L. (2005). Molecular and cytogenetic characterization of *Crassostrea angulata* chromosomes. *Aquaculture* (247), 135-144.

- DGPA. (2008). *Recursos da Pesca. Série estatística 2008. Direcção Geral das Pescas e Aquicultura*. Lisboa: 22 A-B, 181 p.
- Dixon, D. (1982). Aneuploidy in Mussel embryos (*Mytilus edulis* L.) originating from a polluted dock. *Marine Biology Letters* (3), 155-161.
- Fabrice, P., Réjean, T., Iften, R., Sévigny, J., & Chantal, G. (2008). Physiological and biochemical traits correlate with differences in growth rate and temperature adaptation among groups of the eastern oyster *Crassostrea virginica*. *The Journal of Experimental Biology*, 969-977.
- Falcão, M., Duarte, P., Matias, D., Joaquim, S., Fontes, T., & Meneses, R. (2000). *Gestão do cultivo de bivalves na Ria Formosa com recurso à modelação matemática*. Portugal: Relatório final do projecto IPIMAR e IMAR, 116p.
- Fernandez Castro, N., & Vido de Mattio, N. (1987). Biochemical composition, condition index, and energy value of *Ostrea puelchana* (d'Orbigny): Relationships with reproductive cycle. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* (108), 113-126.
- Folin, O., & Malmros, H. (1929). Micro-method for glucose determination in 0.1 ml of blood. *Journal biological chemistry* (83), 115.
- Furtado, A. (1991). *Influência do sedimento no crescimento de três espécies de bivalves na fase de pré-engorda*. Relatório Estágio de Licenciatura em Biologia Marinha e Pescas, Universidade do Algarve, Portugal, 87p.
- Gabbott, P. (1976). Energy metabolism. In: Bayne BL (Eds.), *Marine mussels: their ecology and physiology. International Biological Programme, 10. Cambridge University Press, London and New York*, 293-355.
- Gajardo, G., Parraguez, M., & Colihueque, N. (2002). Karyotype analysis and chromosome banding of the Chilean-Peruvian Scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Journal of shellfish research* (21), 585-590.
- Gérard, A. (1978). Etude des garnitures chromosomiques de deux Veneridae: *Ruditapes decussatus* (L.) et *Ruditapes philippinarum* (Adams et Reeve). *Haliotis* (9), 69-71.

- Gernand, D., Rutten, T., Varshney, A., Rubtsova, M., Prodanovic, S., Brub, C., Kumlehn, J., Matzk, F., Houben, A. (2005). Uniparental chromosomal elimination at mitosis and interphase in wheat and pearl millet crosses involves micronucleus formation, progressive heterochromatinization and DNA fragmentation. *The Plant Cell* (17), 2431-2438.
- GM, C. (2000). *The Cell*. Washington DC, USA: Sinauer.
- Gold, J., & Ellison, J. (1982). Silver stainig for nucleolar organizing regions of vertebrate chromosomes. *Stain Technology* (58), 51-55.
- Goulletquer, P. (1989). Mortalité hivernale chez la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum* sur le littoral atlantique: aspects biochimique et écophysiologique. *Haliotis* (19), 215-226.
- Grassé, P. (1960). *Traité de Zoologie*. Paris: Masson et Cie Editeurs.
- Guelorget, O., Mayere, C., & Amanieu, M. (1980). Croissance, biomasse et production *Venerupis decussata* et *Venerupis aurea* dans une lagune méditerranéenne, l'étang du Prévost à Palavas. *Vie Mar*, 2, 25-38.
- Hannant, P., & Holland, D. (1973). Addendum to a microanalytical scheme for the biochemical analysis of marine invertebrate larvae. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* (53), 833–838.
- Hassold, T., Jacobs, P., & Pettay, D. (1987). Analysis of nucleolar organizing regions in parents of trisomic spontaneous abortions. *Human Genetics* (76), 381-384.
- Holland, D., & Gabbot, P. (1971). Micro-analytical sheme for determination of protein, carbohydrate, lipid and RNA levels in marine invertebrate larvae. *Marine and Freshwater Biology* 51 (3), 659-668.
- Howell, W., & Black, D. (1980). Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with protective colloidal developer: a1-step method. *Experientia* (36), 1014-1015.
- Howell, W., Denton, T., & Diamond, J. (1975). Differential staining of the satellite regions of human acrocentric chromosomes. *Experientia* (31), 260-262.

