

ROGER RAUPP CIPRIANO

**ESTUDO CARIOTÍPICO EM BELONIFORMES DO GÊNERO *Strongylura*
(PEIXE AGULHA) COM OCORRÊNCIA NO LITORAL PARANAENSE**

Monografia apresentada a disciplina de Estágio em Genética (BG016), Departamento de genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: **Alberto Sérgio Fenocchio**

**CURITIBA
2002**

“O dia há de vir em que a pesquisa irá revelar várias coisas que hoje parecem misteriosas[...] O dia há de vir em que nossos descendentes irão se chocar com a nossa ignorância de tantas coisas que para eles são tão óbvias.”

Sêneca, filósofo romano (4 a.C. – 65 d.C.)

AGRADECIMENTOS

O meu ingresso e interesse no campo da genética de peixes deve-se a oportunidade fornecida pela Profa. Dra. Marta Margarete Cestari, como estagiário. Agradeço a ela pelos ensinamentos, pois sem estes não seria possível a realização deste trabalho.

Agradeço a meus pais pela insistente cobrança da entrada na Universidade, apoio e incentivo constante.

A todo o pessoal do Laboratório de Citogenética Animal da UFPR: Andrea, Daniel, Deborah, Elizabete, Fátima, Iris, Marcos, Maria Cristina, Rafael (Polly), Rafael, Roxane e Sabine.

Ao Prof. Dr. Ives José Sbalqueiro pelo incentivo, pelas trocas de idéias úteis na minha formação como Biólogo.

Ao Prof. Dr. José Fernando de S. Lima pelas sugestões na conclusão deste trabalho de monografia.

Aos amigos de turma de graduação e de bagunça pelo companheirismo.

Agradeço em especial a Odete e Adilar pela amizade, apoio e incentivo.

Aos meus familiares, aos meus irmãos Denner e Marcelo.

Ao Prof. Dr. Alberto Sérgio Fenocchio pela orientação, sugestões e auxílios dados para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS.....	vi
RESUMO	vii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Litoral do Paraná.....	1
1.2. Aspectos Taxonômicos de <i>Strongylura timucu</i>	4
1.3. Citogenética de Peixes.....	7
2. OBJETIVOS	10
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1. Material	11
3.2. Métodos	11
3.2.1. Coleta.....	11
3.2.2. Obtenção de Metáfases Mitóticas	13
3.2.2.1. Método direto	13
3.2.2.2. Método indireto – Cultura de curto tempo.....	15
3.2.3. Análise do Material e Coloração Convencional	16
3.2.4. Caracterização das Regiões Organizadoras de Nucléolos (RONs).....	17
3.2.5. Detecção das Regiões de Heterocromatina (Banda C)	18
3.2.6. Clivagem com Endonucleases de Restrição.....	19
3.2.7. Técnica de Coloração com Cromomicina A ₃	21
3.2.8. Montagem e Análise dos Cariótipos	22
4. RESULTADOS	23
5. DISCUSSÃO	29
6. CONCLUSÕES	32
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** LOCALIZAÇÃO DA GAMBOA BAGUAÇU NA BAÍA DE PARANAGUÁ...
..... 12
- Figura 2.** COLETA DE EXEMPLARES NA SAÍDA DA GAMBOA DO BAGUAÇU -
BAÍA DE PARANAGUÁ – PR. 13
- Figura 3.** HISTOGRAMA REPRESENTATIVO DAS FREQUÊNCIAS DOS
NÚMEROS DIPLÓIDES ENCONTRADOS PARA *Strongylura timucu*. 24
- Figura 4.** CARIÓTIPO DE MACHO E FÊMEA DE *Strongylura timucu*
COLETADOS NA BAÍA DE PARANAGUÁ. $2n = 48 (10M + 2SM + 36A)$; $NF = 60$.
..... 25
- Figura 5.** METÁFASES MITÓTICAS DE *Strongylura timucu*. **A e B:** COLORAÇÃO
SEQUENCIAL (A – GIEMSA; B – BANDA C); **C:** BANDA C, AS SETAS INDICAM
CROMOSSOMOS COM DUAS BANDAS HETEROCROMÁTICAS, AS FLECHAS
INDICAM OS CROMOSSOMOS DA RON; **D:** CARIOGRAMA COM BANDA C. . 27
- Figura 6.** METÁFASES MITÓTICAS DE *Strongylura timucu*. **A E B:** SEQUENCIAL
(A – ENZIMA DE RESTRIÇÃO *Alu I*; B – RON); **C E D:** COLORAÇÃO COM
FLUOROCROMO BASE ESPECÍFICO CROMOMICINA A_3 ; AS SETAS INDICAM
OS PORTADORES DAS RONS. 28

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – NÚMERO DIPLÓIDE ENCONTRADO NOS EXEMPLARES DE <i>Strongylura timucu</i>, DO LITORAL PARANAENSE.	23
---	-----------

RESUMO

Os estudos de cariótipos de peixes marinhos iniciaram-se em 1943 com trabalho de WICKBOM e desde então vários peixes foram cariotipados, somando um total de 921 espécies, 252 gêneros e 44 famílias de águas continentais, porém muito poucos cariótipos de peixes marinhos foram estudados. No Brasil apenas 81 espécies foram analisadas, sendo a maioria dos litorais do Rio de Janeiro e São Paulo. Os peixes marinhos apresentam uma grande uniformidade e pequena variabilidade no número cromossômico, principalmente em teleósteos. Os animais estudados neste trabalho foram coletada na Baía de Paranaguá, saída da Gamboa de Bagaçu, município de Pontal do Paraná. Dez peixes-agulha (*Strongylura timucu*) foram analisados e apresentaram um número diplóide ($2n$) de 48 cromossomos, com 10 metacêntricos (M), 02 submetacêntricos (SM) e 36 acrocêntricos (A) e número fundamental (NF) igual a 60. Quanto à microestrutura, com a técnica de banda C foram marcadas regiões proximais em SM e centroméricas em M e A, destacando-se um par de cromossomos M, provavelmente o 3º do complemento, onde foram observados dois blocos banda C+, quando distendidos. Os resultados obtidos com a enzima *AluI* mostraram padrões que se assemelham a bandas C como ocorre com a maioria dos peixes. A coloração com $AgNO_3$ evidenciou RONS em apenas um par de SM, coincidente às contrações secundárias. O fluorocromo Cromomicina A_3 evidenciou regiões do DNA ricas em bases GC que no caso da *Strongylura timucu* encontraram-se localizadas no par de cromossomos SM na mesma posição da Região Organizadora de Nucléolos destacando-se um heteromorfismo de tamanho. Os resultados de *Strongylura timucu* obtidos no presente trabalho mostram um cariótipo com $2n = 48$ cromossomos similar ao da maioria das 81 espécies de peixes marinhos já cariotipados da costa brasileira. Os dados deste trabalho representam a primeira descrição citogenética detalhada de um Beloniforme da costa brasileira, caracterizando uma pequena parcela do número potencial de espécies que poderão ser exploradas litoral paranaense.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Litoral do Paraná.

Os oceanos e mares cobrem 71% da superfície terrestre, sendo que no hemisfério sul essa porcentagem corresponde a 81%, e no hemisfério norte a 51%. Eles são os grandes responsáveis pelo equilíbrio térmico do globo, em consequência da elevada evaporação ocorrida sobre eles e da grande circulação de suas águas (CONTI ; FURLAN, 2000).

Os oceanos tropicais estão divididos por massas continentais no Indo-Pacífico e no Atlântico. O Atlântico pode ser considerado um oceano jovem, se comparado com partes do Pacífico, e possui uma fauna muito menos variada. O Atlântico ocidental apresenta uma riqueza faunística muito maior que o oriental, pelo contato que manteve com o Pacífico antes da formação do Istmo do Panamá e pelas correntes quentes que rumam ao Norte ao longo da costa da América do Norte e ao sul ao longo da costa brasileira (LOWE-McCONNELL, 1999).

O litoral brasileiro apresenta cerca de 8.000 Km de extensão. Nesta imensidão de costa está inserido o litoral paranaense, um dos menores do Brasil, com 107 Km. Geográfica e economicamente, é considerado como uma porta ou uma zona de passagem para o oceano (MAACK, 1981).

A zona litorânea paranaense se estabeleceu devido a movimentos tectônicos que se relacionam as formações da Cordilheira dos Andes e da Bacia do Rio Paraná. Segundo MAACK (1981), estes fenômenos originaram abaixamento na borda leste do continente sul-americano inundando antigos vales, formando então as atuais enseadas de Paranaguá e Guaratuba. Essas duas baías dividem o litoral do Paraná em três setores naturais: ao norte a "Praia Deserta", no centro a "Praia de Leste" e ao Sul a "Praia do Sul".

As baías recebem um grande número de desembocaduras de rios provenientes da Serra do Mar, entre eles o Rio Morato, o Rio Guaraqueçaba, o Rio Cachoeira, o Rio Curitibaíba e o Rio Cubatão (MAACK, 1981). A mistura de águas doce e salgada propicia a existência de ecossistemas costeiros, os

manguezais (SCHAEFFER-NOVELLI, 1991). Este ecossistema estuarino é típico de regiões tropicais e sub-tropicais, que se desenvolvem na zona entremarés em regiões de baixa energia na linha da costa. Constituem ecossistemas de transição entre o ambiente terrestre e marinho (PEREIRA; CHAVES; RODRIGUES, 1999). A formação mangrove predomina nas orlas das baías, ocupando uma área de 557 Km² (MAACK, *op.cit.*).

Além do manguezal, o sistema constituído pelas baías de Paranaguá e Guaratuba apresenta marismas, gamboas (canais no manguezal) e planícies de maré. Este mosaico de habitats oferece vários e abundantes recursos alimentares, proteção contra predação e outras condições que favorecem o crescimento e sobrevivência dos estágios iniciais do ciclo de vida de peixes.

A abundância e a diversidade de peixes em regiões estuarinas e lagunares está relacionada diretamente à salinidade, que é um fator sazonal. Em estações chuvosas ocorre a penetração nestas regiões de algumas espécies dulcícolas e em estações secas a maior abundância é de peixes marinhos. Outros fatores bastante expressivos são a temperatura e oxigênio dissolvido na água (VAZOLLER; SOARES; CUNNINGHAM, 1999). Porém, a competição interespecífica e a predação também afeta a fauna local (KENNISH, 1990).

