

LUIS FELIPE SANTOS MANVAILER

CONTRIBUIÇÃO À CITOGENÉTICA DA ESPÉCIE *Hypostomus albopunctatus*
(SILURIFORMES, LORICARIIDAE, HYPOSTOMINAE) PERTENCENTES À BACIA
DO ALTO RIO PARANÁ

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada junto à disciplina de Estágio em Genética (BG 016), do curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marta Margarete Cestari

CURITIBA
2008

LUIS FELIPE SANTOS MANVAILER

CONTRIBUIÇÃO À CITOGENÉTICA DA ESPÉCIE *Hypostomus albopunctatus*
(SILURIFORMES, LORICARIIDAE, HYPOSTOMINAE) PERTENCENTES À BACIA
DO ALTO RIO PARANÁ

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada junto à disciplina de Estágio em Genética (BG 016), do curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marta Margarete Cestari

CURITIBA
2008

Dedico este trabalho à minha família, principalmente aos meus pais, e aos meus amigos, os quais me apoiaram ao longo de todos esses anos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à minha família, principalmente aos meus pais que tanto amo.

À orientadora Prof^a Dr^a e amiga Marta Margarete Cestari, com quem aprendi muito sobre genética, objetivos a serem traçados e determinação em cumprir-los.

A todo o pessoal do laboratório de citogenética de peixes e mutagênese: Luiz Fernando, Rafael Noleto, Wanessa, Rafael Balen, Nédia, Gabrielli, Marcos, Laercio, Cristina, Thaynah, Thaís, Felipe e Margarete.

Ao Rafael Noleto, pela paciência que tenho exigido, principalmente dele, ao longo deste tempo, por todas as explicações fornecidas em meio a alguns “Não se *invorva!*” e boa quantidade de compreensão.

Aos meus grandes amigos de bagunça: Luiz Fernando (Cabelo), Laércio (Xaxim), Marcel (Topre), Felipe (Charuto), Rodrigo Schu (Schu), Jeferson (Japa), David (Véia), Rodrigo Neher (Milico) e Rafael (Noleto).

A todos os colegas que participaram de alguma forma na minha vida acadêmica, tornando-a muito divertida!!

“Sábio é aquele que conhece os limites da própria ignorância.”

(Sócrates)

RESUMO

A Bacia do Alto Rio Paraná passou por inúmeras atividades tectônicas desde o início da sua formação, propiciando a captura de cabeceiras que resultou na distribuição de algumas espécies em drenagens vizinhas. A construção do reservatório de Itaipu fez necessária a inundação do Salto de Sete Quedas, deixando de ser uma barreira geográfica entre as espécies da ictiofauna ali presente propiciando sua dispersão. Os peixes representam o grupo mais diversificado e um dos mais importantes para estudos da variabilidade genética e de evolução entre os vertebrados, uma vez que ocupam uma posição basal na filogenia deste grande grupo. Ao longo do tempo o desenvolvimento das técnicas citogenéticas permitiu maior contribuição na compreensão das relações filogenéticas entre indivíduos e principalmente compreender mais efetivamente a estrutura cromossômica. Doze exemplares de *Hypostomus albopunctatus* provenientes do Rio Laranjinha, situado em Sapopema – PR, foram analisados citogeneticamente. Foi observado um $2n = 76$, porém, tanto o número fundamental quanto a estrutura cariotípica mostraram-se diferentes entre os exemplares. As estruturas cariotípicas encontradas foram 10m,14sm,42st,10a para machos e 10m,14sm,41st,11a para fêmeas. Um sistema sexual do tipo ZW foi detectado, inédito até então para a espécie. Marcas conspicuas teloméricas, centroméricas e intersticiais foram obtidas por bandamento C, aplicação de fluorocromos e enzima de restrição. Um par simples de RONS foi detectado sendo confirmado por FISH. Pela aplicação das técnicas de citogenética clássica e molecular foi possível comparar os resultados obtidos com os da literatura, sendo necessários estudos mais aprofundados para este grupo por apresentar tendências distintas de evolução cariotípica.

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	ii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Aspectos gerais da região de estudo.....	1
1.2. Aspectos gerais e citogenéticos da ictiofauna neotropical.....	1
1.3. Aspectos gerais e citogenéticos da família Loricariidae.....	2
1.3.1. Aspectos gerais e citogenéticos da subfamília Hypostominae.....	3
1.4. Auxílio da citogenética clássica e molecular na taxonomia de peixes.....	4
2. OBJETIVOS.....	8
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	9
3.1 Materiais.....	9
3.2 Métodos.....	9
3.2.1. Obtenção de cromossomos mitóticos.....	9
3.2.2. Método da coloração convencional Giemsa.....	10
3.2.3. Detecção da heterocromatina constitutiva – Bandas C	10
3.2.4. Detecção das Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONs).....	11
3.2.5. Dupla coloração CMA ₃ /DAPI.....	12
3.2.6. Clivagem com Endonuclease de Restrição.....	12
3.2.7. Hibridação Fluorescente <i>in situ</i> (FISH) com sonda rDNA 18S.....	13
3.2.8. Captura de imagens.....	14
3.2.9. Identificação dos cromossomos e montagem dos cariótipos.....	15
4. RESULTADOS.....	16
5. DISCUSSÃO.....	23
7. CONCLUSÃO.....	29
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Sistema do Alto Rio Paraná e bacias adjacentes, LANGEANI, 2007 ..	2
Figura 02: Localização do município de Sapopema – PR, http://pt.wikipedia.org	9
Figura 03: Exemplar de <i>Hypostomus albopunctatus</i> , www.planetcatfish.com	17
Figura 04: Metáfases de <i>H. albopunctatus</i> coradas com Giemsa.....	18
Figura 05: Metáfases tratadas com a técnica de Bandamento C.....	19
Figuras 06: Metáfases tratadas com a enzima de restrição <i>Alu I</i>	20
Figuras 07: Metáfases coradas com fluorocromos.....	21
Figura 08: Metáfases tratada com AgNO ₃	22
Figura 09: Metáfase tratada com a técnica FISH.....	22

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais da região de estudo

Devido às atividades tectônicas que o Alto do Paraná vêm passando desde o início do Terciário, esta região tornou-se uma área complexa (AB'SABER, 1998). A adição destas atividades com o complexo sistema de falhas existentes na região resultou em inúmeros eventos de captura de cabeceiras resultando na distribuição de algumas espécies em drenagens vizinhas (LANGEANI, 1989; WEITZMAN; MALABARBA, 1999; RIBEIRO, 2006; RIBEIRO, 2006; SERRA; CARVALHO; LANGEANI, 2007). Algumas conexões podem ter ocorrido em certas porções do Alto Paraná, necessitando tanto de estudos filogenéticos quanto de estudos biogeográficos aprofundados dos grupos de peixes presentes nesta bacia e ainda nas bacias adjacentes (LANGEANI, 2007). Ainda segundo LANGEANI, 2007 o Alto Paraná compreende uma área de história singular compartilhando esta história com drenagens vizinhas em eventos pretéritos.

Com a construção do reservatório de Itaipu e conseqüente inundação do Salto de Sete Quedas, este deixou de ser uma barreira geográfica, propiciando ainda mais a dispersão de espécies do médio Paraná para os trechos a montante, unindo populações anteriormente alopátricas. BONETTO (1986) cita a ocorrência de 130 espécies de peixes na região do Rio Paraná Superior, enquanto que AGOSTINHO *et al.* (1997) mencionam 250 espécies em trabalhos recentes, sendo esta discrepância, quanto ao número de espécies, provavelmente devido ao enchimento do Reservatório de Itaipu. Aproximadamente 80% das espécies são exclusivas desta bacia hidrográfica e não existem em qualquer outra parte do planeta (AGOSTINHO; GOMES, 1997).

GÉRY, 1969 afirma que esta bacia é caracterizada como uma província ictiofaunística natural, sendo também apresentada pela mesma um inequívoco endemismo (BRITSKI; LANGEANI, 1988; VARI, 1988; LANGEANI, 1989; CASTRO *et al.*, 2003; WEITZMAN; BURNS, 2003).

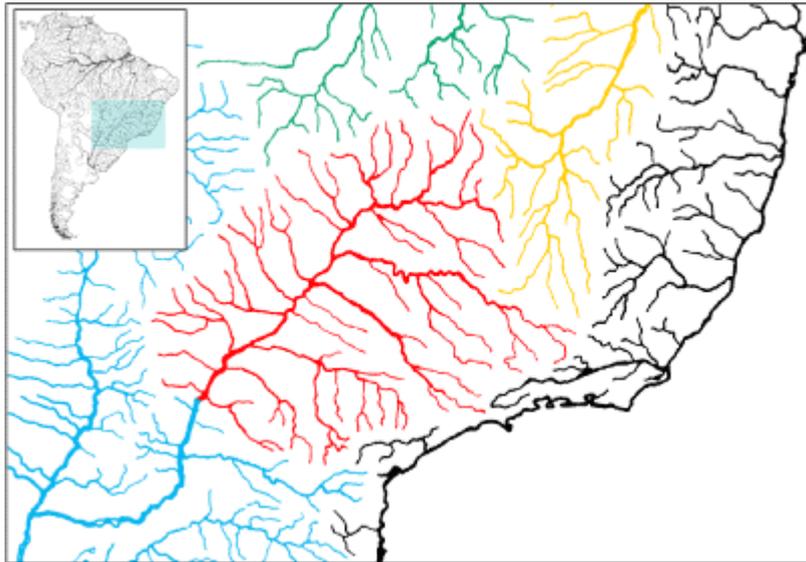


Figura 1: Sistema do Alto rio Paraná (vermelho) e bacias vizinhas do Paraguai e Baixo Paraná (azul), Araguaia/Tocantins (verde), São Francisco (amarelo) e rios costeiros (pretos).

1.2 Aspectos gerais e citogenéticos da ictiofauna neotropical

Segundo VARI e MALABARBA (1998) 30 a 40% de toda a diversidade existente na ictiofauna neotropical não foi até o momento reconhecida. Apesar disto peixes representam o grupo mais diversificado e um dos mais importantes para estudos da variabilidade genética e de evolução entre os vertebrados, uma vez que ocupam uma posição basal na filogenia deste grande grupo (NELSON, 1994).

A ictiofauna dulcícola é considerada altamente diversificada, sendo que aproximadamente 25% de toda a diversidade mundial de peixes está presente na América do Sul e América Central (VARI; MALABARBA, 1998).

Com o desenvolvimento e a utilização de novas técnicas para análise cromossômica, um considerável avanço contribuiu não apenas para construções ou análises filogenéticas e taxonômicas, mas principalmente a uma melhor compreensão da estrutura cromossômica (ANDREATA, 1991).

Sabe-se, que a diversidade cariotípica de peixes dulcícolas neotropicais varia de $2n = 20$ cromossomos para *Ptelolebias longipinnis* à $2n = 134$ cromossomos para *Corydoras aeneus* (OLIVEIRA; ALMEIDA-TOLEDO; FORESTI, 2000), podendo ser encontrados desde sistemas sexuais, tanto simples quanto múltiplos, até

polimorfismos numéricos e estruturais. Devido ao fato dos peixes não apresentarem cromossomos sexuais na base da sua filogenia, ao contrário das aves e mamíferos, infere-se que este caráter provavelmente surgiu de forma independente e repetida na história evolutiva dos Siluriformes (ARTONI; VICARI; BERTOLLO, 2000).