- Hurtado, N., & Pasantes, J. (2005). Surface spreading of synaptonemal complexes in the clam *Dosinia exoleta* (Mollusca, Bivalvia). *Chromosome Research* (13), 575-580.
- Jordaens, K., De Wolf, H., Willems, T., Van Dongen, S., Brito, C., Martins, A., et al. (2000). Loss of genetic variation in a strongly isolated Azorean population of the edible clam, *Tapes decussatus*. *Journal of Shellfish Research* 19 (1), 29-34.
- Junqueira, L., & Carneiro, J. (1998). *Biologia Celular e Molecular* (7º ed. ed.). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Labarta, U., Fernandez-Reiriz, M., & Pérez-Camacho, A. (1999). Larvae of *Ostrea edulis* (L.) during starvation: growth, energy and biochemical substrates. *Hydrobiologia* (405), 125–131.
- Laing, I., Utting, S., & Kilada, R. (1987). Interactive effect of diet and temperature on the growth of juvenile clams. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* (113), 23-38.
- Lee Gould, S., & Martin De Leon, P. (1987). Brdu-Giemsa labeling studies of satellite association in parents of children with trisomic 21 or 13. *American Journal of Medical Genetics* (26), 971-981.
- Leitão, A., & Chaves, R. (2008). Banding for chromosomal identification in Bivalves: A 20-year history. *Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology*, 44-49.
- Leitão, A., Boudry, P., & Thiriot-Quiévreux, C. (2001). Negative correlation between aneuploidy and growth in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: ten years of evidence. *Aquaculture*, 39-48.
- Leitao, A., Boudry, P., Labat, J., & Thiriot-Quiévreux, C. (1999). Comparative Karyological study of cupped oysters species. *Malacologia*, 175-186.
- Leitão, A., Boudry, P., McCombie, H., Gérard, A., & Thiriot-Quiévreux, C. (2001). Experimental evidence for a genetic basis to differences in aneuploidy in the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*). *Aquatic Living Resources* (14), 233-237.

- Leitão, A., Chaves, R., Matias, D., Joaquim, S., Ruano, F., & Guedes-Pinto, H. (2006). Restriction enzyme digestion chromosome banding on two commercially important venerid bivalve species: *Ruditapes decussatus* and *Cerastoderma edule*. *Journal of Shellfish Research*, 857-863.
- Leitão, A., Chaves, R., Santos, S., Guedes-Pinto, H., & Boudry, P. (2007). Interspecific hybridization in oysters: Restriction Enzyme Digestion Chromosome Banding confirms *Crassostrea angulata*×*Crassostrea gigas* F1 hybrids. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* (343), 253–260.
- Leitão, A., Chaves, R., Santos, S., Guedes-Pinto, H., & Boudry, P. (2004). Restriction enzyme digestion chromosome banding in *Crassostrea* and *Ostrea* species: comparative karyological analysis within Ostreidae. *Genome* (47), 781–788.
- Levan, A., Fredga, K., & Sandberg, A. (1964). Nomenclature for centromere position in chromosomes. *Hereditas* (52), 201-220.
- Longwell, A., Stiles, S., & Smith, D. (1967). Chromosome complement of the American oyster *Crassostrea virginica* as seen in meiotic and cleaving eggs. *Journal Cytology and genetics* (9), 845-856.
- Lowry, O., Rosenbrough, N., Farr, A., & Randall, J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* (193), 265-275.
- Lucas, a., & Beninger, P. (1985). The use of physiological condition indices in marine bivalve aquaculture. *Aquaculture* (44), 187-200.
- Major, J., Jakab, M., & Tompa, A. (1998). The frequency of induced premature centromere division in human populations occupationally exposed to genotoxic chemicals. *Mutation Research* (445), 241-249.
- Makarevich, I. & Harris, C. (2010). Aneuploidy tissue.specific qualitative changes in global gene expression patterns in maize. *Plant Physiology*, pp.109.
- Malheiro, M., & Porto, B. (1999). *Cromatina e Cromossomas in Biologia Celular e Molecular*, Azevedo C (3º ed ed.). Porto: Lidel.