A ictiofauna brasileira é constituída por peixes exclusivamente tropicais, entre o extremo norte e a região de Cabo Frio (RJ) e por uma fauna mista, tropical e temperada, entre Cabo Frio e a península de Valdez, na Argentina (VAZOLLER; SOARES; CUNNINGHAM, 1999). Segundo FIGUEIREDO (1981) a segunda é considerada uma região de transição faunística, onde está incluída a costa paranaense.

Levantamentos da ictiofauna do estuário da Baía de Paranaguá e áreas adjacentes (CORRÊA, 1987; VENDEL; LOPES; SPACH, 1999; LOPES; SPACH; CORRÊA, 2000), da zona de arrebenção e infralitoral raso entre Pontal do Sul e Praia de Leste (MAEHAMA; CORRÊA, 1987), de três localidades da Ilha do Mel (PINHEIRO, 1999) e em outros locais do litoral do Paraná, comprovam a grande diversidade de espécies de peixes presente neste litoral. A maior diversidade foi descrita para o sistema da Baía de Paranaguá com cerca de 142 espécies de

peixes (7 condrícties e 135 osteícties (teleósteos)). Em geral, peixes das famílias Sciaenidae, Engraulidae, Atherinidae, Mugilidae, Clupeidae, Bothidae e Pleuronectidae são as mais abundantes nestas áreas estuarinas.

1.2. Aspectos Taxonômicos de *Strongylura timucu*.

Classificação sistemática da espécie, segundo NELSON (1994):

Phylum Chordata

Subphylum Vertebrata (Craniata)

Superclasse Gnathostomata

Grade Teleostomi

Classe Actinopterygii

Subclasse Neopterygii

Infraclasse Halecostomi

Divisão Teleostei

Infradivisão Euteleostei

Superordem Acanthopterygii

Serie Atherinomorpha

Ordem Beloniformes

Família Belonidae

Gênero *Strongylura*

Espécie *Strongylura timucu*

Há três subfilos no filo Chordata: Urochordata (os tunicados ou ascídias), Cephalochordata (os anfioxos) e Vertebrata. Os Vertebrados apresentam um encéfalo verdadeiro dividido em várias vesículas e um crânio (estrutura esquelética que sustenta e protege o encéfalo) que os tornam únicos. O subfilo Vertebrata compreende as superclasses Agnatha e Gnathostomata. Este último grupo é assim denominado pela presença das mandíbulas. Esta estrutura permitiu a estes animais obter alimentos mais duros e, portanto, adaptar-se a muitos e diversos modos de vida. Enquadram-se neste grupo os peixes e tetrápodes (HILDEBRAND, 1995).

Os peixes dividem-se em três classes Acanthodii, Sarcopterygii e Actinopterygii. A última está composta pelas subclasses Chondrostei e

Neopterygii. A Divisão Teleostei, que com os Holostei e Chondrostei constituem a classe Actinopterygii, correspondem a cerca de 96% de todos peixes existentes, 23.637 espécies em 38 ordens, 426 famílias e 4.064 gêneros (NELSON, 1994) e são conhecidos como “peixes ósseos modernos”.

PATERSON (1968), propôs que os teleósteos formam um grupo natural e monofilético. Todos os grupos incluídos nesta Infraclasse possuem esqueleto caudal e modificações na musculatura da mandíbula que os distinguem dos outros Actinopterygii.

Os representantes marinhos do grupo Teleostei ocupam todos os mares do mundo e são representados pelos Elopomorpha, Clupeiformes, Stenopterygii, Siopolomorpha, Paracanthopterygii, Beryciformes, Syngnathiformes, Scorpaeniformes, Perciformes, Pleuronectiformes e Tetradontiformes.

Os Euteleostei possuem cerca de 17000 espécies em 25 Ordens e 375 Famílias (NELSON, 1994) e constituem o maior grupo dentro dos Teleosteos. Três características corroboram a monofilia deste grupo: nadadeira adiposa dorsal, tubérculos nupciais na cabeça e corpo e componente membranoso anterior no primeiro uroneural. Os Euteleosteos compreendem os Protacanthopterygii, os Ostariophysi e os Neoteleostei.

Os Neoteleostei, representam um grupo monofilético, pois possuem uma mandíbula superior especializada, constituem a maioria dos Teleósteos marinhos atuais, e muitas espécies dulciaquícolas. Dentro dos Neoteleosteos destacam-se os Acantopterygii com 13 Ordens e divididos em 3 séries, os Atherinomorpha, os Mugilomorpha e os Percomorpha (NELSON, 1994). Os primeiros são conhecidos desde o Eoceno e apresentam uma larga distribuição geográfica. Apresentam evidências de constituírem um grupo monofilético. Entre os seus representantes estão os Beloniformes. Os Beloniformes são divididos em 5 famílias com 38 gêneros e 191 espécies (NELSON, *op. cit.*). Cerca de 51 espécies são restritas a ambientes de água doce. A família Belonidae está distribuída em ambientes marinhos e dulciaquícolas, tanto em águas temperadas quanto tropicais. Suas escamas são extremamente reduzidas e o comprimento máximo é de 1 metro, alcançado em *Tylosurus crocodilus*. São facilmente identificados pela mandíbula e

maxila prolongadas em forma de bico (BARLETTA; CORRÊA, 1992). A maioria das espécies desta família estão contidas nos gêneros *Tylossurus* e *Strongylura*.

1.3. Citogenética de Peixes.

A citogenética de peixes teve sua origem com o trabalho de WICKBOM, sobre o cariótipo de espécies de Cyprinodontiformes, em 1943. Na década de 50 começaram os estudos em peixes neotropicais e somente mais tarde, no início da década de 70 é que pesquisadores brasileiros ingressaram nesta área. Foi também nesta época que a citogenética teve um maior desenvolvimento, devido ao melhoramento e descoberta de outras técnicas e novos métodos (inibidores mitóticos, tratamentos hipotonizantes para estudo das células em divisão, técnica de suspensão de células, métodos diretos de obtenção de metáfases (BERTOLLO; TAKAHASHI; MOREIRA-FILHO, 1978), métodos de cultura de linfócitos (FENOCCHIO; BERTOLLO, 1988) e métodos de cultura de curto tempo de tecidos sólidos (FENOCCHIO et al., 1991), permitindo atualmente o conhecimento dos cariótipos de um número bem maior de espécies. Já foram estudados até o momento os cariótipos com coloração convencional de 921 espécies, 252 gêneros e 44 famílias de águas continentais (OLIVEIRA; ALMEIDA-TOLEDO; FORESTI, 2000). Estes números, quando comparados aos de mamíferos e outros grupos de seres vivos, se tornam muito reduzidos, cobrindo apenas 14% das espécies conhecidas. Segundo DOUCETTE e FITZSIMONS (1988), há pelo menos duas razões para o fato: primeiramente, os cromossomos da maioria dos peixes são bem menores, sendo que o comprimento médio total de todos os cromossomos de um cariótipo de peixe perfaz somente cerca de 20% do de mamíferos; segundo, as técnicas de bandamento, que são altamente desenvolvidas em mamíferos, não são tão resolutivas no estudo de cromossomos de peixes (BRUM, 1995).

A citogenética em peixes marinhos, no Brasil, iniciou-se na década de 80 com a descrição dos cariótipos de *Micropogonias furnieri* e *Menticirrhus americanus* (GOMES, 1981). Dentro da ictiofauna brasileira constituída por numerosíssimas espécies, poucos peixes marinhos tem sido cariotipados, quando comparados às espécies de água doce. Até o momento, foram estudadas 81 espécies distribuídas em 31 famílias e 57 gêneros (OLIVEIRA, 2000). Em sua maioria estas espécies estão dentro da Classe Osteichthyes e da Infraclasse

Teleostei, tendo sido coletadas principalmente no litoral dos estados do Rio de Janeiro e São Paulo (BRUM, 1996).

Estudos citogenéticos em teleósteos revelam uma grande variação no número cromossômico (de 14 a 140) concentrando a maioria das espécies num número diplóide modal com $2n = 48$ cromossomos acrocêntricos. OHNO (1970) e OHNO; WOLF; ATKIN (1968) propuseram este ser o cariótipo primitivo dos peixes, considerado o original dos vertebrados, devido a sua alta freqüência. BRUM (1995) discorda desta hipótese, partindo da proposta de DOUCETTE; FITZSIMONS (1988), que acham muito difícil prosseguir aceitando esta condição como primitiva para os peixes teleósteos, uma vez que os estudos de grupos externos teleósteos não mostram este cariótipo. A hipótese alternativa propõe um cariótipo primitivo constituído por 60 cromossomos, com alguns metacêntricos, ocorrendo posterior redução para 48 cromossomos acrocêntricos, através de rearranjos robertsonianos (fusões) e deleções. O cariótipo de 48 cromossomos acrocêntricos, em Clupeiformes e Euteleostei, é considerada uma característica sinapomórfica, compartilhada principalmente em suas formas marinhas, conservada após a redução do número cromossômico (BRUM *op. cit.*).

Os teleósteos marinhos apresentam uma pequena variabilidade no número cromossômico e grande uniformidade cariotípica, quando comparados aos de água doce, que apresentam uma maior diversidade. Esta diferença é decorrente, provavelmente, de características do ambiente e das populações dos peixes marinhos, como a ausência de barreiras e o grande tamanho de suas populações (BRUM, 1995).

Entre os Euteleostei as superordens Ostariophysii, Protacanthopterygii e Acanthopterygii são as mais representativas. Os Ostariophysii são em sua maioria peixes dulcícolas e apresentam complemento cariotípico em torno de $2n = 50$, reflexo da presença de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos nos seus cariótipos (BRUM; GALETTI Jr., 1997). Os Acanthopterygii estão divididos em três séries e sua espécies apresentam cariótipos variando em seu número diplóide.

Os Mugilomorpha, exclusivamente marinhos, apresentam preferencialmente cariótipos de 48 cromossomos e $NF = 48$ (RISHI e SINGH, 1982; PAULS; COUTINHO, 1990; LeGRANDE; FITZSIMONS, 1976).

Dentro dos Percomorpha, a maioria das espécies apresenta 48 cromossomos (BRUM; GALETTI Jr., 1997; CORRÊA; GALETTI Jr., 1995; AGUILAR; GALETTI Jr., 1997). Espécies da ordem Tetraodontiformes apresentam cariótipos variando entre 28 e 52 cromossomos, que BRUM e GALETTI Jr. (op. cit.) consideram variações do cariótipo base dos Percomorpha. Diferentemente dos peixes Tetraodontiformes, os Perciformes cariotipados, demonstram uma grande conservação no número diplóide (48) e fundamental (48), chegando a cerca de 67% das espécies com cariótipos descritos (BRUM, 1995).