1.3 Aspectos gerais e citogenéticos da família Loricariidae

A família Loricariidae apresenta aproximadamente 690 espécies e cerca de 300 outras espécies ainda não descritas (REIS; KULLANDER; FERRARIS JR, 2003) e faz parte de uma das 34 famílias pertencentes à ordem Siluriformes (NELSON, 1994). Os peixes pertencentes a esta família são comumente conhecidos como cascudos ou ainda limpa-vidros e habitam quase toda a América do Sul e América Central, desde a Costa Rica até a Argentina. Dentro desta família o número diplóide pode variar de $2n = 36$ (*Rineloricaria latirostris*) a $2n = 80$ cromossomos (*Hypostomus* sp. E) (RAVEDUTTI; JULIO Jr., 2001).

Esta é uma das maiores famílias de peixes do mundo, com seis subfamílias (ISBRUCKER, 1981) sendo elas: Lithogeneinae, com 03 espécies (PROVENZANO et al., 2003); Neoplecostominae com 07 (FERRARIS, 2003); Hypoptopomatinae, com 79 (SCHAEFER, 2003); Loricariinae, com (FERRARIS, 2003); Hypostominae, com 169 (WEBER, 2003) e Ancistrinae, com 217 espécies (FISCH-MULLER, 2003). Destas, foi considerada a mais basal a subfamília Lithogeneinae (SCHAEFER, 2003), sendo seguida por Neoplecostominae, Hypoptopomatinae, Loricariinae, Hypostominae e Ancistrinae. As subfamílias Hypostominae e Ancistrinae (DE PINNA, 1998) são consideradas Grupos irmãos. Apesar de Loricariidae ser reconhecida como um grupo monofilético (DE PINNA, 1998), poucas hipóteses filogenéticas foram elaboradas para o grupo (GOSLINE, 1947).

1.3.1 Aspectos gerais e citogenéticos da subfamília Hypostominae

Estes teleósteos de relativo grande porte, constituem um dos grupos de Siluriformes mais recentes da América do Sul, sendo composto por 19 gêneros (ISBRUCKER, 1981), destes apenas cinco foram analisados citogeneticamente. Os animais pertencentes à esta subfamília são considerados de relevante importância

ambiental, uma vez que atuam como pré-mineralizadores da matéria orgânica antes que esta reingresse na cadeia alimentar (ANGELESCU & GNERI, 1949).

Dentre os animais abrigados nesta subfamília, os do gênero *Hypostomus* é o que apresenta maior número de espécies já cariotipadas (GIULIANO-CAETANO, 1998), sendo o gênero de cascudos dominante nos rios brasileiros (BRITSKI, 1972). Seu número diplóide varia de $2n = 52$ (*H. emarginatus*) a $2n = 80$ (*Hypostomus* sp E) (ARTONI; BERTOLLO, 1999). Alguns problemas taxonômicos necessitam ser revisados, pois, por sua ampla variabilidade morfológica e padrões de coloração, divergências quanto à identificação ao nível de espécie vêm sendo causadas não só para este gênero mas para os exemplares da família Loricariidae em geral.

A citogenética pode ser utilizada como uma importante ferramenta auxiliar em questões ictio-taxonômicas. As contribuições da citogenética para a taxonomia podem ser obtidas através de boas caracterizações cromossômicas das espécies, bem como das relações evolutivas dos cromossomos e cariótipos podendo evidenciar possíveis casos de espécies crípticas (BERTOLLO *et al.*, 1986). Um bom exemplo de caracterização cromossômica são as regiões organizadoras de nucléolos (RONs), que nos *Hypostomus* podem apresentar com frequência polimorfismo de tamanho destas regiões entre cromossomos homólogos, assim como há espécies com apenas um par, outras apresentam RONs múltiplas, o que é mais comum entre os peixes em geral (ARTONI; BERTOLLO, 1992).

Fissões cêntricas são rearranjos de suma importância na evolução do cariótipo deste grupo, pois estes rearranjos robertsonianos são potencialmente responsáveis pelo alto número diplóide encontrado nas espécies mais derivadas de *Hypostomus* (ARTONI; BERTOLLO, 2001).

Atualmente, são reconhecidas como pertencentes à bacia do Alto Rio Paraná 19 espécies do gênero *Hypostomus* (WEBER, 2003). No entanto, até mesmo as espécies descritas apresentam problemas em sua identificação, devido a ausência de revisões mais recentes no grupo, além da falta de conhecimento geral da distribuição destes peixes nos complexos hídricos da América do Sul (REIS; WEBER; MALABARBA, 1990).

1.4 Auxílio da citogenética clássica e molecular na taxonomia de peixes

A citogenética clássica e molecular de peixes têm fornecido importantes subsídios para melhor compreensão das relações evolutivas entre espécies e populações, podendo ser considerada uma excelente ferramenta a ser utilizada em associação com dados taxonômicos e ecológicos, para se chegar mais próximo a uma real história evolutiva dos organismos (ARTONI; VICARI; BERTOLLO, 2000).

Nos estudos desta importante ferramenta geralmente são realizadas as técnicas mais convencionais, tais como coloração Giemsa dos cromossomos, bandamento C (banda-CBG), para detecção de heterocromatina constitutiva e impregnação argêntica das regiões organizadoras de nucléolos, (Ag-RONs) uma vez que bandamentos longitudinais, como bandamento G (banda-GTG), são menos facilmente obtidos em cromossomos de peixes (ARTONI; VICARI; BERTOLLO, 2000).

A heterocromatina é uma classe da cromatina que replica o DNA mais tardiamente e possui atividade transcricional baixa ou inexistente, isto se deve ao fato desta região ser altamente condensada. A heterocromatina é composta por DNA altamente repetitivo, replicando-se tardiamente na fase S podendo manifestar heteropicnose positiva ou negativa quando submetida a determinados tratamentos. A detecção deste tipo de banda se deve à remoção diferencial de DNA na região eucromática, enquanto que a região mais condensada permanece relativamente intacta e detectável (SUMNER, 1972). Esta técnica tem sido o método mais utilizado para estudo das regiões heterocromáticas nos cromossomos de peixes. No entanto, os dados referentes à banda C são pouco expressivos e revelam marcações preferencialmente centroméricas e teloméricas. Em várias espécies de Siluriformes, têm sido constatado a coincidência das regiões organizadoras de nucléolos com as bandas heterocromáticas (FENOCCHIO; BERTOLLO, 1990; OLIVEIRA, 1991), sendo que mudanças relacionadas com quantidade e distribuição de heterocromatina nos cromossomos têm sido amplamente relatadas como mecanismo de evolução cariotípica em alguns grupos de peixes (ARTONI *et al.*, 1999; MARGARIDO; GALETTI Jr., 2000).

Para a detecção da diferenciação heterocromática têm sido utilizadas as técnicas tanto de fluorocromos quanto as enzimas de restrição, possibilitando a

identificação de cromossomos homólogos, polimorfismos na heterocromatina e cromossomos Bs ou ainda sexuais.

As enzimas de restrição (ER) que são caracterizadas por reconhecer seqüências específicas no DNA e orientar seu corte, induzem alterações estruturais nos cromossomos em metáfase relacionados a características estruturais específicas de bandamentos cromossômicos, refletindo uma distribuição de seqüências diferentes de DNA nos cromossomos (FERNANDEZ *et al.*, 1998; GARCIA *et al.*, 1999). As ER promovem a distinção entre cariótipos aparentemente similares e revelam mecanismos de rearranjos, sendo úteis na identificação de marcadores para espécies e/ou populações e no estabelecimento de homeologias (OZOUF-COSTAZ; FORESTI, 1992). A utilização desta técnica têm sido extensivamente praticada devido às dificuldades em se obter bons padrões de bandamento G e C em algumas espécies de peixes, cuja provável causa sejam as peculiaridades da estrutura e compactação de seu DNA (MEDRANO *et al.*, 1988 apud SOLA *et al.*, 1993).

Atualmente, métodos utilizando corantes fluorescentes e hibridação *in situ* têm se mostrado ferramentas importantes para o entendimento da composição e estrutura dos cromossomos.

A Hibridação Fluorescente *in situ* (FISH) constitui um método mais sensível que a marcação pela prata e/ou fluorocromos na detecção de sítios de diferentes tamanhos no DNA contendo seqüências de genes ribossomais, localizando tanto as regiões ativas quanto as não ativas do rDNA. Estes genes, nos eucariotos, estão organizados em duas famílias multigênicas. A família rDNA 45S codifica os rRNA 28S, 18S e 5,8S, ao passo que a família rDNA 5S codifica o rRNA 5S, sendo este um dos componentes da maior subunidade ribossomal. Em peixes a visualização dos maiores sinais referentes a posição dos genes ribossomais, por FISH, estão geralmente relacionadas às marcações obtidas por impregnação de prata (WASKO e GALETTI, 2000). As seqüências formadoras das RONS são detectadas através de sondas de DNA 18S e 28S, e pela sonda 5S são detectados os sítios genômicos do rDNA 5S que consistem em seqüências codificantes de 120pb separadas umas das outras por DNA espaçador não transcrito (NTS) (GALETTI Jr.; MARTINS, 2004) e seguem um mecanismo de evolução independente dos sítios 45S de rDNA (MARTINS; GALETTI, 1999).

Em algumas espécies de peixes, o método de fluorocromos tem mostrado diferenças qualitativas entre as heterocromatinas do complemento cromossômico (MARGARIDO; GALETTI Jr., 2000). Este método nos permite identificar regiões cromossômicas ricas em AT ou GC, dependendo de sua especificidade. São amplamente utilizados os fluorocromos base-específicos Cromomicina A₃, Mitramicina, Quinacrina e DAPI, apesar da existência de outros reagentes da mesma natureza. Segundo AMEMIYA e GOLD (1986) a maioria dos teleósteos tem apresentado RONS com sítios ricos em bases GC, porém, é necessário cautela ao afirmar tal consideração, uma vez que tais fluorocromos podem revelar segmentos heterocromáticos não relacionados aos *clusters* ribossomais (ARTONI *et al.*, 1999).

As Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONS) têm sido evidenciadas usualmente através da técnica de impregnação por nitrato de prata, que permite localizar sítios ativos de genes ribossomais nos cromossomos (HOWELL; BLACK, 1980). Esta técnica pode ser considerada como método indireto de localização das RONS, uma vez que não há associação entre o nitrato de prata e os rDNA propriamente ditos e sim com as proteínas do nucléolo das regiões que estavam em atividade na intérfase anterior (HSU *et al.*, 1975). A caracterização do número e posição das RONS tem sido muito utilizada em peixes e pode constituir um excelente marcador citotaxonomico para alguns grupos (AFFONSO, 2000), por exemplo, as RONS nos *Hypostomus* apresentam freqüentemente polimorfismo de tamanho entre cromossomos homólogos, bem como presença tanto de RONS múltiplas quanto simples, sendo espécie dependente, apesar das RONS múltiplas serem mais freqüentes neste grupo (ARTONI; BERTOLLO, 1992), como anteriormente já mencionado.