- Mann, R. (1978). A comparison of morphometric, biochemical and physiological indexes of condition in marine bivalve molluscs. In: Thorpe JH, Gibbons JW. (Eds), *Energy and Environmental Stress in Aquatic System. Technical Information Center, U.S. Dept of Energy, Oak Ridge, TN*, 484-497.
- Marin, M., Moschino, V., Dep pieri, M., & Luccheta, L. (2003). Variations in gross biochemical composition, energy value and condition index of *T. philippinarum* from the lagoon of Venice. *Aquaculture* (219), 859-871.
- Marsh, J., & Weinstein, D. (1966). Simple charring method for determination of lipids. *Journal of Lipid Research* (7), 574-576.
- Martin, R., & Rademaker, A. (1990). The frequency of aneuploidy among individual chromossomes in 6,821 human sperm chromosome complements. *Cytogenetics and Cell Genetics* (53), 103-107.
- Martinez-Lage, A., Gonzalez-Tizon, A., & Méndez, J. (1994). Characterization of different chromatin types of *Mytilus galloprovincialis* L. after C-banding, fluorochrome and restriction endonuclease treatments. *Heredity* (72), 242-249.
- Massapina, C., Joaquim, S., Matias, D., & Devauchelle, N. (1999). Oocyte and embryo quality in *Crassostrea gigas* (Portuguese strain) during a spawning period in Algarve, South Portugal. *Aquatic Living Resources* 12 (5), 327-333.
- Matias, D. (2007). *A cultura da amêijoia-boia (Ruditapes decussatus, L., 1758) em viveiros da Ria Formosa: Avaliação do crescimento e qualidade face a diferentes condições de cultura e situações ambientais*. Trabalho de síntese apresentado para provas de acesso à categoria de Assistente de Investigação, Instituto Nacional de Investigação Agrária e das Pescas. 96p.
- Matsui, S., Fuke, M., Chai, L., Sandberg, A., & Ellassouli, S. (1986). N-band proteins of nucleolar organizers: mapping, subnucleolar localization and rDNA binding. *Chromosoma* (93), 231-242.
- Monteiro, S., Reis, C., & Gonçalves, J. (1988). Crescimento da amêijoia-boia *Ruditapes decussatus* na Ria Formosa. *Actas do 5º congresso do Algarve* (pp. 485-490). Ed. Raca Club 1.

- Muzavor, S. (1991). *Roteiro ecológico da Ria Formosa* (Vols. I- Moluscos Bivalves). Faro: Algarve: Foco editora.
- [NCBI], N. C. (2009). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy>. Acedido a 18 Setembro, 2009 de NCBI em www.ncbi.nlm.nih.gov.
- Okumus, I., & Stirling, H. (1998). Seasonal variations in the meat weight, condition index and biochemical composition of mussels (*Mytilus edulis* L.) in suspended culture in two Scottish sea lochs. *Aquaculture*, 249-261.
- Parache, A. (1982). La Palourde. *La pêche maritime*, 496-507.
- Pérez-Camacho, A. (1979). Biología de *Venerupis pullastra* (Montagu, 1803) e de *Venerupis decussata* (Linné, 1907) com especial referencia a los factores determinantes de la producción. *Boletim do Instituto Espanhol de Oceanografia* (5), 47-76.
- Potiers, J. (1987). Bivalves. In: Fisher W, Bauchot ML, Schneider M. (Eds), *Fiches FAO de identification de espèces pour les besoins de la pêche. Méditerranée et Mer Noire. Zone de pêche 37*. (Vols. Végétaux et invertébrés I, FAO, Rome, 500-513).
- Ramírez, P., Eastmond, D., Laclette, J., & Ostrosky-Wegman, P. (1997). Disruption of microtubule assembly and spindle formation as a mechanism for the induction of aneuploid cells by sodium arsenite and vanadium pentoxide. *Mutation Research* (386), 191-298.
- Rasnick, D. & Duesberg, P.H. (1999). How aneuploidy affects metabolic control and causes cancer. *Biochemical Journal* (340), 621-630.
- Robert, R., Trut, G., & Laborde, J. (1993). Growth, reproduction and gross biochemical composition of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* in the Bay of Arcachon, France. *Marine Biology* (116), 291-299.
- Rodiles, A. (2004). *Protección del cultivo de almeja japonesa (Ruditapes philippinarum, Adams & Reeve, 1850) cultivada a alta densidad en la zona intermareal*. Tese de Mestrado, Universidad Cádiz. 79 p.

- Royo, A. (1986). *Estudios sobre el cultivo de Ruditapes decussatus (Linné, 1758) (Mollusca, Bivalvia) en la zona intermareal de la provincia de Huelva*. Tesis de doctorado, Universidad de Sevilla, 298p.
- Ruiz, C., Abad, M., Rodriguez, T., & Sanchez, J. (1990). Variacion estacional en la condicion, actividade reproductora y composicion bioquímica en *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Actas III Congreso Nacional Acuicultura*, 421-426.
- Sánchez, J. (1992). *Guia para a identificação de pescado de Portugal submetido a tamanho mínimo de captura*. Publicações avulsas do INIP, 18, 272p.
- Schwartz, D. (1984). *Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes*. Paris: 8 Ed., Flammarion Médecine-sciences, 318 p.
- Schwarzacher, H., & Wachtker, F. (1983). Nucleolus organizer regions and nucleoli. *Human Genetics* (63) , 89-99.
- Snedcor, G., & Cochran, W. (1980). *Statistical methods*. Ames Iowa, U.S.A.: 7 eds., The Iowa State University Press, 507 p.
- Stiles, S., & Longwell, A. (1973). Fertilization, meiosis and cleavage in eggs from large mass spawnings of *Crassostrea virginica* Gmelin, the commercial American oyster. *Caryologia* (26), 253-262.
- Sumner, A. (1990). Chromosome Banding. *Unwing Hyman Ltd* .
- Thiriot-Quiévreux, C. (1986). Étude de l'aneuploidie dans différents naissains d'Ostreidae (Bivalvia) et de Gastéropodes marins. *Genetica* (70), 225-231.
- Thiriot-Quiévreux, C., & Ayraud, N. (1982). Les caryotypes de quelques espèces de Bivalves et de Gastéropodes marins. *Marine Biology* (70), 165-172.
- Thiriot-Quiévreux, C., & Insua, A. (1992). Nucleolar organiser region variation in the chromosomes of three oysters species. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* (157), 33-40.