Os Atherinomorpha apresentam na maioria de suas espécies $2n = 48$, mas também foram observados cariótipos com 46 e 50 cromossomos (RISHI, 1973; RISHI; SINGH, 1982; BRUGGER; BORN; LEVY, 1990; CORRÊA *et al.*, 1995; entre outros). Nos Beloniformes os carótipos com 48 cromossomos acrocêntricos são comuns, porém ocorrem algumas variações como nas espécies dulciaquícolas *Strongylura microps* e *Potamorrhaphis cf. eigenmanni* (PASTORI *et al.*, 1998).

Com o desenvolvimento na aplicação das técnicas de bandamento C e detecção de regiões organizadoras de nucléolos (RONs) a maioria dos peixes cariotipados da costa brasileira já foram caracterizados utilizando estas metodologias (42 espécies para banda C e 49 para NOR). Quanto a utilização da técnica de bandamento G em peixes, os resultados tem-se mostrado insatisfatórios possivelmente devido a peculiaridades de estrutura e composição do DNA desses animais (MEDRANO *et al.*, 1988 apud VENERE, 1991). Devido às dificuldades em se obter bons padrões de bandamento G e C em algumas espécies de peixes, uma alternativa é a utilização de enzimas de restrição (ER). Estas enzimas produzem diferentes padrões de bandamento dependendo da espécie e enzima utilizadas.

Poucos estudos citogenéticos em espécies de peixes marinhos tem-se realizado no litoral paranaense, sendo importantes e necessários para um melhor conhecimento da biologia geral, relações taxonômicas e evolução destes organismos.

2. OBJETIVOS

- Caracterizar citogeneticamente a espécie *Strongylura timucu*, com a utilização das técnicas de coloração convencional, bandamento C, regiões organizadoras de nucléolos (RONs), enzimas de restrição (*A/ul*) e fluorocromo base específico para GC (cromomicina A₃).

- Discutir e comparar os resultados obtidos com os encontrados na literatura.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

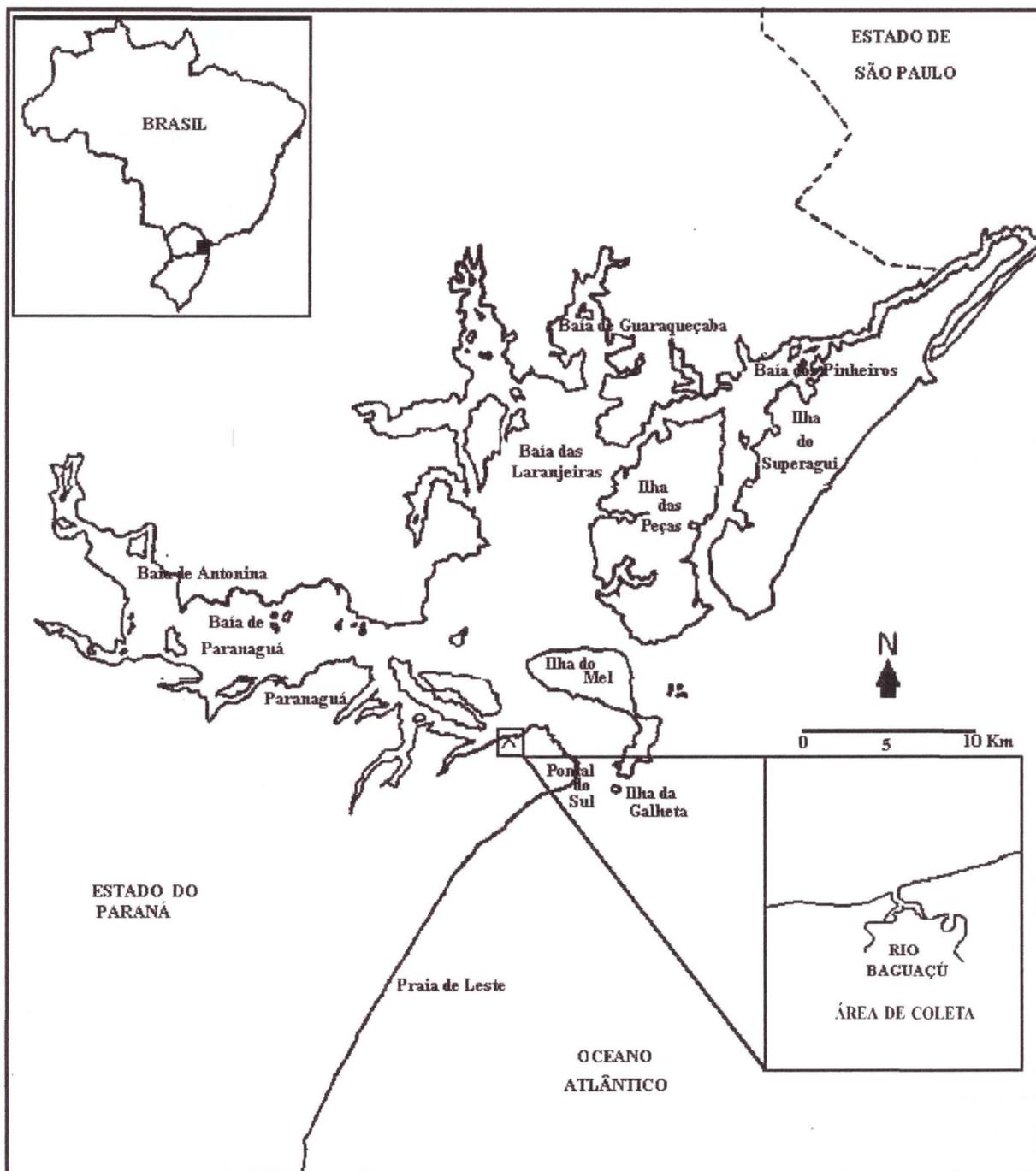
O presente estudo refere-se a análise cariotípica de exemplares de *Strongylura timucu*, popularmente conhecidos como “peixe agulha”. Os espécimens foram coletados na Baía de Paranaguá, foz da Gamboa de Baguaçu, município de Pontal do Paraná, litoral paranaense (figura 1).

3.2. Métodos

3.2.1. Coleta

Os exemplares estudados foram coletados com rede de arrasto com malhas de 1,2 cm entre nós (figura 2). Após a coleta foram mantidos em recipientes com água, devidamente aerados, para transporte. Os animais foram levados ao Laboratório de Citogenética Animal, no Departamento de Genética, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, onde foram sacrificados e retirada a porção anterior do rim, que é de interesse à citogenética, e colocadas em meio RPMI com 20% de soro bovino fetal. O sexo dos animais foi determinado e catalogado pela análise das suas gônadas. O processamento do material seguiu-se posteriormente de acordo com as técnicas descritas a seguir.

FIGURA 1. LOCALIZAÇÃO DA GAMBOIA BAGUAÇU NA BAÍA DE PARANAGUÁ.



FONTE: Centro de Estudos do Mar – CEM – UFPR.

FIGURA 2. - COLETA DE EXEMPLARES NA SAÍDA DA GAMBOA DO BAGUAÇU - BAÍA DE PARANAGUÁ – PR.

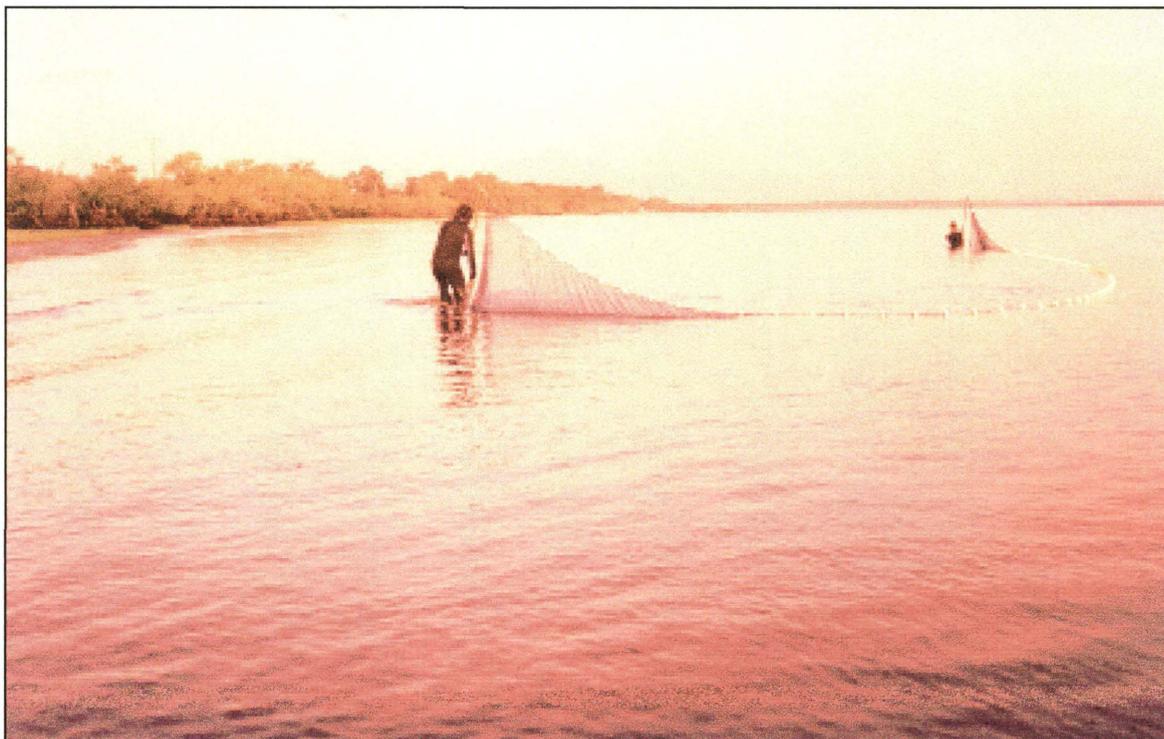


FOTO: Marta Margarete Cestari

3.2.2. Obtenção de Metáfases Mitóticas

3.2.2.1. Método direto

A técnica direta é realizada utilizando-se a porção cefálica do rim para a obtenção dos cromossomos mitóticos, descrita por BERTOLLO; TAKAHASHI; MOREIRA-FILHO (1978).