2 OBJETIVOS

Ao iniciar este estudo alguns objetivos foram traçados tais como estudar as características cromossômicas da espécie *Hypostomus albopunctatus* através de análises citogenéticas envolvendo a estrutura cariotípica da mesma, a variabilidade das RONS e possível mecanismo de determinação cromossômica do sexo. Além da citogenética clássica, aplicar técnicas da citogenética molecular possibilitando a análise quanto à microestrutura cromossômica através da aplicação de fluorocromos base-específicos e ainda através da hibridação *in situ* fluorescente confirmar os sítios rDNA 18S ativos e elucidar possíveis inativos. Com base na literatura, comparar os resultados obtidos e evidenciar possíveis mecanismos sobre a evolução cariotípica do grupo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

O material analisado foi proveniente de 12 exemplares de *Hypostomus albopunctatus*, sendo destes 8 machos e 4 fêmeas. Estes espécimes foram coletados por redes de espera montadas em período noturno ao longo do Rio Laranjinha, localizado na região de Sapopema-PR (figura 2), pertencente à Bacia do Alto Rio Paraná.



Figura 2: Localização do município de Sapopema – PR.

3.2 Métodos

3.2.1 Obtenção de cromossomos mitóticos

Foi empregada a técnica de cultura de tecidos sólidos de curto tempo descrita por FENOCCHIO *et al.* (1991) com algumas modificações como segue:

- Foram retiradas as porções anterior e posterior do rim (aproximadamente 3 mm³) e transferidas para uma placa de Petri contendo 5mL de meio de cultura (RPMI + 20% de soro bovino fetal + antibiótico e antimicótico);
- O tecido foi desagregado com pinças de ponta fina com posterior aspersão e expiração da solução com uma seringa de vidro sem agulha. Incubou-se a

solução com células em estufa a 29°C por 8 horas. Uma hora e meia antes de completar o tempo, 3 gotas foram pingadas (aproximadamente 150 L) de colchicina (0,025%) em cada recipiente. Posteriormente, agitou-se gentilmente a placa de Petri para que a solução de colchicina homogeneizasse. A nova solução foi mantida em estufa até o tempo final da cultura;

- Passado este tempo, transferiu-se a cultura para um tubo de ensaio e foi centrifugada a 800-900 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e então o tubo foi preenchido até 8mL com solução hipotônica de KCl (0,075M). Desagregou-se o botão celular na solução por suspensão e então mantido 40 minutos em estufa a 37°C;
- O fixador foi preparado com três partes de metanol para uma parte de ácido acético e mantido sob refrigeração a 4°C. Dado o tempo da hipotonização, ressuspendeu-se o material até ficar homogêneo, e centrifugado a 800-900 rpm por 10 minutos;
- Descartou-se o sobrenadante e em seguida o tubo foi preenchido com fixador até o volume de 8mL. Novamente ressuspendeu-se o botão celular e a solução centrifugada a 800-900 rpm durante 10 minutos;
- A etapa anterior foi repetida duas vezes;

Descartado o sobrenadante, colocou-se 1,5 mL de fixador e o botão celular foi ressuspenso. A solução foi armazenada em tubo tipo "Eppendorf" em freezer à -20°C.

3.2.2 Método da coloração convencional Giemsa

Foi gotejado sobre uma lâmina limpa, umedecida e aquecida a vapor ao redor de 60°C, a solução de suspensão celular armazenada no freezer. A lâmina foi corada com uma solução de Giemsa à 5% em tampão fosfato (pH 6,8) durante um período de 10 minutos e em seguida foi lavada em água corrente e deixada secar ao ar.

3.2.3 Detecção da heterocromatina constitutiva – Bandas C

Para o estudo da heterocromatina constitutiva utilizou-se a técnica descrita por SUMNER (1972), com algumas modificações segundo VICENTE (1994):

- A lâmina foi levada com a solução celular à estufa de 45°C por um dia;
- Transcorrido este tempo, foi colocada em solução de HCl 0,2N à 42°C durante 10 minutos. Em seguida foi lavada com água destilada e então foi deixada secar ao ar;
- A lâmina foi colocada em solução de Hidróxido de Bário a 5% ($\text{Ba}(\text{OH})_2$) à 45°C por aproximadamente 2 minutos;
- Então, rapidamente a lâmina foi inserida em solução de HCl 0,2N para retirar o excesso de bário e após isso foi lavada com um jato de água destilada. Em seguida foi necessário colocá-la em uma solução de 2xSSC (15,53g de NaCl + 8,82g de Citrato Trissódico + Água deionizada) durante uma hora à 60°C;
- Decorrido este tempo a lâmina foi lavada em água destilada e seca ao ar;

A lâmina foi corada com Giemsa diluída à 5% em tampão fosfato pH 6,8 durante 15 minutos.

3.2.4 Detecção das Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONs)

Para a caracterização das regiões organizadoras de nucléolo foi utilizada a técnica descrita por HOWELL e BLACK (1980) consistindo em corar as RONs ativas através de impregnação argêntica obtida através de solução aquosa de nitrato de prata como descrito a seguir:

- Pingaram-se as lâminas conforme descrito anteriormente e foram deixadas envelhecer por até 5 dias em uma estufa a aproximadamente 45°C;
- Uma solução aquosa de nitrato de prata a 50% foi usada (1g de AgNO_3 em 2mL de H_2O destilada) bem como uma solução aquosa de gelatina a 2% (1g de gelatina em 50mL de H_2O destilada, acrescentando-se 0,5mL de ácido fórmico). Esta última foi condicionada em frasco âmbar e mantida em geladeira;
- Sobre a lâmina foi pingada uma gota (~120 L) de solução aquosa de gelatina e duas gotas (cerca de 300 L) de solução aquosa de AgNO_3 , misturadas

gentilmente e cobertas com uma lamínula. Foram levadas em estufa a 60°C. Quando o material adquiriu uma coloração dourado-acastanhada, retirou-se a lâmina da estufa e a lamínula foi removida com um jato de água destilada e posteriormente deixada para secar ao ar;

- A lâmina pôde então ser corada com uma solução de Giemsa (10%) em tampão fosfato pH 6,8 por 15 segundos, lavada e deixada secar ao ar.

3.2.5. Dupla coloração CMA₃/DAPI

Foi empregada a técnica de SCHWEIZER *et al.* (1976):

- Foi colocado 80 L de solução de Cromomicina A₃ sobre a lâmina recém preparada para observação de cromossomos e coberta com uma lamínula, foi deixada por 1 hora descansando;
- A lamínula foi escorrida, lavada com água corrente e deixada para secar levemente;
- Colocou-se 80 L de solução DAPI/Antifading e a seguir foi retirado o excesso com papel filtro.

3.2.6. Clivagem com Endonuclease de Restrição

A técnica utilizada foi a descrita por MEZZANOTTE *et al.* (1983), com algumas adaptações feitas por MAISTRO (1996) para as preparações com cromossomos de peixes.

- Pingou-se uma lâmina em banho-maria a 60°C e foi levada à estufa a 45°C para envelhecer por um dia;
- Uma gota de solução de enzima foi pingada para cada gota de suspensão celular e coberta com lamínula;
- A lâmina foi colocada em câmara úmida muito bem fechada e incubada à 37°C por cinco horas;
- Transcorrido o tempo necessário, removeu-se a lamínula com um jato de água destilada e deixada secar ao ar;
- A lâmina foi corada com solução de Giemsa (5%) em tampão fosfato pH 6,8 durante 10 minutos;

- Lavou-se a lâmina novamente em água destilada e deixada secar ao ar.

3.2.7 Hibridação Fluorescente *in situ* (FISH) com sonda rDNA 18S

Foi empregada a metodologia descrita por PINKEL *et al.* (1986) contendo pequenas modificações.

A sonda de DNA ribossômico do fragmento 18S (cerca de 1800pb), foi obtida a partir de amplificação por polimerização em cadeia (PCR) dessa seqüência do DNA genômico do peixe *Prochilodus lineatus* utilizando os *primers* NS1 (5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3') e NS8 (5'-TCCGCAGGTTACCTACGG-3') (HATANAKA, 2000).

Para marcação das sondas foi utilizado o procedimento de “nick translation” com uso do Kit Bionick Labeling System Gibco. As etapas foram as seguintes:

- Lavagem das lâminas, contendo as preparações cromossômicas, em tampão PBS 1x durante 5 minutos, em temperatura ambiente com agitação;
- Desidratação em série alcoólica (70%, 85% e 100%) por 5 min. cada;
- Incubação das lâminas em solução com 90µL de RNase 10mg/mL (0,4% RNase/2xSSC), sob lamínula a 37°C por 1 hora em câmara úmida;
- Lavagem das lâminas três vezes por 5 minutos cada com 2xSSC;
- Lavagem das lâminas em PBS 1x durante 5 minutos;
- Fixação em formaldeído 1% em PBS 1x com MgCl₂ 50mM por 10 minutos à temperatura ambiente;
- Lavagem em PBS 1x por 5 minutos;
- Desidratação das lâminas em série de etanol gelado (70%, 85% e 100%) por 5 minutos cada;
- Desnaturação do DNA cromossômico com formamida 70% em 2xSSC a 70°C por 5 minutos;
- Desidratação do material em série alcoólica 70% (a temperatura de -20°C), 85% e 100% durante 5 minutos cada;
- Montagem da lâmina com 50µL de solução de hibridação coberta por uma lamínula. A solução ainda foi colocada em banho-maria a 70°C para que a sonda fosse desnaturada;

- Incubação das lâminas em câmara úmida a 37°C por 12 horas (overnight);
- Passado o tempo de hibridação, as lâminas foram lavadas em formamida 50% em 2xSSC pH 7,0 por 10 minutos, sob agitação a 42°C;
- Lâminas lavadas 3 vezes em 0,1xSSC a 60°C, por 5 minutos cada;
- Foram lavadas então por 5 minutos em solução de Tween 20 (0,05%/2xSSC);
- Incubadas em tampão NFDM (non fat dry milk) 5%/4xSSC por 15 minutos;
- As lâminas foram lavadas duas vezes por 5 minutos cada com Tween 20;
- Incubadas com 90 µL de FITC (0,25µg FITC/µL NFDM) durante 30 minutos em câmara úmida e escura, a temperatura ambiente;
- Lavagem das lâminas realizadas por três vezes com Tween 0,5%/4xSSC a temperatura ambiente, durante 5 minutos cada;
- Incubadas com 90 µL de anti-avidina (7µL anti-avidina/700µL NFDM) durante 30 minutos em câmara úmida e escura, a temperatura ambiente;
- Lavagem das lâminas realizadas por três vezes com Tween 0,5%/4xSSC a temperatura ambiente, durante 5 minutos cada;
- Foram repetidas as incubações com FITC e anti-avidina, seguindo as mesmas quantidades, tempo de incubação e lavagens recomendadas com Tween 0,5%/4xSSC;
- A desidratação das lâminas foi realizada em série de etanol gelado (70%, 85% e 100%) durante 5 minutos sob agitação;
- As lâminas foram montadas com 25µL para cada solução de iodeto de propídeo (proporção de 25µL de antifading com 1µL de iodeto de propídeo concentrado em 50µg/mL);
- A análise foi feita em fotomicroscópio de epifluorescência sob filtro azul (450-490nm de comprimento de onda).