- Thiriot-Quiévreux, C., Noel, T., Bougrier, S., & Dallot, S. (1988). Relationships between aneuploidy and growth rate in pair matings of the oyster *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* (75), 89-96.
- Thiriot-Quiévreux, C., Pogson, G., & Zouros, E. (1992). Genetics of growth rate variation in bivalves: aneuploidy and heterozygosity effects in a *Crassostrea* family. *Genome* (35), 39-45.
- Toro, J., Paredes, P., Villagra, D., & Senn, C. (1999). Seasonal variation in the phytoplanktonic community, seston and environmental variables during a 2-year period and oyster growth at two mariculture sites, southern Chile. *Marine Ecology* 20 (1), 63-89.
- Valence, P., & Peyre, R. (1989). The clam culture. *Paris France Technique Et Documentation Lavoisier*, 399-433.
- Verma, R. (1988). *Heterochromatine: Molecular and Structural aspects*. New York: Cambridge University Press.
- Verma, R. (1983). Preferential association of nucleolar organising human chromosomes as revealed by silver staining technique at mitosis. *Molecular and General Genetics* (190), 352-354.
- Verma, R. (1990). *The Genome*. VCH Publishers incorporated.
- Vilela, H. (1950). Vida bentónica de *Tapes decussatus* (L.). *Travaux de la station de Biologie Maritime de Lisbonne* 13, 1-120.
- Walne, P. (1976). Experiments on the culture in the sea of the butterfish *Venerupis decussata*. *Aquaculture* (8), 371-381.
- Wang, Y., & Guo, X. (2001). Chromosomal mapping of the vertebrate telomeric sequence (TTAGGG) in four bivalve molluscs by fluorescence in situ hybridization. *Journal of Shellfish Research* (20), 1187-1190.
- Wenger, S., Golden, W., Dennis, S., & Steele, M. (1984). Are the occasional aneuploid cells in peripheral blood cultures significant? *American Journal of Medical Genetics* (19), 715-719.

Winer, B., Brown, D., & Michels, K. (1991). *Statistical Principles in Experimental Design*. New York: 3rd ed. McGraw-Hill. 928 p.

Zar, J. (1984). *Biostatistical Analysis*. New Jersey: Prentice Hall, Inc 718 p.

Índice Remissivo

A

açúcares redutores livres, 20, 28, 29, 30, 42, 43, 53

Ag-NOR, 71

Ag-NORs, 60, 65, 66, 75, 77

amêijoia-boia, 13, 22, 23, 31, 77

aneuploidia, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 21, 24, 34, 45, 46, 47, 48, 49, 51, 54, 55, 56, 57, 67, 70, 71, 73, 74, 75, 77

C

cariótipo, 16, 18, 20, 33, 59, 60, 61, 62, 64, 65, 66, 67, 71, 73, 75, 77

cohort, 14, 15, 22

colquicina, 31

composição bioquímica, 20, 21, 27

crescimento, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 21, 25, 26, 37, 47, 51, 53, 54, 55, 56, 57, 71, 72, 75, 77

cromossomas, 14, 16, 18, 19, 20, 31, 32, 33, 34, 55, 59, 60, 61, 62, 64, 65, 66, 67, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 77

E

enzimas de restrição, 16, 60, 63, 64, 67, 71, 75, 77

F

Fast-Growers, 14, 15, 16, 21, 22, 27, 34, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 51, 52, 53, 54, 55, 77

fosfolípidos, 20, 27, 30, 41, 42, 50, 53, 54, 56

H

hidratos de carbono, 20, 21, 27, 28, 29, 30, 39, 40, 42, 52, 53

I

índice de condição, 15, 16, 21, 24, 26, 38, 39, 49, 50, 51, 52, 54, 56, 77

L

lípidos, 20, 21, 27, 28, 29, 30, 39, 40, 41, 42, 48, 49, 50, 52, 53, 54, 56

M

matéria orgânica, 30, 39, 40, 53

Medium-Growers, 16, 21, 22, 26, 27, 34, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 51, 52, 53, 55, 77

metafase, 18, 31, 33, 34, 45, 46, 59, 62, 63, 64, 65, 74, 75

N

NOR, 59, 60, 63, 65, 71, 73, 75, 77

P

polissacarídeos, 20, 27, 30, 42, 43, 52, 53

proteínas, 27, 28, 29, 30, 39, 52, 59

S

Slow-Growers, 14, 15, 16, 21, 22, 26, 27, 34, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 51, 52, 53, 54, 55, 77

V

valor energético, 21, 49, 50, 56

Apêndice

Tabela A.I- Medições biométricas, percentagens de aneuploidia e respectivas médias finais dos indivíduos de todos os grupos, já com o reconhecimento de ‘outliers’, em T₀.