1) Injeta-se intra-peritonealmente, entre as nadadeiras peitorais e ventrais, solução aquosa de colchicina (0,025%), retirada previamente da geladeira e

deixada à temperatura ambiente. A quantidade injetada corresponde à proporção de 1ml/ 100gr de peso do animal.

2) O peixe deve ficar em aquário bem aerado por um período de aproximadamente 20 minutos (este tempo é dependente do metabolismo da espécie).

3) Decorrido este tempo, o animal é sacrificado e é retirado a porção cefálica do rim. Para animais grandes, utiliza-se 3 mm³ de material. Esse é lavado rapidamente em solução hipotônica de KCl (0,075 M), à temperatura ambiente, sendo posteriormente transferido para cubas de vidro com 10ml desta solução.

4) O material é dissociado com pinça de dissecação. Deve-se aspirar e expirar suavemente com o auxílio de uma seringa desprovida de agulha, o que facilita a separação dos blocos celulares.

5) Com uma pipeta Pasteur deve-se pegar o líquido (tomando cuidado para não pegar tecido), e colocar num tubo de ensaio. Esta solução deve ser colocada em uma estufa (ou banho maria) a 37^oC por 30 minutos.

6) Após os 20 minutos de hipotonização, observar se existem pedaços não desfeitos no fundo do tubo de ensaio. Caso haja, estes devem ser descartados.

7) São acrescentadas algumas gotas de fixador (álcool metílico 3: ácido acético 1) recém preparado e gelado. O material é ressuspensionado e centrifugado durante 10 minutos, a 800-900 rpm. Descarta-se o sobrenadante com uma pipeta Pasteur.

8) Ao material restante no fundo do tubo (células) é adicionado 2 ml de fixador gelado, sendo ressuspensionado suavemente com uma pipeta Pasteur. Completar o volume até 7 ml e ressuspender novamente o material até que se torne homogêneo. A suspensão é centrifugada durante 10 minutos, a 800-900 rpm e em seguida descarta-se o sobrenadante.

9) Repetir o passo anterior mais uma vez.

10) Após a última centrifugação e eliminação do sobrenadante, adiciona-se uma quantidade de fixador suficiente para se obter uma suspensão celular que não esteja diluída nem concentrada (\pm 2ml de fixador). O material é ressuspensionado

com suavidade até ficar bem homogêneo e em seguida guardado em Eppendorfes de 1,5 ml.

3.2.2.2. Método indireto – Cultura de curto tempo

Foi empregada a técnica de cultura de tecidos sólidos a curto tempo (FENOCCHIO *et al.*, 1991), que consiste das etapas seguintes.

1) Retirou-se a porção anterior do rim cefálico com aproximadamente 3 mm³ (mantida até então na solução salina de Hank's) e transferiu-se para uma placa de Petri contendo 10 ml de meio de cultura RPMI mais 20% de soro bovino fetal.

2) Desagregou-se o material de mesma forma que no método anterior. Após a obtenção da suspensão celular, esta foi incubada em estufa a 30°C por 6-7 horas em média.

3) Vinte minutos antes de se sacrificar o meio, pingou-se 3 gotas de colchicina (0,025%) em cada recipiente. Agitou-se gentilmente o frasco para homogeneizar o material. O frasco foi mantido na estufa neste período.

4) Decorridos 20 minutos, sacrificou-se o meio, transferindo-o para um tubo de ensaio e centrifugando-o por 10 minutos a 800-900 rpm.

5) Descartou-se o sobrenadante e completou-se o tubo (8 ml) com solução hipotônica (KCl aq. 0,075M). O material foi resuspendido até ficar homogêneo, em seguida colocou-se o tubo em banho maria por 20 minutos a 37°C.

7) Segue a partir do passo 8 do método anterior.

3.2.3. Análise do Material e Coloração Convencional

O material, após retirado do freezer (-20°C) é gotejado (2 a 3 gotas) sobre uma lâmina (previamente limpa e conservada em álcool na geladeira) colocada no vapor de um banho maria à 60°C. Após gotejamento, as lâminas são secas ao ar.

A coloração segue a técnica tradicional, com uso de uma solução de Giemsa a 5% em tampão fosfato (pH 6,8) por 10 minutos. Em seguida, as lâminas são lavadas em água corrente e secas ao ar.

Esta coloração convencional permite a análise do número, morfologia e fórmula cromossômica.

3.2.4. Caracterização das Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONs)

A técnica utilizada foi descrita por HOWELL e BLACK (1980), a qual cora as regiões organizadoras de nucléolos (RONs) através da utilização de uma solução aquosa de nitrato de prata (AgNO_3). As regiões que foram marcadas são as que estavam ativas na intérfase precedente, corando os cromossomos metafásicos.

A técnica de HOWELL e BLACK (1980) com algumas modificações segue as etapas:

1. São utilizadas lâminas pingadas conforme a técnica anterior. Em alguns casos a lâmina foi envelhecida por até 5 dias em uma estufa de aproximadamente 45 °C.
2. Foi utilizada uma solução aquosa de nitrato de prata a 50% (0,5g de AgNO_3 em 1 ml de H_2O destilada, recém preparada) e uma solução aquosa de gelatina a 2% (1g de gelatina sem sabor comum em 50ml de H_2O destilada, acrescenta-se 0,5ml de ácido fórmico), esta última foi acondicionada em frasco âmbar e mantida em geladeira
3. Sobre a lâmina foi pingada 2 gotas da solução de gelatina, sobre esta gota, pingaram-se duas gotas da solução aquosa de nitrato de prata.
4. As gotas foram misturadas e a lâmina foi coberta com uma lamínula grande.
5. A lâmina assim preparada foi levada para estufa de 60°C, após aproximadamente 5 minutos, quando a lâmina ficou com uma coloração dourado-acastanhada foi retirada da estufa.
6. A lamínula foi removida com um jato de água destilada e a lâmina foi colocada em uma solução de Giemsa muito diluída por 30 segundos, apenas para retirar o brilho da coloração.
7. A lâmina foi seca ao ar.
8. As lamínulas foram então lavadas em solução sulfocrômica, enxaguadas em água corrente e deixadas secando ar.

3.2.5. Detecção das Regiões de Heterocromatina (Banda C)

Para a detecção de heterocromatina foi utilizada a técnica descrita por SUMNER (1972), com algumas modificações:

1. Foi pingado sobre uma lâmina a solução de suspensão celular anteriormente fixada, no banho maria a 37°C. Em seguida a lâmina foi colocada em solução de HCl 0,2N, a temperatura de 42°C durante 15 minutos.
2. A lâmina foi lavada em água deionizada, deixada secar ao ar.
3. Em seguida foi colocada num tubete contendo uma solução aquosa de hidróxido de bário a 5%, recém preparada e filtrada, a 42°C durante 50 segundos. A lâmina foi lavada rapidamente em solução de HCl 0,2N, para interromper a ação da solução de hidróxido de bário.
4. Em seguida foi lavada com jatos de água destilada e deixada secar ao ar.
5. A lâmina foi incubada numa solução salina 2xSSC, por 1 hora a 60°C.
6. Após este período foi lavada novamente e deixada secar ao ar.
7. Em seguida foi corada com solução Giemsa a 2% em tampão fosfato pH 6,8 durante 30 minutos. Lavar em água deionizada e secar ao ar.

3.2.6 Clivagem com Endonucleases 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.

- Foi pingada uma lâmina em banho maria a 60° C. Esta foi levada à estufa de 45° C para envelhecer por um dia.

A - Preparo da solução de enzima:

- Foi estabelecida a concentração desejada (A). Ex: 0,3 µl da enzima *A*/µl;
- Foi observado no rótulo ou na bula do frasco da enzima a concentração em que a mesma é fornecida (B). Ex: *A*/µl, 10ud/µl;
- Foi estabelecido o número de gotas de suspensão que foram tratadas, usando uma gota para cada lâmina sendo que para cada gota são usados 30µl (C);
- Foi calculado o volume total de enzima que deve ser retirado do frasco (X) usando a seguinte equação:

$$A \cdot C = B \cdot X \quad X = (A \cdot C) / B$$

$$0,3 \cdot 30 = 10 \cdot X \quad X = 0,9 \mu\text{l}$$

- Preparou-se a solução da enzima da seguinte forma:
- Foram colocados em um tubo de micropipeta tipo Eppendorf 27 µl de água destilada para cada gota de suspensão celular tratada;
- Foram adicionados 3 µl de tampão para cada gota de suspensão celular a ser tratada. Observou-se que essa quantidade só é válida quando o tampão vem concentrado 10 vezes de fábrica, o que é usual. Após o uso, a solução tampão foi colocada imediatamente de volta no freezer. Não há necessidade de se trabalhar com a mesma em gelo;
- Foi adicionada a quantidade de enzima, calculada segundo o item anterior (variável X), no exemplo 0,9 µl. A enzima só foi retirada do freezer no momento da sua utilização e foi mantida em um frasco com gelo. Caso essas observações não sejam seguidas, há sérios riscos de se destruir a estrutura molecular da enzima, tornando-a ineficaz.

B - Tratamento com as enzimas de restrição:

- A solução de enzima foi preparada de acordo com o item anterior;
- Foi pingada uma gota de solução de enzima 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 5 horas.
- Transcorrido o tempo necessário, a lamínula foi removida com um jato de água destilada e deixada secar ao ar.
- A lâmina foi então corada com solução de Giemsa (5%) em tampão fosfato pH 6,8 durante 10 minutos.
- A lâmina foi lavada novamente em água destilada e deixada secar ao ar.
- As preparações de enzima de restrição *A₁* foram analisadas e fotomicrografadas (fotomicroscópio Zeiss) e posteriormente ampliadas em papel Kodabromide F₃ (Kodak).

C - Observação:

- A concentração da enzima e o tempo de tratamento estão relacionados com a estrutura dos cromossomos da espécie e com a atividade lítica da mesma.

3.2.7. Técnica de Coloração com Cromomicina A₃

A técnica utilizada foi a descrita por SCHMID (1980) a qual marca as regiões do DNA ricas em bases CG.

Para a obtenção da solução de cromomicina A₃, foi dissolvido 0,5 mg de cromomicina em 1 ml de tampão McIlvaine e adicionado 5 mM de cloreto de magnésio – deixada a cromomicina dissolver lentamente na geladeira por alguns dias.