3.2.8 Captura de imagens

As metáfases foram capturadas através do sistema de captura digital de imagens utilizado foi o Applied Spectral Image, este acoplado a um microscópio Carl Zeiss Axiophot. Através do software Case Data Manager Expo 2.0 foi possível realizar as análises cromossômicas e montar os cariótipos.

3.2.9 Identificação dos cromossomos e montagem dos cariótipos

As medições cromossômicas foram feitas através do software Adobe Photoshop 7.0. A classificação dos cromossomos conforme os valores da relação de braços (RB) foi estabelecida segundo LEVAN, FREGDA e SANDBERG (1964) em: metacêntricos (m) $RB = 1,00$ a $1,70$; submetacêntricos (sm) $RB = 1,71$ a $3,00$; subtelocêntricos (st) $RB = 3,01$ a $7,00$; acrocêntricos (a) $RB > 7,01$. Para o cálculo do número fundamental (NF) os cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e subtelocêntricos foram considerados de dois braços, enquanto que os acrocêntricos constituídos por um único braço.

4 RESULTADOS

O número diplóide encontrado para os exemplares de *Hypostomus albopunctatus* (Figura 3) analisados foi igual a 76 cromossomos, contudo, para fêmeas o número fundamental foi igual a 141, ao passo que os machos apresentaram o número fundamental igual a 142. A evidência de um sistema sexual do tipo ZZ/ZW proporcionou a diferença quanto ao número fundamental, já que a constituição cariotípica dos espécimes em questão diferem apenas em um cromossomo acrocêntrico, o qual representa o cromossomo sexual W nas fêmeas. O cariótipo dos machos é formado por 10 metacêntricos, 14 submetacêntricos, 42 subtelo-cêntricos e 10 acrocêntricos, e, o cariótipo das fêmeas é constituído por 10 metacêntricos, 14 submetacêntricos, 41 subtelo-cêntricos e 11 acrocêntricos (Figuras 4).

A heterocromatina foi evidenciada através do bandamento C principalmente em regiões teloméricas e em alguns cromossomos em regiões pericentroméricas. Foi evidenciado uma forte marcação na porção intersticial do 13^o cromossomo do complemento, sendo correspondente ao cromossomo Z. O W apresentou um grande bloco heterocromático em quase todo o braço maior do cromossomo (Figuras 5).

Através do tratamento com a endonuclease de restrição *Alu I* foi possível detectar conspícuas marcas teloméricas e algumas intersticiais já evidenciadas anteriormente através do bandamento C e principalmente através da dupla coloração, sendo a maioria das marcas DAPI positiva (Figuras 6). Quanto aos cromossomos sexuais apenas os referentes aos machos obtiveram marcas negativas conspícuas intersticiais nas mesmas regiões quando corados com cromomicina A₃ ou iodeto de propídeo.

A dupla coloração CMA₃/DAPI evidenciou regiões ricas em bases GC em regiões intersticiais bem definidas em alguns pares de cromossomos subtelo e acrocêntricos, contudo, regiões ricas em bases AT foram detectadas em porções principalmente centroméricas e teloméricas em alguns cromossomos. O braço longo do cromossomo Z foi corado quase que completamente pela cromomicina, bem como os sinais obtidos das regiões organizadoras de nucléolo através de sonda rDNA 18S, indicando que nessas regiões predominam bases de adenina e timina (Figuras 7). Todavia, o cromossomo W não apresentou uma coloração preferencial,

podendo inferir que este apresenta regiões interespaçadas de AT e CG. Também foi realizada a dupla coloração com iodeto de propídeo e DAPI, sendo obtidos resultados similares à dupla coloração CMA₃/DAPI, contudo algumas marcações mostraram-se mais conspícuas quando coradas com cromomicina ao invés de iodeto de propídeo.

Não foi detectado heteromorfismo entre as regiões organizadoras de nucléolos (RONs), sendo apenas um par evidenciado através da impregnação argêntica. Este cromossomo é um submetacêntrico e correspondente ao 11^o par do complemento (Figura 8).

Através da técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) foi possível confirmar a presença de apenas um par de RONs com a utilização de sonda rDNA 18S, não havendo outros sítios marcados, portanto, não foi detectada a presença de RONs não ativas (figura 9).



Figura 3: Exemplar de *Hypostomus albopunctatus*.

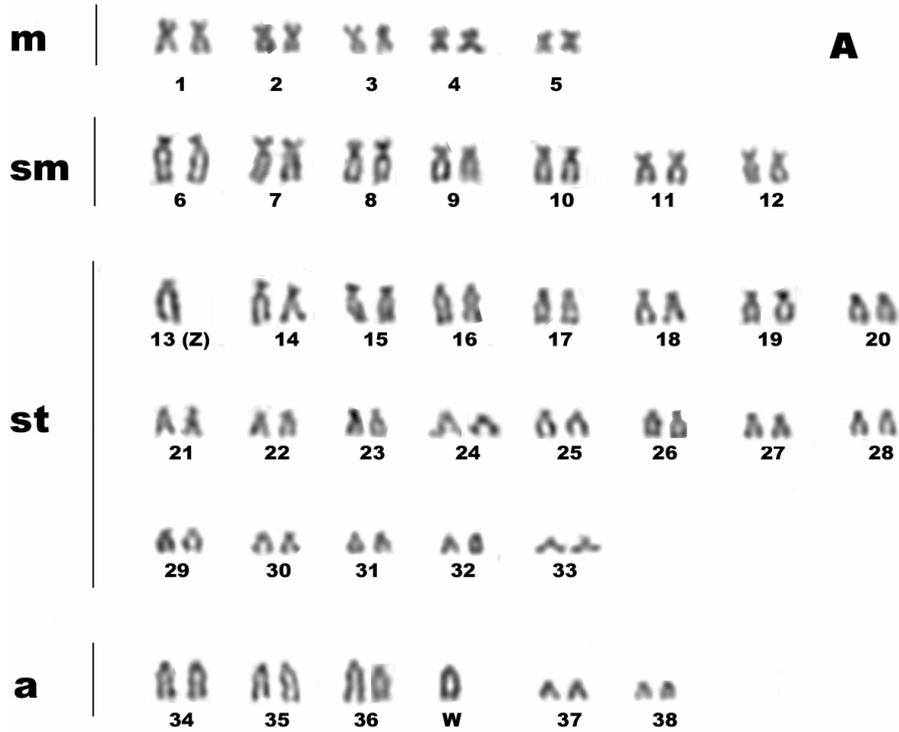


Figura 4: Metáfases mitóticas de *Hypostomus albopunctatus* do Rio Laranjinha. Cariótipos convencionais de fêmeas (A) e machos (B). Ambos com $2n = 76$ sendo a estrutura (10m, 14sm, 42st, 10a) e NF = 142 correspondente para machos e (10m, 14sm, 41st, 11a) NF = 141 para fêmeas.



Figura 5: Padrão de banda C de *Hypostomus albopunctatus* evidenciando a heterocromatina nos cromossomos mitóticos de fêmeas e machos, respectivamente.

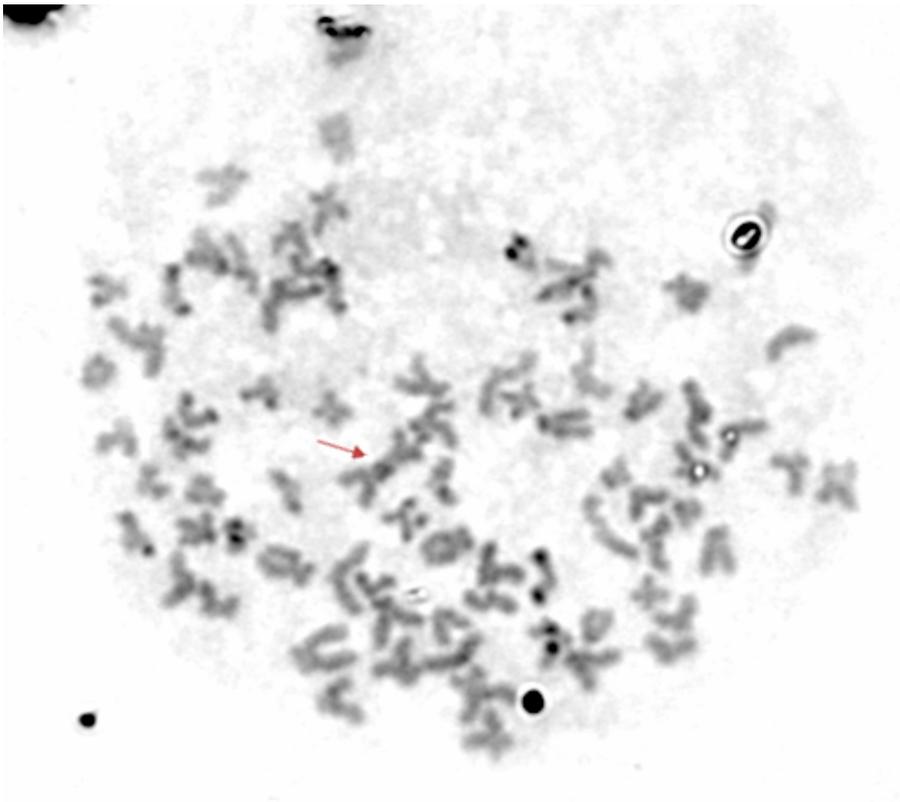


Figura 6a: Cariótipo tratado com a enzima de restrição *Alu I*. A flecha indica a marca detectada das RONS em associação.

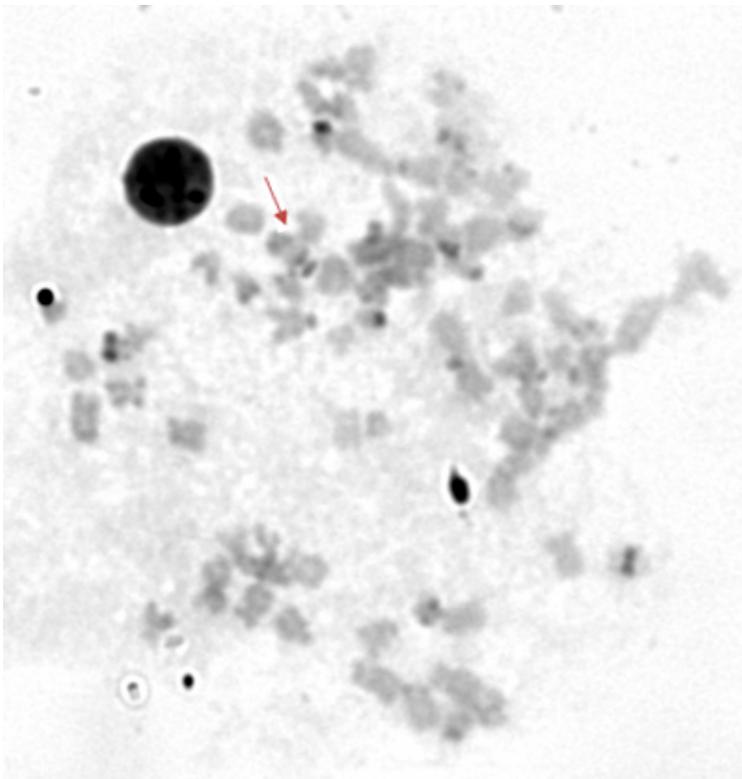


Figura 6b: Flecha indicando bloco intersticial do cromossomo Z negativo para o tratamento com a enzima *Alu I*.