Tipo	Animal	Peso (g)	Comprimento (mm)	% Aneuploidia
F A S T	1F(2)	0,176	9,9	0
	2F(2)	0,17	9,9	0
	3F(2)	0,192	10,2	5,882352941
	4F(2)	0,184	10,2	8,333333333
	5F(2)	0,124	9,2	16,66666667
	6F(2)	0,202	10,3	35
	7F(2)	0,181	10	11,11111111
	8F(2)	0,129	9,1	0
	9F(2)	0,191	10,2	19,14893617
	10F(2)	0,184	10	35,71428571
	11F(2)	0,447	14,3	35
	12F(2)	0,127	8,9	30,3030303
	13F(2)	0,108	8,6	6,666666667
	14F(2)	0,079	7,6	22,22222222
	15F(2)	0,113	8,2	40
	16F(2)	0,168	9,7	20
	17F(2)	0,202	10,2	20
	18F(2)	0,094	8,3	16,66666667
	19F(2)	0,075	7,4	6,25
	20F(2)	0,155	9,3	25
	Média Total	0,16505	9,575	19,69309463
M E D I U M	1M(2)	0,068	7,2	57,14285714
	2M(2)	0,043	6,1	33,33333333
	3M(2)	0,039	5,5	54,54545455
	4M(2)	0,057	7	57,14285714
	5M(2)	0,057	7	36,92307692
	6M(2)	0,039	6,2	0
	7M(2)	0,087	7,7	33,33333333
	8M(2)	0,057	6,6	20
	9M(2)	0,075	7,3	23,80952381
	10M(2)	0,083	7,8	54,05405405
	11M(2)	0,076	7,5	33,33333333
	12M(2)	0,059	7	0
	13M(2)	0,057	6,3	100
	14M(2)	0,056	6,7	36,36363636
	15M(2)	0,039	6	52,38095238
	16M(2)	0,042	6	0
	17M(2)	0,035	5,7	62,5
	18M(2)	0,033	5,2	
	19M(2)	0,066	7	66,66666667
	20M(2)	0,041	5,8	
	Média Total	0,05545	6,58	42,56198347

S L O W	1S(1)	0,015	4,2	75
	2S(1)	0,015	4,1	
	3S(1)	0,011	3,6	100
	4S(1)	0,009	3,2	
	5S(1)	0,007	3	
	6S(1)	0,012	3,6	66,66666667
	7S(1)	0,007	3	100
	8S(1)	0,005	2,7	100
	9S(1)	0,014	4,2	
	10S(1)	0,011	3,5	
	11S(1)	0,016	4,3	66,66666667
	12S(1)	0,013	3,9	100
	13S(1)	0,01	3,7	33,33333333
	14S(1)	0,006	2,7	83,33333333
	15S(1)	0,013	4	
	16S(1)	0,008	3,2	100
	17S(1)	0,01	3,6	75
	18S(1)	0,013	3,9	
	19S(1)	0,007	3,1	
	20S(1)	0,017	4,3	
	21S(1)	0,004	2,4	
	22S(1)	0,006	2,9	75
	23S(1)	0,007	3	
	24S(1)	0,027	5,1	100
	25S(1)	0,01	3,2	
	26S(1)	0,009	3,2	
	27S(1)	0,015	4	
	28S(1)	0,011	3,8	
	29S(1)	0,013	3,9	
	30S(1)	0,009	3,5	100
	31S(1)	0,007	2,9	0
	32S(1)	0,005	2,8	
	33S(1)	0,009	3,2	100
	34S(1)	0,01	3,5	100
	35S(1)	0,013	4	100
	36S(1)	0,006	2,9	100
	37S(1)	0,006	2,9	
	38S(1)	0,008	3,2	0
	39S(1)	0,012	3,8	100
	40S(1)	0,004	2,4	0
	41S(1)	0,009	3,3	
	42S(1)	0,005	2,6	
	43S(1)	0,006	2,8	
	44S(1)	0,007	3	
	45S(1)	0,008	3,3	
	46S(1)	0,007	3,1	
	47S(1)	0,005	2,5	
	48S(1)	0,009	3,2	
	49S(1)	0,006	2,7	
	Média Total	0,0096327	3,365306122	78,68852459

Tabela A.II- Medições biométricas, percentagens de aneuploidia e respectivas médias finais dos indivíduos de todos os grupos, já com o reconhecimento de ‘outliers’, em T₁.