Tampão McIlvaine

Solução A

Ácido cítrico (C₆H₈O₇H₂O)10,5 g
 Água deionizada.....500,0 ml

Solução B

Na₂HPO₄(0,2M).....14,2 g ou
 Na₂HPO₄.7H₂O.....26,79 g ou
 Na₂HPO₄.12H₂O.....35,6 g
 Água deionizada.....500,0 ml

As etapas foram as seguintes:

1. Foram pingadas lâminas conforme descrito nas técnicas anteriores e deixadas envelhecer por um dia na estufa a 45° C.
2. Foi colocado 50 µl da solução de cromomicina A₃ com o auxílio de uma micropipeta sobre a lâmina, cobrindo-a com uma lamínula e deixando corar por 90 minutos no escuro.
3. A lamínula foi retirada com jatos de água e em seguida lavou-se a lâmina, em água corrente por aproximadamente 1 minuto.
4. Deixou-se a lâmina secar ao ar e montou-se com uma nova lamínula, utilizando como meio de montagem solução de glicerol e cloreto de magnésio.
5. Deixou-se a lâmina guardada à temperatura ambiente, no escuro, por no mínimo 15 dias antes de analisá-la (para aumentar a estabilidade do fluorocromo) em fotomicroscópio de epifluorescência, com filtro 450-490 nm (zona de excitação do azul).

3.2.8. Montagem e Análise dos Cariótipos

As preparações foram analisadas em microscópio binocular. Nas preparações coradas segundo a técnica convencional (solução Giemsa 5% em tampão fosfato pH = 6,8), as metáfases que apresentaram boa dispersão, condensação e morfologia cromossômica, foram fotografadas em microscópio Zeiss, em campo claro com objetiva de imersão; para a montagem do cariótipo dos indivíduos, foram feitas pranchas de machos e fêmeas.

Os carótipos foram montados organizando-se os cromossomos segundo o tamanho e a localização do centrômero. A determinação do comprimento dos braços (maior ou menor), foi feita com um auxílio de um paquímetro. Os valores médios de cada par foram calculados para poder determinar a relação de braços (RB).

Para o cálculo de NF os cromossomos metacêntricos (M), submetacêntricos (SM) foram considerados como bibraciais, enquanto que os acrocêntricos (A) constituídos por um único braço.

A identificação cromossômica foi feita seguindo a nomenclatura proposta por LEVAN, FREDGA e SANDBERG (1964), onde os tipos cromossômicos são:

METACÊNTRICOS (M).....	RB = 1,00 - 1,70
SUBMETACÊNTRICOS (SM).....	RB = 1,71 - 3,00
SUBTELOCÊNTRICOS (ST).....	RB = 3,01 - 7,00
ACROCÊNTRICOS (A).....	RB = maior que 7,0

4. RESULTADOS

Foram analisados 10 exemplares de *Strongylura timucu* (04 machos e 06 fêmeas), que apresentaram um número diplóide modal de 48 cromossomos (tabela 1 e figura 3), distribuídos em 10 cromossomos Metacêntricos (M), 02 Submetacêntricos (SM) e 36 cromossomos acrocêntricos (A), perfazendo um número fundamental (NF) de 60 (figura 4). Os cromossomos SM são portadores de RONS.

Não foram observadas diferenças significativas entre os cariótipos de fêmeas e machos analisados, não se constatando, portanto, nenhum tipo de heteromorfismo cromossômico relacionado ao sexo.

TABELA 1 – NÚMERO DIPLÓIDE ENCONTRADO NOS EXEMPLARES DE *Strongylura timucu*, DO LITORAL PARANAENSE.

Peixes	Sexo	Números Diplóides						Total geral
		≤45	46	47	48	49	50	
463	M			3	44	2	1	50
464	M	1	2	8	94	1		106
540	F	5	3	2	50	1	3	64
1034	M			1	19	1		21
1035	F	4	1		15			20
1036	F	1	2	2	20			25
1037	F	1	1		11			13
1038	M	2	3	2	16			23
1039	F	4	4	1	40			49
1040	F	5	1	1	42			49
Total de células		23	17	20	351	5	4	420

Nota: M = macho; F = fêmea.

FIGURA 3 – HISTOGRAMA REPRESENTATIVO DAS FREQUÊNCIAS DOS NÚMEROS DIPLÓIDES ENCONTRADOS PARA *Strongylura timucu*.

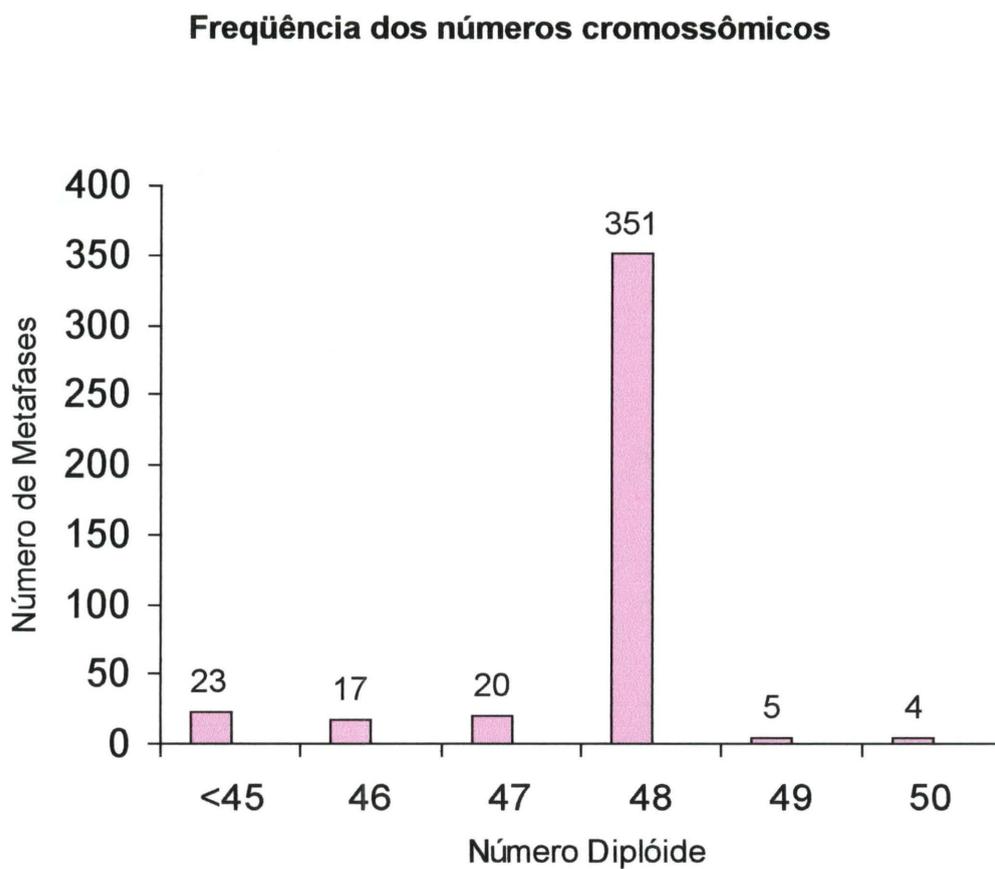
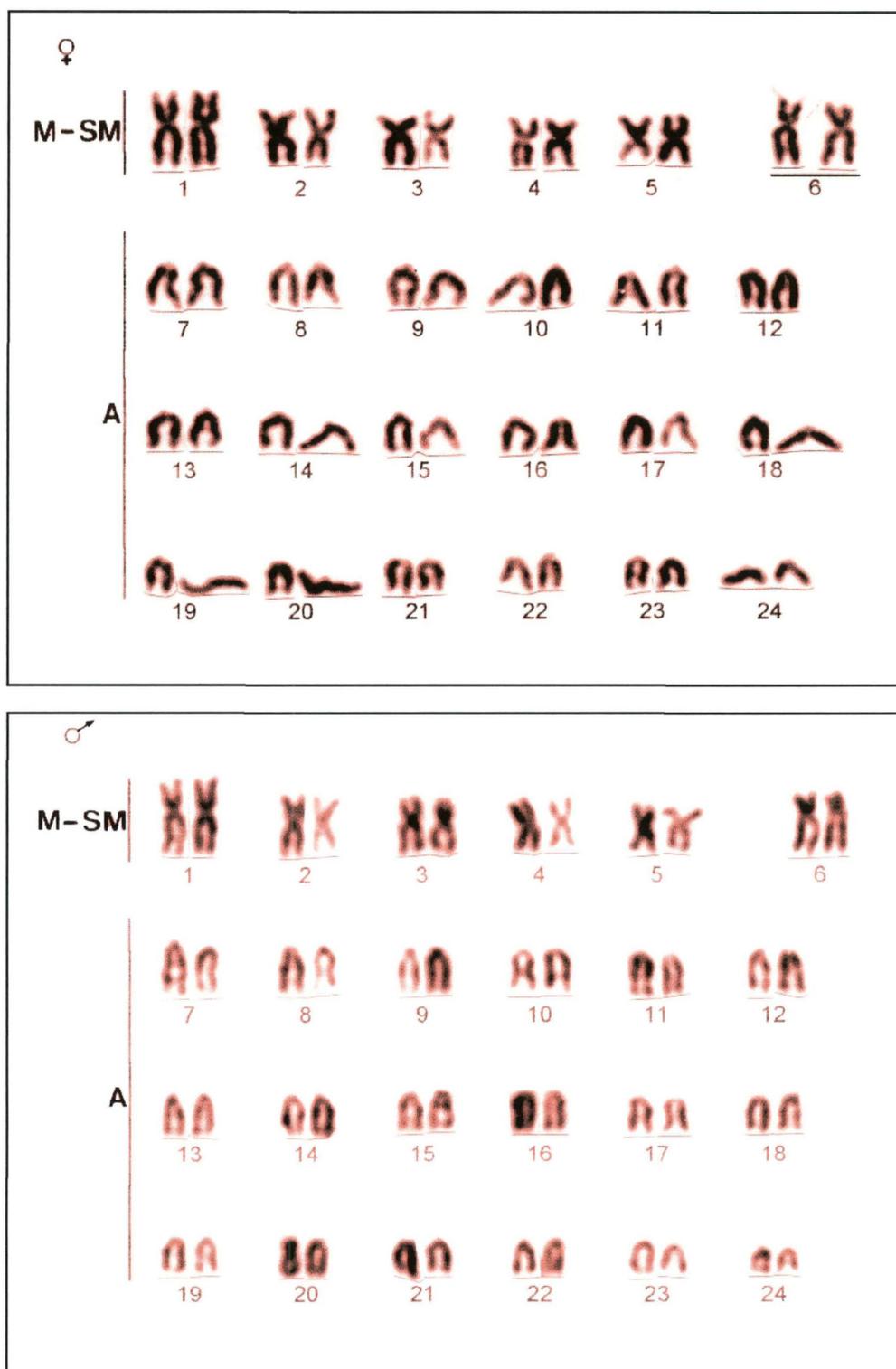


FIGURA 4 – CARIÓTIPO DE FÊMEA E MACHO DE *Strongylura timucu* COLETADOS NA BAÍA DE PARANAGUÁ. $2n = 48$ (10M + 2SM + 36A); NF = 60.