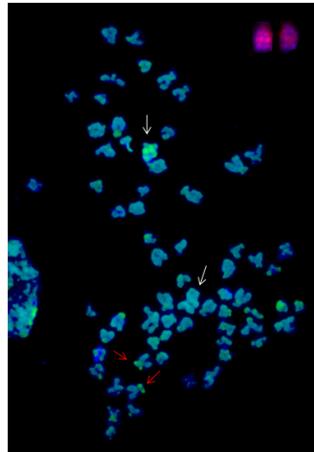
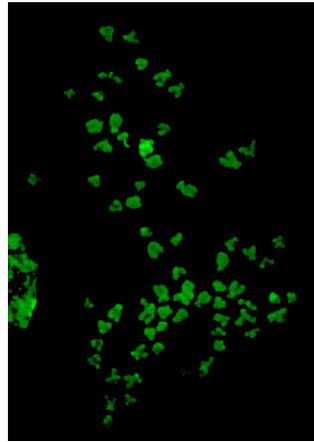
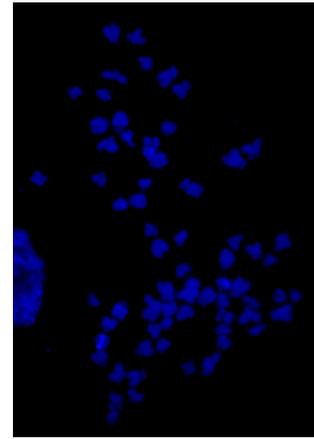
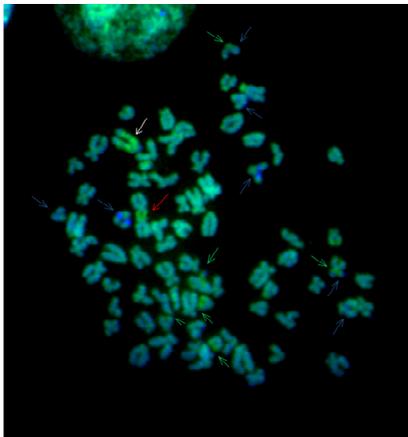
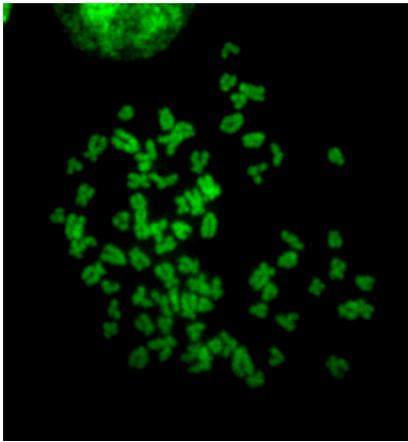
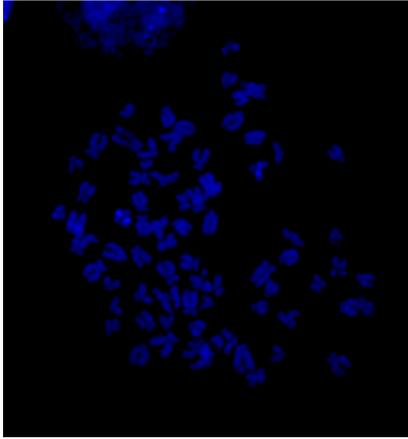


Figura 7a: Dupla coloração CMA₃/DAPI aplicada em cariótipo de fêmea, evidenciando o conspicuo bloco intersticial do cromossomo Z (seta branca), assim como as RONS em associação (seta vermelha), além de fortes marcas principalmente teloméricas e centroméricas sendo algumas intersticiais, tanto DAPI (setas azuis) quanto CMA₃ (setas verdes) positivas.

Figura 7b: Dupla coloração CMA₃/DAPI aplicada em cariótipo de macho sendo observadas as mesmas marcações que no cariótipo da fêmea, com a adição de um cromossomo Z (setas brancas) evidenciado pela CMA₃. Em destaque no canto superior direito o par sexual corado com iodeto de propídeo e DAPI. As RONS estão indicadas pelas setas vermelhas.

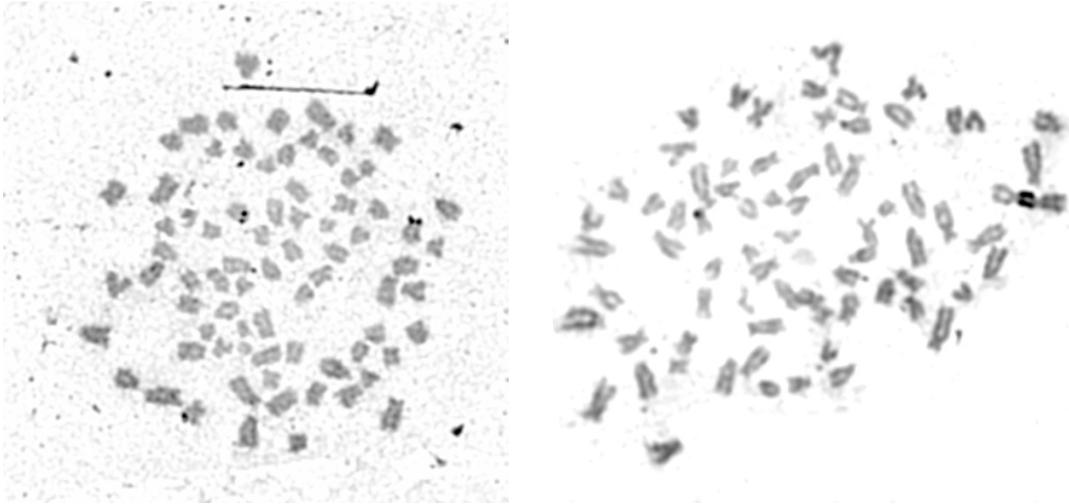


Figura 8: Metáfases tratadas com AgNO_3 evidenciando apenas um par de RON simples.

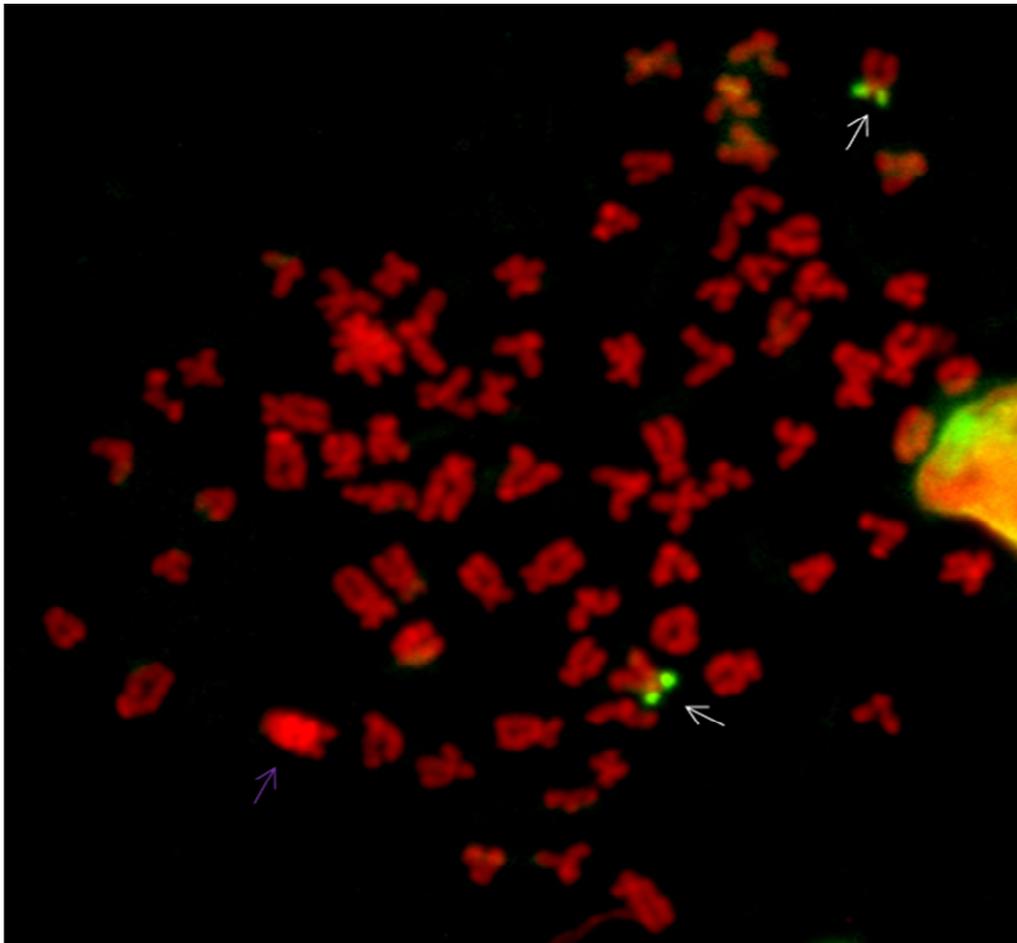


Figura 9: Metáfases hibridizadas por sondas rDNA 18S, confirmando a presença de apenas um par de cromossomos portadores dos genes responsáveis pela organização do nucléolo (setas brancas). Nesta foto o cromossomo Z está sendo indicado pela seta de cor roxa.

5. DISCUSSÃO

Os indivíduos representantes da ordem Siluriformes apresentam números diplóides bastante variados, porém, OLIVEIRA e GOSTZTONYI (2000) propuseram que o número diplóide basal para este grande grupo corresponde a $2n = 56$ cromossomos, levando em consideração tanto que a família Diplomystidae seja um grupo irmão de todos os Siluriformes quanto o conservado número diplóide do mesmo. Comumente é encontrado um valor alto de Número Fundamental, próximo a 100, nesta ordem, podendo inferir que esta seja uma característica da mesma (STOLF *et al.*, 2004). Todavia, esta freqüente ocorrência do alto valor do Número Fundamental também é observada nas ordens Characiformes e Gymnotiformes, sendo, portanto, proposto por OLIVEIRA e GOSZTONYI (2000) como uma condição plesiomórfica.

Apesar de este grupo mostrar-se altamente conservado quanto ao número diplóide, três famílias apresentam diversidade cariotípica um tanto quanto acentuada, entre elas a família Loricariidae cujo número diplóide varia de $2n = 36$ a $2n = 80$ (RAVEDUTTI ; JULIO Jr., 2001).

O gênero *Hypostomus* abrange igualmente uma notável amplitude no número diplóide de seus exemplares variando de $2n = 52$ a $2n = 80$ (ARTONI; BERTOLLO, 1999). Considerando $2n = 54$ como um caráter basal, o aumento do número diplóide em *Hypostomus* reforça a idéia de que rearranjos robertsonianos, principalmente fissões cêntricas, bem como o acúmulo de heterocromatina constitutiva, estariam intimamente relacionados ao processo evolutivo deste grupo, representando, então, um caráter derivado no gênero (ARTONI; BERTOLLO, 2001).