Tipo	Animal	Peso (g)	Comprimento (mm)	% Aneuploidia
F A S T	1F(2)	1,9248	21,08	0
	2F(2)	1,6443	19,84	0
	3F(2)	1,4985	18,71	18,60465116
	4F(2)	1,2772	18,47	0
	5F(2)	1,3094	19,9	40
	7F(2)	0,5624	13,52	0
	9F(2)	0,451	12,5	
	11F(2)	1,1476	18,68	5,882352941
	12F(2)	1,0102	17,44	20
	13F(2)	1,236	18,28	0
	14F(2)	0,9371	16,43	33,33333333
	15F(2)	0,7897	15,66	21,42857143
	16F(2)	0,9005	16,56	12,5
	17F(2)	1,0345	17,53	22,22222222
	18F(2)	0,9671	16,98	36,36363636
	19F(2)	1,1503	18,29	20
	20F(2)	1,3282	18,85	25
	21 F(2)	1,0314	17,25	20
	22F(2)	1,0832	17,54	37,5
	Média Total	1,1201789	17,55315789	18,71345029
M E D I U M	1M(2)	0,4548	12,87	28,57142857
	2M(2)	0,2766	10,42	0
	3M(2)	0,6485	14,4	27,27272727
	4M(2)	0,2475	9,68	30
	5M(2)	0,4086	12,07	16,66666667
	6M(2)	0,2945	10,96	16,66666667
	7M(2)	0,7964	15,78	13,33333333
	8M(2)	0,4066	12,38	0
	9M(2)	0,296	10,72	30,76923077
	10M(2)	0,4173	12,5	40
	11M(2)	0,3935	12,48	100
	12M(2)	0,4026	12,15	83,33333333
	13M(2)	0,6284	14,87	39,28571429
	14M(2)	0,2039	9,63	0
	15M(2)	0,1772	8,54	20
	16M(2)	0,2705	10,95	40
	17M(2)	0,2915	10,94	33,33333333
	18M(2)	0,2927	11,02	0
	19M(2)	0,1988	9,07	100
	20M(2)	0,2955	10,85	0
	21M(2)	0,2399	9,81	
	22M(2)	0,3963	12,08	36,36363636
	6F(2)	0,3441	11,36	0
	8F(2)	0,3261	11,21	25
	10F(2)	0,4146	12,10	
	Média Total	0,364896	11,53083333	31,25

S L O W	1S(1)	0,0528	5,32	
	2S(1)	0,0561	6,51	80
	3S(1)	0,0558	5,52	66,66666667
	4S(1)	0,0781	6,6	100
	5S(1)	0,1049	7,27	42,85714286
	6S(1)	0,0481	5,23	
	7S(1)	0,0423	4,76	
	8S(1)	0,0463	4,94	50
	9S(1)	0,0539	5,38	0
	10S(1)	0,0527	5,62	
	11S(1)	0,0497	5,14	
	12S(1)	0,0698	6,29	0
	13S(1)	0,0564	5,53	75
	14S(1)	0,045	5,22	
	15S(1)	0,0611	5,58	
	16S(1)	0,0533	5,3	
	17S(1)	0,1184	7,62	40
	18S(1)	0,0536	5,48	40
	19S(1)	0,0636	5,85	
	20S(1)	0,0484	5,54	
	21S(1)	0,0394	4,82	33,33333333
	22S(1)	0,0566	5,59	43,75
	23S(1)	0,0434	4,44	
	24S(1)	0,1213	7,92	
	25S(1)	0,0532	5,38	
	26S(1)	0,0856	6,6	
	27S(1)	0,0959	7,1	
	28S(1)	0,0771	6,27	50
	29S(1)	0,0683	6,16	50
	30S(1)	0,0576	5,54	80
	31S(1)	0,1551	8,28	100
	32S(1)	0,0376	4,73	
	33S(1)	0,0745	6,04	57,14285714
	34S(1)	0,0489	5,28	
	35S(1)	0,0869	6,68	
	36S(1)	0,0719	6,37	50
	37S(1)	0,0693	5,9	
	38S(1)	0,0645	5,89	
	39S(1)	0,061	5,9	
	40S(1)	0,0689	6,53	
	41S(1)	0,0628	5,8	40
	42S(1)	0,0517	6,01	
	43S(1)	0,0663	5,14	50
	44S(1)	0,0566	6,13	100
	45S(1)	0,0535	6,62	
	46S(1)	0,0638	6,8	
	47S(1)	0,0504	6,53	100
	48S(1)	0,0551	6,62	60
	49S(1)	0,0554	6,68	66,66666667
	50S(1)	0,0422	6,04	
	51S(1)	0,0334	5,53	
	52S(1)	0,0316	6,32	
	53S(1)	0,034	5,63	
	54S(1)	0,0127	3,89	0
	55S(1)	0,0216	4,63	
	56S(1)	0,0162	4,24	
	57S(1)	0,0055	3,02	
	58S(1)	0,0098	4,4	
	59S(1)	0,016	4,73	50
	60S(1)	0,0107	4,13	
	61S(1)	0,0104	4,17	100
	62S(1)	0,0161	4,59	
	Média Total	0,0552113	5,705967742	56,14035088