Em relação a técnica de detecção de heterocromatina foram observados blocos C+ na região pericentromérica de cromossomos acrocêntricos e metacêntricos e proximal nos cromossomos submetacêntricos (figura 5B, 5C e 5D). Na figura 5C destaca-se um par de cromossomos metacêntricos, provavelmente o 3º do complemento, onde foram observadas dois blocos banda C+ quando os cromossomos são distendidos.

Os resultados obtidos com a enzima *AluI* mostraram padrões que se assemelham a bandas C como ocorre com a maioria dos peixes (Figura 6A).

A coloração com nitrato de prata (AgNO_3) nos exemplares analisados foram observadas Regiões Organizadoras de Nucléolos (RONs) situadas na posição terminal do braço curto em cromossomos do par 6, submetacêntricos. Estas marcas variaram entre 1 e 2, sempre no mesmo par cromossômico (figura 6B). As RONs são correspondentes as constrições secundárias e apresentam um heteromorfismo de tamanho muito marcante (figura 4).

O fluorocromo Cromomicina A_3 evidenciou regiões do DNA ricas em bases GC que no caso da *Strongylura timucu* encontraram-se localizadas no par de cromossomos submetacêntricos (figura 6C) na mesma posição da Região Organizadora de Nucléolo destacando-se um heteromorfismo de tamanho (Figura 6D).

O par de cromossomos submetacêntricos, único do complemento, em constrições secundárias do seu braço curto apresenta regiões portadoras das RONs (figura 6B), mas em sentido proximal, apresenta bandas C conspícuas (figura 5D), coincidentes com as colorações obtidas através de *AluI* (figura 6A) e CMA_3 .

FIGURA 5 – METÁFASES MITÓTICAS DE *Strongylura timucu*. **A** e **B**: SEQUENCIAL (A – GIEMSA; B – BANDA C); **C**: BANDA C, AS SETAS INDICAM CROMOSSOMOS COM DUAS BANDAS HETEROCROMÁTICAS, AS FLECHAS INDICAM OS CROMOSSOMOS DA RON; **D**: CARIÓGRAMA COM BANDA C.

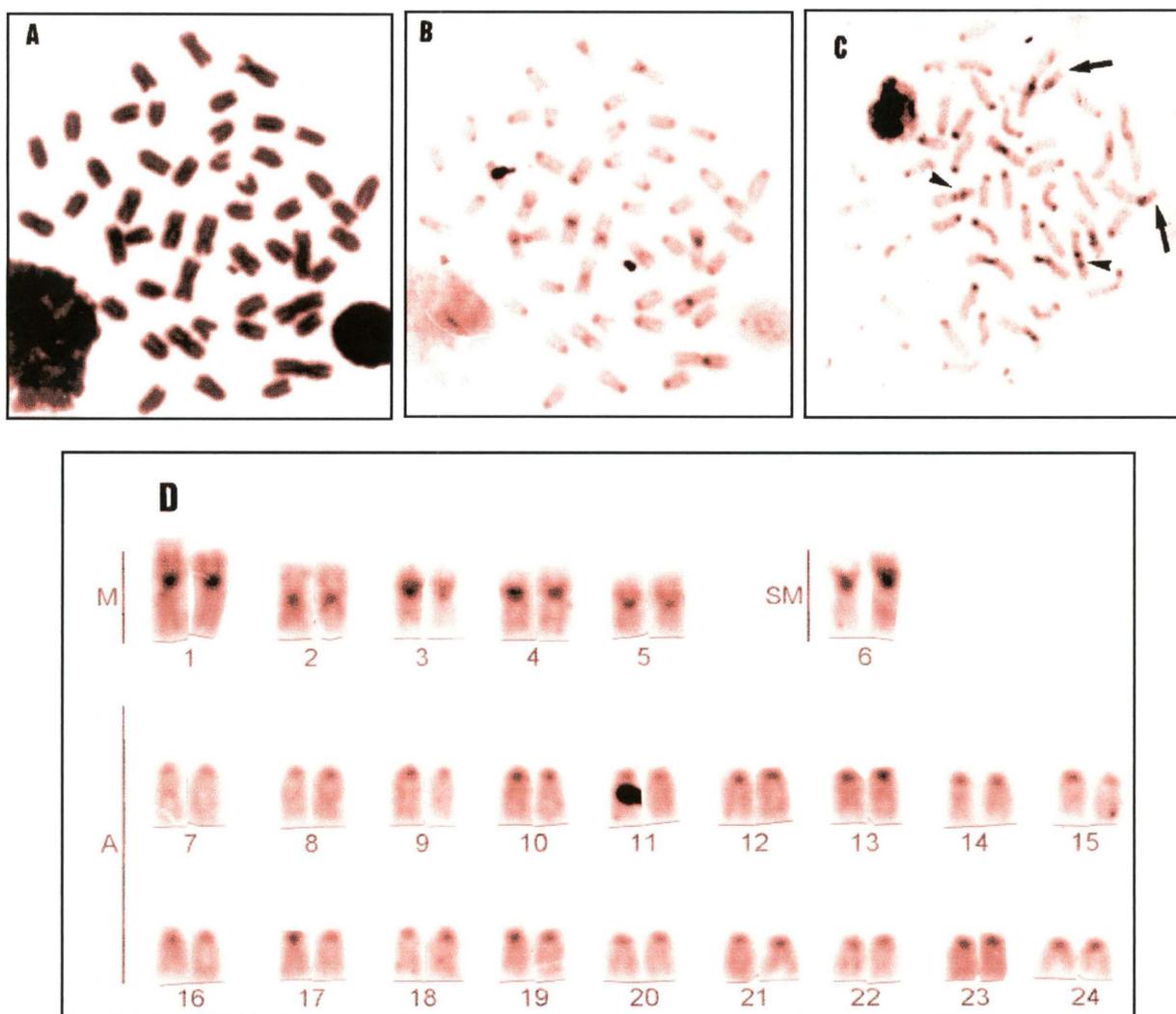
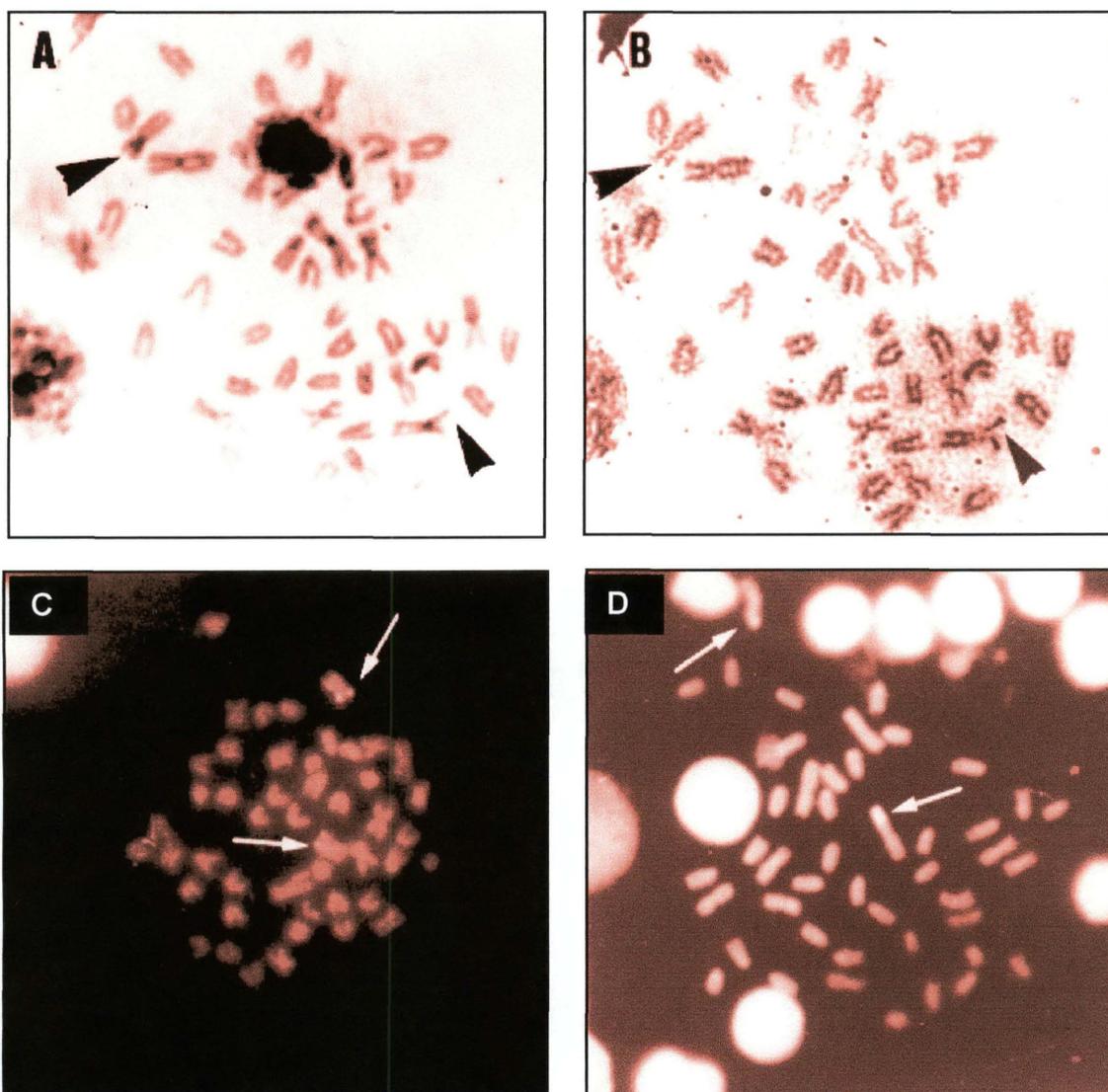


FIGURA 6 – METÁFASES MITÓTICAS DE *Strongylura timucu*. A E B: SEQUENCIAL (A – ENZIMA DE RESTRIÇÃO *Alu* I; B – RON); C E D: COLORAÇÃO COM FLUOROCROMO BASE ESPECÍFICO CROMOMICINA A₃; AS SETAS INDICAM OS PORTADORES DAS RONS.