A subfamília Hypostominae possui tendências muito conservativas como a presença de heterocromatina constitutiva adjacente ou coincidente com as RONS e a posição telomérica dessas regiões, na maioria das vezes no braço longo dos cromossomos, apesar de concomitantemente apresentar uma grande variabilidade cariotípica (CAMILO, 2004).

A quantidade e distribuição da heterocromatina constitutiva, posição e número das RONS, número diplóide e fórmula cariotípica são dados cromossômicos possíveis de caracterizar individualmente diferentes espécies de *Hypostomus*. Isto se deve à estrutura não conservativa deste gênero (ARTONI, 1996).

No presente estudo, foram obtidos dados citogenéticos referentes à espécie *Hypostomus albopunctatus* procedente do Rio Laranjinha, o qual faz parte da Bacia do Alto Paraná. O número diplóide encontrado foi $2n = 76$ com a estrutura cariotípica equivalente a 10 metacêntricos, 14 submetacêntricos, 42 subtelocêntricos e 10 acrocêntricos, para os exemplares machos, e 10 metacêntricos, 14 submetacêntricos, 41 subtelocêntricos e 11 acrocêntricos para fêmeas, evidenciando a presença de um sistema sexual cromossômico do tipo ZZ/ZW.

Quando comparados com a literatura, os resultados obtidos não se mostraram congruentes. A mesma espécie foi descrita com $2n = 74$ sendo destes 10 metacêntricos, 20 submetacêntricos e 44 subtelo e acrocêntricos, não apresentando heteromorfismo cromossômico relacionado ao sexo, sendo estes espécimes coletados no Rio Mogi-Guaçu (ARTONI; BERTOLLO, 1996). Outro estudo, realizado por CAMILO, 2004 corrobora com o trabalho mencionado anteriormente, possuindo o mesmo número diplóide para a espécie, assim como a mesma estrutura cariotípica, porém os exemplares foram coletados no Rio Piracicaba situado no município de Piracicaba.

A insuficiente e complexa descrição taxonômica deste gênero dificulta a identificação exata da espécie (GOSLINE, 1947; REIS; WEBER; MALABARBA, 1990), podendo resultar em distintas descrições citogenéticas para uma mesma espécie. Isto ocorre, principalmente, pelo fato de que duas espécies com alto índice de similaridade morfológica podem ser classificadas como apenas uma, sendo, portanto, necessário o uso da citogenética como um ferramenta citotaxonômica na descrição deste grupo (MAURUTTO, 2007).

Porém a história evolutiva de *H. albopunctatus*, deve ser estudada a fundo juntamente com os processos biogeográficos ocorridos até então, a fim de evidenciar outros processos que possibilitariam esta divergência cromossômica em exemplares da mesma espécie, como vicariância, por exemplo.

Duas espécies do gênero *Hypostomus* já foram descritas como detentoras de heteromorfismo cromossômico relacionado ao sexo, sendo que em *H. macrops* o macho é heterogamético (sistema XY) (MICHELE; TAKAHASHI; FERRATI, 1977) e em *Hypostomus* sp. G, a heterogametia é apresentado pela fêmea (sistema ZW) (ARTONI; VENERE; BERTOLLO, 1998).

No presente estudo foi encontrado um caso semelhante ao *Hypostomus* sp. G, sendo evidenciado um sistema sexual do tipo ZW, ao contrário de descrições anteriores para a espécie *H. albopunctatus* (ARTONI; BERTOLLO, 1996; CAMILO, 2004). O maior subteloentrico do complemento, ao passo que o cromossomo W é um acrocêntrico e apresentou um tamanho reduzido em relação ao Z. Além disso, o cromossomo W apresenta uma grande banda heterocromática em quase todo o braço longo restando apenas uma pequena porção eucromática na região telomérica ao passo que o Z apresenta duas regiões heterocromáticas intersticiais conspícuas.

Este tipo de diferenciação pode estar ligado a rearranjos estruturais, resultando na prevenção de recombinação meiótica (BEÇAK; BEÇAK, 1969; ALMEIDA-TOLEDO *et al.*, 2000). Uma hipótese para tal diferenciação seria a ocorrência de uma inversão pericêntrica em um cromossomo similar ao Z, seguido de perda de material cromossômico e então acúmulo de heterocromatina, podendo ter originado o cromossomo W, já que rearranjos estruturais parecem ter um importante papel na diferenciação de cromossomos sexuais nos locariídeos *Loricariichthys platymetopon* (SCAVONE; JÚLIO Jr., 1995) e *Hypostomus* sp. G (ARTONI; VENERE; BERTOLLO, 1998). Um processo semelhante parece ter ocorrido em *Ancistrus* sp. “Piagaçu” (DE OLIVEIRA *et al.*, 2007) que também faz parte da família Loricariidae.

Contudo, a diferenciação de cromossomos sexuais em peixes Neotropicais de água doce parece ter resultado de eventos independentes, e sua presença não mantém uma relação filogenética entre as espécies (ALMEIDA-TOLEDO; FORESTI, 2001).

A macroestrutura cariotípica é relativamente constante, porém com diferenças relacionadas à heterocromatina entre espécies (GALETTI Jr. *et al.*, 1991) sendo de grande eficiência na identificação de polimorfismos, podendo caracterizar variabilidade intrapopulacional em algumas espécies da nossa ictiofauna (MANTOVANI *et al.*, 2000). A heterocromatina constitutiva é caracterizada como uma região repetitiva no DNA que sofre replicação tardia e possui pouca ou nenhuma atividade transcricional (ARTONI *et al.*, 1999; MARGARIDO; GALETTI Jr., 2000), tendo um fundamental papel na diversificação cariotípica dos peixes (OJIMA; UEDA, 1979). Análises da heterocromatina constitutiva dos Siluriformes ainda são

escassas, apesar do fato que estas podem fornecer importantes informações da evolução cariotípica do grupo (KAVALCO *et al.*, 2003).

Considerando que a maioria das espécies em Hypostominae apresentem pouca heterocromatina constitutiva (ARTONI; BERTOLLO, 2001), uma moderada quantidade deste tipo de macroestrutura cromossômica foi detectada, através do bandamento C, principalmente em regiões centroméricas e teloméricas, sendo este padrão muito encontrado em muitos Siluriformes (RAVEDUTTI; JULIO Jr., 2001). Porém, foram também detectadas conspícuas marcas intersticiais em alguns cromossomos subtelocêntricos, todavia, as marcas que mais chamaram atenção foram dos cromossomos sexuais, sendo detectado um bloco heterocromático intersticial nos cromossomos Z (subtelocêntricos) e o braço longo quase que inteiramente heterocromático do cromossomo W (acrocêntrico).

Foram detectadas bandas heterocromáticas consistentes na porção telomérica do braço curto de um par de cromossomos submetacêntricos, correspondentes aos carreadores das regiões organizadoras de nucléolo. Esta coincidência entre as RONS com bandas de heterocromatina têm sido constatada em várias espécies de Siluriformes (FENOCCHIO; BERTOLLO, 1990; OLIVEIRA, 1991).

O tratamento com a endonuclease de restrição *Alu I* produz, geralmente, marcações semelhantes às do bandamento C (SWARÇA; GIULIANO-CAETANO; DIAS, 2000; FARIA; MORIELLE-VERSUTE, 2002; CIPRIANO, 2005; entre outros). Para *Hypostomus albopunctatus*, as marcações foram semelhantes às da banda C em quase todos os cromossomos do complemento, evidenciando principalmente as RONS e as regiões centroméricas e teloméricas. Também foi evidenciado o bloco heterocromático intersticial do cromossomo Z, ao contrário do cromossomo W que não foi detectada marca alguma. A ausência ou o padrão de coloração mais fraca em alguns cromossomos refere-se à extração diferencial do DNA promovida pela *Alu I*. A acessibilidade da enzima (ou ausência) em certas regiões onde se situam blocos heterocromáticos deve-se, provavelmente, a heterogeneidade apresentada pela heterocromatina da espécie estudada.

Fluorocromos são usados geralmente como indicadores de regiões ricas em bases fluoróforo-específicas. Este tipo de técnica vem sendo amplamente utilizado, contribuindo com informações importantes sobre a composição da heterocromatina

(SOUZA, MOREIRA-FILHO; GALETTI Jr., 1996). Neste estudo foram realizadas técnicas de dupla coloração, sendo usados DAPI como evidenciador de regiões preferencialmente AT, Cromomicina A₃ (CMA₃) destacando regiões ricas em CG ou ainda Iodeto de Propídeo com a mesma finalidade que a cromomicina.

Tanto as marcas intersticiais quanto as teloméricas e centroméricas que haviam sido evidenciadas pela técnica de bandamento C foram também detectadas com o corante DAPI. Contudo, a conspícua marca intersticial do cromossomo Z mostrou-se com maior afinidade pela cromomicina e iodeto de propídeo, indicando maior quantidade de bases CG nesta região. Esta mesma região não obteve coloração uniforme no bloco todo, sendo evidenciados principalmente dois blocos, indicando que há um espaçamento das bases constituintes do material cromossômico, bem como evidenciado no cromossomo W. As regiões portadoras dos genes ribossomais 18S mostraram-se positivas para cromomicina e iodeto de propídeo. Esta coincidência entre marcações fluorescentes e RONS foi encontrada também para diversas espécies de peixes (DA SILVA CORTINHAS *et al.*, 2003; CIPRIANO, 2005; NOLETO *et al.*, 2006 entre outros), revelando associações entre segmentos heterocromáticos ricos em bases GC e genes ribossomais (PENDAS, MÓRAN; GARCÍA-VAZQUEZ, 1993). Entretanto, a coloração com fluorocromos CG específicos não pode ser considerado como um método de determinação direta de genes ribossomais mas de heterocromatinas ricas em bases CG associadas com clusters de genes (ARTONI *et al.*, 1999).

As regiões organizadoras de nucléolo nos loricariídeos apresentam fenótipos variados e é observada uma tendência na manutenção da condição plesiomórfica, que é um par simples localizado na porção terminal (OLIVEIRA; GOSZTONYI, 2000). Ainda foi proposto por ARTONI, 1996 que o fenótipo ancestral das RONS para a família Loricariidae é um sítio terminal no braço longo de um cromossomo metacêntrico grande. Nas espécies do gênero *Hypostomus* é muito comum encontrar variações fenotípicas nas RONS podendo ainda apresentar heteromorfismo quanto ao tamanho destas regiões entre cromossomos homólogos. Para este grupo já foram descritas tanto RONS simples quanto múltiplas sendo estas últimas mais freqüentes (ARTONI; BERTOLLO, 1992). Também foi verificado que RONS múltiplas estão presentes em várias outras espécies da subfamília Hypostominae (ARTONI; BERTOLLO, 2001). Foi possível verificar neste trabalho

apenas um par de RONS através da impregnação por nitrato de prata, para a espécie *H. albopunctatus*, não apresentando heteromorfismo entre as regiões detectadas. Para a mesma espécie já foi descrita a ocorrência tanto de três RONS (CAMILO, 2004) quanto de dois pares destas regiões (ARTONI; BERTOLLO, 1996), tendo tais dados como mais uma evidência de que os exemplares deste estudo sofreram distintos eventos em seu padrão evolutivo.