Tabela A.III- Medições biométricas, percentagens de aneuploidia e respectivas médias finais dos indivíduos de todos os grupos, já com o reconhecimento de ‘outliers’, em T₂

Tipo	Animal	Peso (g)	Comprimento (mm)	% Aneuploidia
F A S T	1F(2)	1,4395	19,43	8,333333333
	2F(2)	1,8096	20,98	30
	3F(2)	1,8824	20,83	8,771929825
	4F(2)	0,9412	16,65	0
	5F(2)	2,0349	22,6	5
	6F(2)	0,8599	15,77	18,75
	7F(2)	1,4258	18,33	16,66666667
	8F(2)	1,3797	18,5	25
	9F(2)	1,1846	17,62	0
	10F(2)	0,9438	15,84	66,66666667
	11F(2)	0,8142	15,04	21,42857143
	13F(2)	2,36	23,41	20
	14F(2)	1,2363	17,91	12,5
	15F(2)	1,5404	19,56	14,28571429
	16F(2)	1,4878	19,82	41,37931034
	17F(2)	1,6739	20,03	0
	18F(2)	0,8153	15,12	0
	19F(2)	0,9299	16,21	0
	20F(2)	1,2121	16,89	
	22F(2)	1,6531	19,88	34,21052632
	14M(2)	0,9336	16,38	42,85714286
	15M(2)	1,2859	18,36	66,66666667
	17M(2)	0,9152	16,23	28,57142857
	Média Total	1,3373522	18,32130435	20,59701493
M E D I U M	1M(2)	0,7293	14,48	23,52941176
	2M(2)	0,7077	14,9	20
	3M(2)	0,3028	10,61	
	4M(2)	0,3767	11,84	29,41176471
	5M(2)	0,3678	11,66	13,33333333
	6M(2)	0,5825	13,36	33,33333333
	7M(2)	0,7952	15,26	
	8M(2)	0,2195	9,33	40
	9M(2)	0,6931	14,7	35,71428571
	10M(2)	0,7018	14,48	57,14285714
	11M(2)	0,651	14,67	66,66666667
	12M(2)	0,1924	8,76	0
	13M(2)	0,6252	14,15	100
	16M(2)	0,6377	13,65	
	18M(2)	0,4278	12,01	33,33333333
	19M(2)	0,653	14,42	0
	20M(2)	0,251	10,02	
	21M(2)	0,6039	13,85	33,33333333
	22M(2)	0,5576	13,64	25
	12F(2)	0,6631	14,31	16,66666667
	21F(2)	0,5992	13,88	18,18181818
	Média Total	0,539919	13,04666667	37,5

S L O W	1S(1)	0,0576	5,67	0
	2S(1)	0,0191	4,21	
	3S(1)	0,0853	6,68	
	4S(1)	0,06	5,56	
	5S(1)	0,0184	2,91	0
	6S(1)	0,0239	3,99	66,66666667
	7S(1)	0,1042	7,13	66,66666667
	8S(1)	0,0198	3,33	
	9S(1)	0,0169	4,68	
	10S(1)	0,0193	3,94	16,66666667
	11S(1)	0,0347	4,6	50
	12S(1)	0,023	4,72	
	13S(1)	0,0324	4,3	
	14S(1)	0,1237	7,58	42,85714286
	15S(1)	0,0289	3,93	33,33333333
	16S(1)	0,0378	4,98	100
	17S(1)	0,0341	4,3	
	18S(1)	0,0328	4,96	
	19S(1)	0,0198	3,76	
	20S(1)	0,0191	3,35	
	21S(1)	0,0361	4,74	
	22S(1)	0,0274	3,86	0
	23S(1)	0,0231	4,02	
	24S(1)	0,0487	5,13	
	25S(1)	0,0625	5,83	
	26S(1)	0,0837	6,43	
	27S(1)	0,0212	3,82	
	28S(1)	0,0308	3,9	
	29S(1)	0,0787	6,09	
	30S(1)	0,0509	4,92	
	31S(1)	0,0109	2,38	
	32S(1)	0,0393	4,83	0
	33S(1)	0,0289	4,17	
	34S(1)	0,0367	4,28	0
	35S(1)	0,0556	5,42	50
	36S(1)	0,0377	4,53	0
	37S(1)	0,0093	2,57	27,77777778
	38S(1)	0,0308	4,32	
	39S(1)	0,0215	3,86	
	40S(1)	0,0096	2,54	70
	41S(1)	0,032	4,22	0
	42S(1)	0,0217	3,41	
	43S(1)	0,0171	2,97	100
	44S(1)	0,011	1,85	
	45S(1)	0,0412	4,35	100
	46S(1)	0,0522	4,94	58,33333333
	47S(1)	0,0136	2,65	100
	48S(1)	0,0203	3,66	
	49S(1)	0,0341	4,45	
	50S(1)	0,046	4,92	
	51S(1)	0,0141	2,97	
	52S(1)	0,0293	4,23	
	53S(1)	0,0102	2,89	
	54S(1)	0,0325	4,17	
	55S(1)	0,0304	3,88	
	56S(1)	0,0147	3,03	
	57S(1)	0,0419	5,3	
	58S(1)	0,0156	2,95	
	59S(1)	0,0141	3,11	
	60S(1)	0,006	1,73	
	Média Total	0,0342033	4,273275862	41,37931034