5. DISCUSSÃO

O cariótipo apresentando 48 cromossomos acrocêntricos é considerado por alguns autores uma herança dos primeiros vertebrados (OHNO, 1970; OHNO, 1974; MURAMOTO; OHNO; ATKIN, 1968; OHNO; ATKIN, 1966; ATKIN; OHNO, 1967), porém, BRUM (1996), propõe que este cariótipo seja uma sinapomorfia dos grupos Euteleostei e Clupeiformes, conservada principalmente em suas espécies marinhas, onde o provável ancestral dos vertebrados inicialmente apresentava 60 cromossomos, sofrendo uma redução no seu número diplóide devido a rearranjos cromossômicos.

Os resultados de *Strongylura timucu* obtidos no presente trabalho, inéditos na literatura, mostram um cariótipo com $2n = 48$ cromossomos e $NF = 60$. PASTORI *et al.* (1998) em espécie do mesmo gênero *S. microps* (dulciaquícola), determinaram $2n = 50$ cromossomos acrocêntricos ($NF = 50$), entanto RISHI e SINGH (1982) também apresentaram o cariograma de outra espécie do gênero (*S. strongylura*), com complemento cromossômico com 50 cromossomos e com complexidade cariotípica maior do que observada por PASTORI *et al.* (*op. cit.*). Outros estudos, dentro da família Belonidae, evidenciaram cariótipos com 48 cromossomos em *Tylosurus leirus* e *T. strongylurus* (RISHI, 1973; SRIVASTAVA; KAURA, 1964), todos acrocêntricos. Estes dados avaliados comprovam a diversidade cariotípica característica deste grupo, que pode ser atribuída ao processo evolutivo sofrido por estes peixes, que ocupam ambientes bem diversos.

O número de 48 cromossomos de *S. timucu* é similar ao da maioria das 81 espécies de peixes marinhos já cariotipados da costa brasileira (OLIVEIRA, 2000). Segundo BRUM (1996), aproximadamente 25 espécies apresentam um complemento cromossômico com $2n = 48$. No entanto a fórmula cariotípica não é concordante, provavelmente devido à ocorrência de fusões, deleções e inversões, que seriam responsáveis pelas variações estruturais e numéricas (OLIVEIRA *et al.*, 1988).

Numa visão evolutiva, *Strongylura timucu* apresenta um número diplóide basal com 48 cromossomos. Por outro lado, o número fundamental desta espécie pode

ser considerado derivado, sendo diferente de 48, considerando a hipótese proposta por OHNO (1970), OHNO (1974), MURAMOTO; OHNO; ATKIN (1968) e outros.

Quanto à microestrutura cariotípica, na espécie estudada, as bandas C mostram um padrão bem rico, a heterocromatina foi evidenciada na região pericentromérica de cromossomos metacêntricos e acrocêntricos e proximal do par submetacêntrico. Este dado difere daqueles na literatura, uma vez que a maioria das espécies de peixes marinhos estudados, quanto a esta técnica, apresenta marcações C+ geralmente fracas e somente em regiões pericentroméricas dos cromossomos do complemento (AGUILAR; GALETTI Jr., 1997; CORRÊA *et. al.*, 1995). A associação ocorrida entre os blocos heterocromáticos e RONS em *S. timucu* é freqüentemente observada em peixes (SOLA; NATILI; CATAUDELLA, 1988; CORRÊA *et. al.*, 1995; AFONSO *et. al.*, 1999, entre outros).

Os dois blocos C+ presentes num par de cromossomos metacêntricos (figura 5C) foram visualizados devido ao grau de condensação dos cromossomos. Esta conformação indica a presença de eucromatina entre blocos heterocromáticos difícil de encontrar em peixes marinhos.

As marcações evidenciando as RONS, apresentaram-se na região terminal, distal, do braço curto de apenas um par cromossômico, coincidentes com as constrições secundárias. As marcas presentes em um único par do complemento é bem comum para peixes. Entre 231 espécies descritas em relação ao número e localização das Regiões Organizadoras de Nucléolos cerca de 146, ou seja, 71% apresentam RONS simples (OLIVEIRA; FORESTI, 1994). Segundo BRUM (1996), entre peixes marinhos esta freqüência aumenta, das doze espécies brasileiras estudadas mediante esta técnica somente *Diplectrum formosum* apresentou RONS em até quatro cromossomos (AGUILAR, 1993; AGUILAR; GALETTI Jr., 1997). A maior freqüência de RONS simples em peixes, está de acordo com a posição basal dos mesmos dentro do grupo dos vertebrados, visto que para mamíferos considera-se este caráter primitivo (HSU *et al.*, 1975 apud WASKO, 1996).

Quanto à posição, as marcações de RONS, nas espécies marinhas já estudadas, variam desde centroméricas a teloméricas (BRUM 1996), aparecendo poucos dados coincidentes.

Nesta técnica, o AgNO_3 reage com proteínas que compõem os ribossomos e não com o próprio DNA, desta forma detectando apenas as RONS que estiveram ativas na interfase anterior. A utilização de fluorocromos, como a Cromomicina A_3 , auxilia a evidenciar as RONS independentemente da sua atividade, uma vez que estes corantes são CG específicos e as Regiões Organizadoras de Nucléolos são provavelmente sítios intercalados com heterocromatina rica nestas bases (SANTOS-ABEL; MOREIRA-FILHO, 1999).

Com a utilização de CMA_3 em *Strongylura timucu* foi possível verificar que as RONS são intercaladas por heterocromatina rica em bases CG, devido as marcas se distribuírem nas constrições secundárias do par de cromossomos submetacêntricos portadores das Regiões Organizadoras de Nucléolos.

Há dificuldades na obtenção de padrões de bandas C e G em peixes. Uma alternativa é a utilização de enzimas de restrição. Dependendo a espécie animal e o tipo de enzima utilizada podem-se conseguir diferentes bandamentos, mas em peixes neotropicais continentais geralmente esse padrão é coincidente com o de banda C (SWARÇA; GIULIANO-CAETANO; DIAS, 1999; DANIEL; ALMEIDA-TOLEDO, 1995; entre outros). Em *Strongylura timucu* a enzima *AluI* evidenciou um padrão de coloração praticamente similar às bandas C e não afetou a cromatina do braço curto do cromossomo portador da RON, que apareceu bem corado pela Giemsa, indicando ausência de sítios alvo para ela ou um maior grau de compactação que impede a acessibilidade.

O presente trabalho representa a primeira descrição citogenética detalhada de um Beloniforme da costa brasileira, caracterizando uma pequena parcela do número potencial de espécies que poderão ser exploradas em estudos futuros, principalmente no litoral paranaense, onde até o momento foram analisados cariótipos de apenas quatro espécies (FRANCIOSI; CESTARI, 2000; RAMALHO; FENOCCHIO; CESTARI, 2001; CORTINHAS; CESTARI; FENOCCHIO, 2001).

6. CONCLUSÕES

- *Strongylura timucu* apresentou número diplóide de 48 cromossomos (10 M + 2 SM + 36 A) e número fundamental de 60.
- A heterocromatina mostrou-se em blocos pericentroméricos em cromossomos SM e centroméricos em quase todos os M e A, destacando-se o terceiro par de M que apresenta duas marcações, centromérica e intersticial. Enzima de restrição (Alu I) mostrou padrão de bandamento semelhante às bandas C.
- As RONS se apresentaram em braços curtos do par de submetacêntrico, coincidentes com as constrições secundárias. A Cromomicina A₃ confirmou o número de RONS (duas marcações) nesta espécie, mostrando-se em algumas ocasiões heteromórficas.
- Com os dados apresentados pode-se concluir que *S. timucu*, possui um cariótipo onde se misturam características primitivas como o número diplóide (48) e derivadas, representadas pela presença de elementos bibráquiais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFFONSO, P. R. A. M.; GUEDES, W.; PAULS, E.; GALETTI, P. M. Análise citogenética de peixes de recifes de corais da família Pomacanthidae (Perciformes). In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 45º, 1999, Gramado – RS. **Resumos...** Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1999. p.123.
- AGUILAR, C. T. **Estudos citogenéticos em Serranidae (Pisces, Perciformes)**. Masteer's thesis, Departamento de Genética, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ. 1993.
- AGUILAR, C. T.; GALETTI Jr, P. M. Chromosomal studies in South Atlantic serranids (Pisces, Perciformes). **Cytobios**, 89: 105-114. 1997.
- ATKIN, N. B.; OHNO, S. DNA values of four primitive chordates. **Chromosoma** (Berl.) 23: 10-13. 1967.
- BARLETTA, M.; CORRÊA, M. F. M. **Guia para identificação de Peixes da Costa do Brasil**. Ed. UFPR, Curitiba – PR, 131p. 1992.
- BERTOLLO, L. A. C.; TAKAHASHI, C. S.; MOREIRA-FILHO, O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Braz. J. Genet.**, 1 (2): 103-120, 1978.
- BRUGGER, A. M.; BORN, G. G.; LEVY, S. A. Estudos preliminares cariotípicos e bioquímicos do peixe-rei (Atherinidae) na costa oceânica e região esturina do Rio Grande, RS. In: III Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicais, 1990, Botucatu, SP. **Resumo...** 1990. pp38.
- BRUM, M. J. I. Correlações entre a filogenia e a citogenética de peixes teleósteos. **Res. Bras. Genet.** – Série Monografias 2: 5-42. 1995

BRUM, M. J. I. Cytogenetic studies of Brazilian marine fish. **Braz. J. Genet.** 19 (3): 421-427. 1996.

BRUM, M. J. I.; GALETTI Jr., P. M. Teleostei Ground Plan Karyotype. **J. Comp. Biol.** 2(2): 91-102. 1997.

CONTI, J. B.; FURLAN, S. A. Geoecologia: o clima, os solos e a biota in **Geografia do Brasil**, edusp – Fundação para o Desenvolvimento da Educação (FDE). 549p. 2000.

CORRÊA, M. F. M. **Ictiofauna da Baía de Paranaguá e adjacências (litoral do Estado do Paraná-Brasil): levantamento e produtividade**. Curitiba. Dissertação (Mestrado em Zoologia) – Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Paraná. 1987.