Devido a não se associar diretamente com rDNA e sim com proteínas nucleolares envolvidas com atividade transcricional dos genes ribossomais, o método por impregnação por nitrato de prata detecta apenas as RONS que estiveram ativas na intérfase anterior, mascarando possíveis sítios de rDNA inativos no genoma (MILLER *et al.*, 1976), sendo necessário, portanto, a aplicação de uma técnica mais apurada para a detecção dos sítios portadores dos genes organizadores de nucléolo.

Pela necessidade citada anteriormente, foi aplicada a técnica de Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH) com sonda de rDNA 18S. Através desta técnica foi possível evidenciar apenas dois sinais correspondentes às marcas detectadas por impregnação argêntica, confirmando a presença de RONS simples para estes exemplares, ao contrário dos descritos para os exemplares do Rio Mogi-Guaçu e Rio Piracicaba.

6 CONCLUSÃO

Através deste estudo foi possível estabelecer para a espécie *Hypostomus albopunctatus*, proveniente do Rio Laranjinha – PR que faz parte da Bacia do Alto Rio Paraná, apresenta $2n = 76$ cromossomos com a seguinte estrutura cariotípica: 10m, 14sm, 42st, 10a e NF = 142 correspondente para exemplares machos, e 10m, 14sm, 41st, 11a e NF = 141 para fêmeas. Foi detectada a presença de heteromorfismo cromossômico sexual, moderada heterocromatina constitutiva levando em consideração o padrão deste caráter para o grupo, um par simples de regiões organizadoras de nucléolo ativas, sendo confirmados os mesmos sítios ribossomais com uma sonda rDNA 18S através da FISH. Este padrão mostrou-se consideravelmente distinto dos encontrados na literatura para a mesma espécie sendo os exemplares coletados no Rio Piracicaba (CAMILO, 2004) e Rio Mogi-Guaçu (ARTONI; BERTOLLO, 1996), ambos no estado de São Paulo. Esta discrepância pode ser explicada pelas diferentes tendências de evolução cariotípica do grupo, sendo bastante comum entre os Hypostominae.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AB'SABER, N.A. Megageomorfologia do território brasileiro. In: Geomorfologia do Brasil (S.B. Cunha & A.J.T. Guerra, eds.). Bertand Brasil, Rio de Janeiro, p. 71-106, 1998.
- AFFONSO, P.R.A.M. Caracterização citogenética de peixes de recifes de corais da família Pomacanthidae (Perciformes). **Dissertação (Mestrado: Centro de Ciências Biológicas e da Saúde) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos – SP, 2000.**
- AGOSTINHO, A.A.; JÚLIO JR., H.F.; GOMES, L.C.; BINI, L.M.; AGOSTINHO, C.S. Composição, abundância e distribuição espaço-temporal da ictiofauna. In: VAZZOLER, A.E.A. de M.; AGOSTINHO, A.A.; HAHN, N.S. (Ed.). A Planície de inundação do Alto Rio Paraná. Aspectos Físicos, Biológicos e Socioeconômicos. Maringá: Universidade Estadual de Maringá. p. 179-208, 1997.
- ALMEIDA-TOLEDO L.F. ; DANIEL-SILVA, M.F.Z. ; LOPES, C. E.; TOLEDO-FILHO, S. A. . Sex Chromosome Evolution in Fish. II. Second Occurrence of a X1X2Y Sex Chromosome System in Gymnotiformes. *Chromosoma Research, United Kingdon*, v. 8, n. 4, p. 335-340, 2000.
- ALMEIDA-TOLEDO L.F. ; FORESTI, Fausto . Morphologically differentiated Sex Chromosomes in Neotropical Freshwater fish. *Genetica, Holanda*, 2001.
- AMEMIYA, T.; GOLD, J.R. Chromomycin A3 stains nucleolus organizer regions of Fish chromosomes. *Copeia* 1: 226-231, 1986.
- ANDREATA, A.A. ; TOLEDO, L.F.A. . Caracterização citogenética de espécies e populações de *Microlepidogaster* (Hypoptopomatinae, Loricariidae). In: IX Encontro Brasileiro de Ictiologia, realizado na Universidade Estadual, 1991, Maringá, PR. Resumos do IX Encontro Brasileiro de Ictiologia, realizado na Universidade Estadual, 1991.
- ANGELESCU, O.R.; GNERI, F.S. Adaptaciones del aparato digestivo al regimen alimenticio en algunos peces del rio Uruguay del rio de La Plata. HI tipo omnívoro y ilifago en representantes de las famílias “Loricariidae” e “Anostomidae”. *Revista Inst. Nacional de Investigación de Las Ciencias Naturales*.(6) 159-272, 1949.
- ARTONI, R.F.; BERTOLLO, L.A.C Regiões Organizadoras de Nucléolos e Heterocromatina constitutiva em peixes do gênero *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae, Hypostominae). IV Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicais, p.36, 1992.
- ARTONI R.F. Estudos citogenéticos na família Loricariidae, com ênfase no gênero *Hypostomus* Lacépède (1803) (Pisces, Siluriformes). **MSc Thesis, Universidade Federal de São Carlos 162 pp., 1996.**

ARTONI, R.F.; BERTOLLO, L.A.C. Cytogenetic studies on hypostominae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). Considerations on karyotype evolution in genus *Hypostomus*. *Caryologia*, 49: 81-90, 1996.

ARTONI, R. F., VENERE P. C.; BERTOLLO L. A. C. A heteromorphic ZZ/ZW sex chromosome system in fish, genus *Hypostomus* (Loricariidae). *Cytologia* 63: 421–425, 1998.

ARTONI, R.F.; BERTOLLO, L.A.C.. Nature and distribution of constitutive heterochromatin in fishes, genus *Hypostomus* (Loricariidae), *Genetica* 106: 209-214, 1999

ARTONI, R.F.; MOLINA, W.F.; BERTOLLO, L.A.C.; GALETTI Jr., P.M. Heterochromatin analysis in the fish species *Liposarcus anisitsi* (Siluriformes) and *Leporinus elongatus* (Characiformes). *Genet. Mol. Biol.* Vol22 n.1 São Paulo, 1999.

ARTONI, R.F.; VICARI, M.R.; BERTOLLO, L.A.C.. Citogenética de peixes Neotropicais: Métodos, resultados e perspectivas. PUBLICATIO-UEPG: Biological and Health Sciences, v. 6(1): 43-60, 2000.

ARTONI, R.F.; BERTOLLO, L.A.C.. Trends in the karyotype evolution of Loricariidae fish (Siluriformes), *Hereditas* 134: 201-210, 2001.

BEÇAK, W.; BEÇAK, M.L.. Cytotaxonomy and chromosomal evolution in Serpentes.. *Cytogenetics*. (Basel), v. 08, p. 247-262, 1969.

BERTOLLO, L.A.C.; MOREIRA-FILHO, O.; GALETTI JR., P. M. Cytogenetics and taxonomy: considerations based on chromosome studies of freshwater fish. *J. Fish Biol.*, 28: 153,159, 1986.

BONETTO, A.A. The Paraná river system. In: DAVIES, B.R.; WALKER, K.F. (Ed.). *The Ecology of River Systems*. Dordrecht: The Netherlands/Dr. W. Junk Publishers. p.541-555, 1986.

BRITSKI, H.A. Peixes de água doce do estado de São Paulo: sistemática. In: *Poluição e Piscicultura: 79-108*. Faculdade de Saúde Pública da USP – Instituto de Pesca da C.P.R.N. da Secretaria da Agricultura, SP, 1972.

BRITSKI, H.A.; LANGEANI, F. *Pimelodus paranaensis*, sp.n., um novo Pimelodidae (Pisces, Siluriformes) do Alto Paraná, Brasil. *Revista Bras. Zool.* 5(3):409-417, 1988.

CAMILO, F.M. Estudos citogenéticos e algumas espécies de peixes da família Loricariidae pertencentes à Bacia do Rio Piracicaba. **Dissertação de Mestrado**, Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, SP, 2004.

CASTRO, R.M.C., CASATTI, L., SANTOS, H.F., FERREIRA, K.M., RIBEIRO, A.C., BENINE, R.C., DARDIS, G.Z.P., MELO, A.L.A., ABREU, T.X., BOCKMANN, F.A., CARVALHO, M., GIBRAN, F.Z.; LIMA, F.C.T. Estrutura e composição da ictiofauna

de riachos do Rio Paranapanema, sudeste e sul do Brasil. *Biota Neotrop.* 3(1): <http://www.biotaneotropica.org.br/v3n1/pt/abstract?article+BN01703012003>, 2003.

CIPRIANO, R.R. Estudos Citogenéticos em Teleósteos marinhos pertencentes a Baía de Paranaguá- Paraná, Brasil. *Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade Federal do Paraná - Curitiba*, 2005.

DA SILVA CORTINHAS, M. C.; CESTARI, M. M.; SWARÇA, A. C.; FENOCCHIO, A.S. First chromosome data about the silverside *Atherinella brasiliensis* (Atheriniformes, Pisces) from the south coast of Brazil. Conventional, C-NOR and CMA3 bandings and FISH studies. *Caryologia*, 56, 2: 187 –191, 2003.

DE OLIVEIRA, R.R.; FELDBERG, E.; DOS ANJOS, M.B.; ZUANON, J. Karyotype characterization and ZZ/ZW sex chromosome heteromorphism in two species of the catfish genus *Ancistrus* Kner, 1854 (Siluriformes: Loricariidae) from the Amazon basin. *Neotropical Ichthyology*, 5(3):301-306, 2007.

DE PINNA, M.C.C. Phylogenetic relationships of Neotropical Siluriformes (Teleostei: Ostariophysi): Historical Overview and synthesis of hypotheses. *In: MALABARBA, L. R.; Reis, R. E.; Vari, R. P.; Lucena, Z. M. S.; Lucena, C. A. S. (Eds.). Phylogeny and classification of Neotropical fishes. Porto Alegre: EDIPUCRS. p.278-330, 1998.*

FARIA, K.C.; MORIELLE-VERSUTE, E. *In situ* hybridization of bat chromosomes with human (TTAGGG)_n probe, after previous digestion with AluI. *Genetic and Molecular Biology*, 25(4):365-371, 2002.

FENOCCHIO, A.S.; BERTOLLO, L.A.C. Supranumerary chromosomes in a *Rhamdia hilarii* population (Pisces, Pimelodidae). *Genetica*, 81: 193-198, 1990.

FENOCCHIO, A.S., VENERE, P.C.; CESAR, A.C.G.; DIAS, A. L.; BERTOLLO, L. A. C. Short term culture from solid tissues of fishes. *Caryologia* 44: 161–166, 1991.

FERNANDEZ, J. L.; GOYANES, V. J.; RAMIRO-DIAS J. e GOSALVEZ, J. Evidence of a differential organization of chromatin containing terminal or interstitial (TTAGGG)_n repeats by *in situ* digestion with nucleases. *Cytogenet Cell Genet* 82:195-198, 1998.

FERRARIS JR, C.J. Family Loricariidae: Subfamily Neoplecostominae. pp. 319–320 In *Check List of the Freshwater Fishes of South America*, R.E. REIS, S.O. KULLANDER; C.J. FERRARIS Jr. Edipucrs, Porto Alegre, RS, 2003.