Tabela A.IV- Percentagem de perda nos diferentes pares cromossómicos que apresentaram cromossomas ausentes. A negrito encontram-se representados os pares com uma perda preferencial em casos de aneuploidia, na espécie *R. decussatus*.

Par nº	cariótipos aneuploides					% Total	% de perda			
	2n=34	2n=35	2n=36	2n=37	Total		% 2n=34	% 2n=35	% 2n=36	% 2n=37
1	4	2	3	2	11	36,6667	80	40	30	20
5	0	1	0	0	1	3,33333	0	20	0	0
6	4	1	2	1	8	26,6667	80	20	20	10
7	3	1	1	0	5	16,6667	60	20	10	0
8	0	1	0	0	1	3,33333	0	20	0	0
9	1	0	2	0	3	10	20	0	20	0
10	0	1	0	0	1	3,33333	0	20	0	0
12	2	2	5	3	12	40	40	40	50	30
13	1	0	0	0	1	3,33333	20	0	0	0
14	0	1	0	0	1	3,33333	0	20	0	0
15	1	0	0	1	2	6,66667	20	0	0	10
17	0	1	0	0	1	3,33333	0	20	0	0
19	3	1	7	3	14	46,6667	60	20	70	30
Total cariótipos	5	5	10	10						

Tabela A.V- Coeficientes de correlação das relações encontradas entre os vários parâmetros estudados.

		Peso (g)	Comprimento (mm)	I.C.	Bioquímica							Aneuploidia	
					Proteínas	H.C.	A.R.L.	Polissacarídeos	Lípidos totais	Lípidos Neutros	Fosfolípidos		Valor energético
Peso (g)		1,000	0,952	0,650	-0,390	-0,448	-0,220	-0,307	-0,019	-0,659	0,685	-0,438	-0,648
Comprimento (mm)		0,952 **	1,000	0,778	-0,400	-0,376	-0,081	-0,338	-0,052	-0,702	0,684	-0,418	-0,781
I.C.		0,650	0,778 *	1,000	-0,626	-0,122	0,154	-0,292	0,278	-0,368	0,802	-0,243	-0,787
Bioquímica	Proteínas	-0,390	-0,400	-0,626	1,000	0,110	-0,104	0,302	-0,252	0,190	-0,573	0,484	0,372
	H.C.	-0,448	-0,376	-0,122	0,110	1,000	0,716	0,458	0,484	0,583	0,073	0,729	0,525
	A.R.L.	-0,220	-0,081	0,154	-0,104	0,716 *	1,000	-0,269	0,524	0,489	0,232	0,567	0,111
	Polissacarídeos	-0,307	-0,338	-0,292	0,302	0,458	-0,269	1,000	-0,108	0,056	-0,218	0,212	0,435
	Lípidos totais	-0,019	-0,052	0,278	-0,252	0,484	0,524	-0,108	1,000	0,726	0,668	0,666	0,113
	Lípidos Neutros	-0,659 *	-0,702 *	-0,368	0,190	0,583	0,489	0,056	0,726 *	1,000	-0,027	0,809	0,595
	Fosfolípidos	0,685 *	0,684 *	0,802 **	-0,573	0,073	0,232	-0,218	0,668 *	-0,027	1,000	0,093	-0,479
	Valor energético	-0,438	-0,418	-0,243	0,484	0,729 *	0,567	0,212	0,666 *	0,809 **	0,093	1,000	0,484
Aneuploidia		-0,648	-0,781 *	-0,787 *	0,372	0,525	0,111	0,435	0,113	0,595	-0,479	0,484	1,000

* = 0,01 < p < 0,05

** = p < 0,01

Nível de significância = 7