CORRÊA, M. M. O.; AGUILAR, C. T.; BRUM, M. J. I.; GALETTI, P. M. Contribuição à Citotaxonomia dos Scorpaeniformes (Pisces- Teleostei): Estudos Citogenéticos em Espécies Ocorrentes na Baía da Guanabara, RJ. In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 41º, 1995, Caxambu - MG. **Resumos...** Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1995. p.79.

CORRÊA, M. M. O.; GALETTI Jr, P. M. Chromosomal Diversity in Scorpaenidae (Teleostei, Scorpaeniformes): Cytogenetic Studies in *Scorpaena brasiliensis* and *Scorpaena isthmensis* from the Coast of Rio de Janeiro, Brazil. **Cytologia**, 62: 397-404, 1995.

CORTINHAS, M. C.; CESTARI, M. M.; FENOCCHIO, A.S. Resultados preliminares do estudo citogenético em *Atherinella brasiliensis* pertencentes ao litoral paranaense. In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 47º, 2001, Águas de Lindóia – SP. **Resumos...** Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2001. p. 200.

DANIEL, M. F. Z.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. Bandejamento por endonucleases de restrição em quatro espécies do gênero *Astyanax* (Pisces, Characidae). In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 41º, 1995, Caxambu – MG. **Resumos...**Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1995. p. 84.

DOUCETTE Jr., A. J.; FITZSIMONS, J. M. Karyology of Elopiform and Clupeiform Fishes. **Copeia**: 124-130. 1988.

FRANCIOSI, F.; CESTARI, M. M. Estudos citogenéticos em exemplares do gênero *Sphoeroides* (Tetraodontidae), pertencentes à Gamboa do Rio Baguaçu (Pontal do Paraná – PR.). In: VII Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes, Manaus – AM. **Resumo...** 2000. p.119.

FENOCCHIO, A. S.; BERTOLLO, L. A. C. A simple method for fresh-water fish lymphocyte culture. **Rev. Brasil. Genet.**, 11(4): 847-852, 1988.

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**, v.44, n.2, 161-166. 1991.

FIGUEIREDO, J. L. **Estudo das distribuições endêmicas de Peixes da Província Zoogeográfica Marinha Argentina**. Tese de Doutorado, Univ. de São Paulo. Instituto de Biociências. Brasil, 121pp. 1981.

GOMES, V. **Estudos cariotípicos de *Micropogonias furnieri* (Desmarest, 1822) e *Menticirrhus americanus* (Linnaeus, 1758) (Perciformes, Sciaenidae) da região estuarina lagunar de Cananéia, SP, Brasil**. São Paulo - SP, 1981. Dissertação - Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo.

HILDEBRAND, M. **Análise da estrutura dos vertebrados**. Atheneu. São Paulo. 700p. 1995.

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

KENISH, M. J. **Ecology of estuaries**. CRC. Press, Boston, 391pp.1990.

LEGRANDE, W. H.; FITZSIMONS, J. M. Karyology of the mullets *Mugil curema* and *Mugil cephalus* (Perciformes-Mugilidae) from Louisiana. **Copeia**, Carbondale, 1976(2): 388-91.

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

LOPES, S. G.; SPACH, H. L.; CORRÊA, M. F. M. **Ictiofauna de uma Planície de Maré adjacente à Gamboa do Baguaçu, Baía de Paranaguá**. Monografia (Bacharelado em C. Biológicas) – Setor Ciências da Terra – CEM – UFPR. 35 pp. 2000.

LOWE-McCONNELL, R. H. **Estudos Ecológicos de Comunidades de Peixes Tropicais**. Ed. USP. 534pp. 1999.

MAACK, R. **Geografia Física do Estado do Paraná**. 2. ed. Rio de Janeiro: J. Olympio; Curitiba: Secretaria da Cultura e do Esporte do Estado do Paraná, 1981.

MAEHAMA, O. K.; CORRÊA, M. F. M. Composição ictiofaunística para a zona de arrebentação de Pontal do Sul a Praia de Leste (Litoral do Paraná, Brasil). In: XIV Congresso Brasileiro de Zoologia, Juiz de Fora – MG. **Resumo**...p. 231. 1987.

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.

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.

MURAMOTO, J. I.; OHNO, S.; ATKIN, N. B. On the diploid state of the fish order Ostariophysi. **Chromosoma** (Berl.) 24: 59-66. 1968.

NELSON, J. S. **Fishes of the World**. 3rd ed., Jonh Wiley & Sons Ltda. New York. 141-142; 150-152. 1994.

OHNO, S.; ATKIN, N. B. Evolution from fish to mammals by gene duplication. **Hereditas**, 59: 169-187. 1966

OHNO, S.; WOLF, U.; ATKIN, N. B. Evolution from fish to mammals by gene duplication. **Hereditas**, 59: 169-187, 1968.

OHNO, S. **Evolution by gene duplication**. New York, Springer-Verlag, 160pp. 1970.

OHNO, S. **Protochordata, Cyclostomata and Pisces**. In John, B. (ed.). **Animal Cytogenetics** 4(1): 1-92. 1974.

OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; FORESTI, F.; BRITSKI, H. A.; TOLEDO-FILHO, S. A. Chromosome formulae of neotropical freshwater fishes. **Braz. J. Genet.**, 11: 577-624, 1988.

OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Revisão dos Estudos Citogenéticos em Peixes Neotropicais de Águas Continentais. In: SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA EVOLUTIVA E APLICADA DE PEIXES NEOTROPICAIS, V, 1994, Botucatu - SP. **Resumos...** Botucatu: Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita", 1994. p.6.

OLIVEIRA, C. Síntese dos Estudos Citogenéticos em Peixes Neotropicais. In: VIII Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes, 108, 2000, Manaus, AM. **Resumo.** 2000. 119p.

OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; FORESTI, F. Revisão dos estudos citogenéticos em peixes neotropicais de águas continentais. In: VIII Simpósio de Citogenética e Genética de peixes, 24, 2000, Manaus – AM. **Resumo...** 2000. 119p.

PASTORI, M. C.; CANO, J.; BERTOLLO, C.; FENOCCHIO, A. S. Cytogenetic study of two species needlefish (Belonidae) from Argentina. **Ital. J. Zool.**, 65, Suppl: 57-60. 1998.

PATTERSON, C. The caudal skeleton in Lower pholidophorid fishes. **Bull. Br. Mus. Nat. Hist. Geol.** 16: 201-239. 1968.

PAULS, E.; COUTINHO, I. A. Levantamento citogenético em peixes de maior valor econômico do litoral Fluminense (23º. Lat./S). In: XVII Congresso Brasileiro de Zoologia, 17, 1990, Londrina, PR. **Resumo...** 1990. p.325.

PEREIRA, S. D.; CHAVES, H. A.; RODRIGUES, R. Evidências da Variação Relativa do Nível do Mar Através dos Isótopos Estáveis de Carbono da Matéria Orgânica – Manguezal de Guaratiba – Baía de Sepetiba (RJ). In: XII Semana Nacional de Oceanografia, Rio de Janeiro, RJ. **Resumo...** 1999. p. 402 – 404.

PINHEIRO, P. C. **Dinâmica das comunidades de peixes em três áreas amostrais da Ilha do Mel, Baía de Paranaguá, Paraná, Brasil.** Curitiba. Dissertação (Mestrado em Zoologia) – Depto. de Zoologia, Universidade Federal do Paraná. 105p. 1999.

RAMALHO, T. R.; FENOCCHIO, A. S.; CESTARI, M. M. Estudos citogenéticos preliminares em *Poecilia vivipara* (Cyprinodontiformes) pertencentes à região de Pontal do Sul – PR. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE ICTIOLOGIA, XIV, 2001, São Leopoldo - RS. **Resumos...** São Leopoldo: UNISINOS, 2001.

RISH, K. K. A preliminary report on the karyotypes of eighteen marine fishes. **Res. Bull. (N. S.) of the panjab univ.**, vol. 24, Parts III-IV: 164-162, 1973.

RISHI, K. K.; SINGH, J. Karyological studies on five estuarine fishes. **Nucleus**, 25: 178-180. 1982.

SANTOS-ABEL, L. D.; MOREIRA-FILHO, O. Estudos citogenéticos comparativos em populações alopátricas de *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) da Baía do Rio São Francisco. In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 45º, 1999, Gramado - RS. **Resumos...** Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1999. p.2.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y. **Manguezais Brasileiros.** Tese de Livre-docência. Universidade de São Paulo, Instituto Oceanográfico. 42p. 1991.

SCHMID, M. Chromosome banding in Amphibia. IV. Differentiation of GC and AT rich chromosoma regions in Anura. **Chromosoma**, 77: 83-103, 1980.

SOLA, L.; NATILI, G. L.; CATAUDELLA, S. Cytogenetical characterization of *Odontesthes bonariensis* (Pisces, Atherinidae) an Argentinae species introduced in Italy. **Genetica**, 77: 217-224, 1988.

SRIVASTAVA, M. D. L.; KAURA, P. The structure and behaviour of chromosomes in six freshwater teleosts. **Cellule**, 65: 93-107. 1964.

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

SWARÇA, A. C.; GIULANO-CAETANO, L.; DIAS A. L. Cytogenetic characterization through chromosomic banding of *Pinirampus pinirampu* (Pisces, Pimelodidae) from the Tibagi river basin PR/Brasil. **Caryologia** 52: 31-35. 1999

VAZZOLER, A. E. A. M.; SOARES, L. S. H.; CUNNINGHAM, P. T. M. **Ictiofauna da Costa Brasileira** in Estudos Ecológicos de Comunidades de Peixes Tropicais. Ed. USP. 534pp. 1999.

VENDEL, A. L.; LOPES, S. G.; SPACH, H. L. Assembléia de peixes em uma Gamboa e uma Planície de Maré: comparação e estrutura. In: XII Semana Nacional de Oceanografia, Rio de Janeiro – RJ. **Resumo...**197-199. 1999.

VENERE, P. C. **Citogenética Comparativa de Peixes da Família Curimatidae (Characiformes)**. São Carlos-SP, 1991. 134 f. Dissertação de Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais – Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos.

WASKO, A. P. **Estudos citogenéticos no gênero Bryconamericus (Pisces, Characidae). Uma abordagem citotaxonômica – Evolutiva.** São Carlos – SP, 1996. 165 f. Dissertação de Mestrado – P. P. G. em Genética e Evolução do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos.

WICKBOM, T. Cytological Studies on the Family Cyprinodontidae. **Hereditas**, 29: 1-24. 1943.