FISCH-MULLER, S., 2003. Family Loricariidae: Subfamily Ancistrinae, pp. 373–400 in *Check List of the Freshwater Fishes of South America*, R.E. Reis, S.O. Kullander; C.J. Ferraris Jr. Edipucrs, Porto Alegre, RS.

GALLETI JR, P.M.; MARTINS, C. Contribuição da hibridização *in situ* para o conhecimento dos cromossomos de peixes. Capítulo 3. *In: Marcelo dos Santos Guerra. (Org.). FISH: Conceitos e Aplicações na Citogenética. Ribeirão Preto, SP: Sociedade Brasileira de Genética, p.61-88, 2004.*

GARCIA, F.; NOGUES, C.; GARCIA, M.; EGOZCUE, J.; PONSÀ, M. Characterization of constitutive heterochromatin in *Cebus apella* (Cebidae, Primates) and *Pan troglodytes* (Hominidae, Primates): comparison to human chromosomes. *Am. J. Primatol.*, 49:205-221, 1999.

GÉRY, J. The fresh-water fishes of South America. In: Biogeography and ecology in South America (E.J. Fittkau et al., eds.). Junk, The Hague, p. 828-848, 1969.

GIULIANO-CAETANO, L. Polimorfismo cromossômico Robertsoniano em populações *Rineloricaria latirostris* (Pisces, Loricariinae). Tese de doutorado. Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, SP, 1998.

GOSLINE, W.A. Contributions to the classification of the Loricariidae catfishes. *Arquivos do Museu Nacional do Rio de Janeiro* 41: 79–134, 1947.

HATANAKA, T. Estudos de marcadores cromossômicos e moleculares no peixe *Prochilodus marggravii* (Prochilodontidae), uma espécie de interesse econômico no rio São Francisco. PhD thesis, Universidade Federal de São Carlos, Brazil, 2000.

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

HSU, T.C.S.P.; CHEN, T.R.. The possibility of latent chromosomes and a proposed nomenclature system for total chromosome and whole arm translocations. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 15:41-49, 1975.

ISBRÜCKER, I.J.H., 1981. Revision of *Loricaria* Linnaeus, 1758 (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). *Beaufortia* 31: 51-96.

KAVALCO, K.F. Contribuição citogenética à análise da biodiversidade da ictiofauna das nascentes do rio Paraitinga. Dissertação de Mestrado, Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos – SP, 2003.

LANGANI, F. Ictiofauna do Alto Curso do rio Tietê (SP): taxonomia. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1989.

LANGANI, F. Diversidade da ictiofauna do Alto Rio Paraná: composição atual e perspectivas futuras. *Biota Neotropica* v7 (n3) – <http://www.biotaneotropica.org.br/v7n3/pt/abstract?article+bn03407032007>, 2007.

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

MAISTRO, E.L. Caracterização morfológica estrutural de cromossomos supranumerários em peixes. Tese de Doutorado. P. P. G. em Ciências Biológicas (área de concentração: Genética). Univ. Est. Paulista, Campus de Botucatu. 152p. 1996.

MANTOVANI, M.; ABEL, L.D.S.; MESTRINER, C.A.; MOREIRA-FILHO, O. Accentuated polymorphism of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): tools for understanding karyotypic evolution. *Genetica*, Vol 109 (3): 161-168, 2000.

MARGARIDO, P. V.; GALETTI JR, P. M. Amplification of a GC-rich heterochromatin in the freshwater fish *Leporinus desmotes* (Characiformes, Anostomidae). *Genet. Mol. Biol.*, v.23, nº 3, 2000.

MARTINS, C.; GALETTI Jr., P.M. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). *Chromosome Research* v.7: 363-367, 1999.

MEDRANO, L.; BERNARDI, G.; COUTURIER, J.; DUTRILLAUX, B.. Chromosome banding and genome compartmentalization in fishes. *Chromosoma*, 96: 178-183, 1988.

MEZZANOTTE, R.; BIANCHI, U.; VANNI, R.; FERRUCI, L. Chromatin organization and restriction endonuclease activity on human metaphase chromosomes. *Cytogenet. Cell Genet.*, 36: 562-566, 1983.

MICHELLE, J. L. ; TAKAHASHI, C. S. ; FERRATI, I. Karyotypic study of some species of the family Loricariidae (Pisces). *Cytologia*, 42: 539-546, 1977.

MILLER, D. A. ; DEV, V. G. ; TANTRAVAHU, R. ; MILLER, O. J. Suppression of human nucleolar organizer activity in mouse-human somatic hybrid cells. *Expl. Cell Res.*, 101: 235, 243, 1976.

MOREIRA-FILHO, O.; e BERTOLLO, L.A.C.. *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): species complex. *Brazil. J. Genet.*, 14: 331-357, 1991.

NELSON, J.S. *Fishes of the World*. 3rd ed. New York: John Wiley and Sons Inc., p. 523, 1994.

NOLETO, R.B.; VICARI, M.R.; CIPRIANO, R.R; ARTONI, R. F. e CESTARI, M.M. Physical mapping of 5S and 45S rDNA loci in pufferfishes (Tetraodontiformes). *Genetica* DOI 10.1007/s10709-006-9000-1, 2006.

OJIMA, Y.; UEDA, T.. New C-banded marker chromosomes found in carp-funa hybrids. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B*. 54: 15-20, 1979.

OLIVEIRA, C. Estudos citogenéticos e conteúdo de AND na família Callichthyidae (Pisces, Siluriformes). *Tese de Doutorado*. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, SP, 155p, 1991.

OLIVEIRA, C. & GOSZTONYI, A.E. A cytogenetic study of *Diplomystes mesembrinus* (Teleostei, Siluriformes, Diplomystidae) with a discussion of chromosome evolution in siluriformes. *Caryologia*, vol.53, n. 1:31-37, 2000.

OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; FORESTI, F. Revisão dos estudos citogenéticos em peixes neotropicais de águas continentais. Resumos VIII Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes, Manaus – AM, p. 24, 2000.

OZOUF-COSTAZ, C.; FORESTI, F. Fish cytogenetics research: advances, applications and perspectives. *In: Proceedings of the 7th International Congress of Ichthyology*. Netherlands Journal of Zoology, 42 (2-3): 277-290, 1992.

PENDÁS, A.M., MÓRAN, P.; GARCÍA-VAZQUEZ, E. Ribosomal RNA genes are interspersed throughout a heterochromatic chromosome arm in *Atlantic salmon*. *Cytogenet Cell Genet* 63: 128-130, 1993.

PINKEL, D., STRAUME, T.; GRAY, J.W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of National Academy of Sciences*, 83: 2934-2938, 1986.

PROVENZANO, F.; SCHAEFER S.A.; BASKIN J.N.; ROYERO-LEON R. New, possibly extinct Lithogenine loricariid (Siluriformes, Loricariidae) from Northern Venezuela. *Copeia* 2003: 562–575, 2003.

RAVEDUTTI, C.G.; JÚLIO Jr., H.F. Cytogenetic Analysis of three species of the Neotropical Family Auchenipteridae (Pisces, Siluriformes) from the Paraná River Basin, Brazil. *Cytologia*, 66: 65-70, 2001.

REIS, R.E., WEBER, C. e MALABARBA, L.R. Review of the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 from Southern Brazil, with descriptions of three new species (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). *Rev. suis. Zool.* 97(3): 729–766, 1990.

REIS, R. E., KULLANDER, S.O.; FERRARIS JR, C.J. Check List of the Freshwater Fishes of South America. Edipucrs, Porto Alegre, RS, 2003.

RIBEIRO, A.C. Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil: an example of faunal evolution associated with a divergent continental margin. *Neotrop. Ichthyol.* 4(3):225-246, 2006.

SAJDAK, S. L.; REED, K. M.; PHILLIPS, R. B.. Intradivisional and interspecies variation in the 5S rDNA of coregonid fish. *Journal of molecular Evolution.* 46, 680-688.

SCAVONE, M.D.P.; JÚLIO Jr., Horácio Ferreira. Cytogenetics analysis and heterochromatin distribution in ZZ/ZW sex chromosomes of the mailed catfish *Loricariichthys platymetopon* (Loricariidae: Siluriformes). *Brazilian Journal of Genetics.* v.18, n.1, p.31-35, 1995.

SCHAEFER, S. A. Relationships of *Lithogenes villosus* Eigenmann, 1909 (Siluriformes: Loricariidae): evidence from high-resolution computed microtomography. *Am. Mus. Novit.* 3401: 1–55, 2003.

SCHWEIZER D. Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. *Chromosoma*. 58:307-324, 1976.

SERRA, J.P., CARVALHO, F.R.; LANGEANI, F. Ichthyofauna of the rio Itatinga in the Parque das Neblinas, Bertioga, São Paulo: composition and biogeography. *Biota Neotropica* 7(1): <http://www.biotaneotropica.org.br/v7n1/pt/abstract?article+BN01707012007>, 2007.

SOLA, L.; BRESSANELLO, S.; ROSSI, A.R.; IASELLI, V.; CROSSETTI, D.; CATAUDELLA, S. A karyotype analysis of the genus *Dicentrarchus* by different staining techniques. *Journal of Fish Biology*, 43: 329-337, 1993.

SOUZA, I.L.; MOREIRA-FILHO, O.; GALETTI Jr., P.M. Heterochromatin differentiation in the characid fish *Astyanax scabripinnis*. *Brazil. J. Genet.* 19(3): 405-410, 1996.

SUMNER, A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Expl. Cell Res.*, 75:304-306, 1972.

SWARÇA, A.C.; GIULIANO-CAETANO, L. e DIAS, A.L. Analyses of nucleolus organizer regions and heterochromatin of *Pimelodus maculatus* (Pisces, Pimelodidae). *Genetica*, 110:97-100, 2000.

VARI, R.P. The Curimatidae, a lowland neotropical fish family (Pisces: Characiformes); distribution, endemism, and phylogenetic biogeography. In: *Proceedings of a Workshop on Neotropical Distribution Patterns* (W.R. Heyer & P.E Vanzolini, eds). Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, p. 343-377 – 1988.

VARI, R.P.; MALABARBA, L.R.. Neotropical ichthyology: Na overview. IN: *Phylogeny and classification of Neotropical Fishes* (eds. Malabarba, L.R.; Reis, R.E.; Vari, R.P.; Lucena, Z.M.S. e Lucena, C.A.S.), Edpurcs, Porto Alegre – Brasil (eds. L.R. Malabarba, R.E. Reis, R.P. Vari, Z.M.S Lucena e C.A.S Lucena), pp. 1-11, 1998.

VICENTE, V.E. Estudos cromossômicos em três populações de *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas e da Saúde*, Universidade Federal de São Carlos - São Carlos, SP, 78f., 1994.

WASKO, A.P.; GALETTI Jr, P.M. Mapping 18S ribosomal genes in fish of the genus *Brycon* (Characidae) by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Genet. Mol. Biol.* 23(1): 135-138, 2000.

WEBER, C. Subfamily Hypostominae, pp. 351–372 in *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America*, edited by R.E. Reis, S.O. Kullander & C.J. Ferraris Jr. EDIPUCRS, Porto Alegre, 2003.

WEITZMAN, S.H.; MALABARBA, L.R. Systematics of *Spintherobolus* (Teleostei: Characidae: Cheirodontinae) from Eastern Brazil. *Ichthyol. Explor. Freshwaters* 10(1):1-43, 1999.