

ANA PAULA DE AMORIM

**INFERÊNCIAS SOBRE A CONSERVAÇÃO DA BACIA  
HIDROGRÁFICA DO ATLÂNTICO (PARANÁ) E A  
BIOGEOGRAFIA DA ESPÉCIE *Characidium lanei*, A  
PARTIR DE ESTUDOS CITOGENÉTICOS**

Curitiba  
2007

ANA PAULA DE AMORIM

**INFERÊNCIAS SOBRE A CONSERVAÇÃO DA BACIA  
HIDROGRÁFICA DO ATLÂNTICO (PARANÁ) E A  
BIOGEOGRAFIA DA ESPÉCIE *Characidium lanei*, A  
PARTIR DE ESTUDOS CITOGENÉTICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ecologia e Conservação do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ecologia e Conservação.

**Orientadora:**  
**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marta Margarete Cestari**

Curitiba  
2007



Ministério da Educação e Desporto  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**  
**SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação

## PARECER

Os abaixo-assinados, membros da banca examinadora da defesa da dissertação de mestrado, a que se submeteu **Ana Paula Amorim** para fins de adquirir o título de Mestre em Ecologia e Conservação, são de parecer favorável à **APROVAÇÃO** do trabalho de conclusão da candidata.

Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação.

Curitiba, 25 de abril de 2007

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dra. Marta Margarete Cestari  
(Orientadora)

Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni  
Membro

Prof. Dr. José Marcelo Rocha Aranha  
Membro

VISTO:

Prof. Dra. Rosana Moreira da Rocha  
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação

*“No final, nossa sociedade será definida, não pelo que criamos,  
mas pelo que nos recusamos a destruir”.*

John C. Sawhill

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Professora Dr<sup>a</sup> Marta Margarete Cestari, pelo apoio e paciência a mim prestados, mais uma vez!

Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação (PPGECO) da UFPR, professores e colegas de turma, em especial agradeço à Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Rosana Moreira da Rocha e à Marli, pelo apoio.

Aos Professores Roberto Artoni e José Marcelo Rocha Aranha, pelo apoio, sugestões e participação em minha banca examinadora.

Ao mais do que colega de trabalho, meu amigo doutorando Rafael B. Noletto, pelo essencial apoio, trabalho e dedicação. Muito obrigada por TUDO!

Aos amigos do Laboratório de Citogenética Animal, pelo apoio, paciência, trabalho, ajuda, risadas... é com vocês que divido todos os méritos deste trabalho: Rafa, Wane, Thais, Taynah, Felipe, Cris, Marcos, Cabelo, Roger, Nédia. Aos “coletores”: Rafa, Felipe, Jean e Japa, obrigada pelos bichinhos!

Aos meus colegas de trabalho e amigos do DAQBI da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, pelo incentivo, pelas conversas e pelos muitos ensinamentos.

A todos os meus amigos, em especial: Grazi, Marquito, Suzaninha, Igor, Fran, Carlinha, Cy, Li, Mari, Fernando.

Aos meus amigos e colegas de trabalho da ONG Em Ação: Marcelo, Willian, Fábio, Manu, Paleari e Mineiro.

Aos meus alunos, que me estimulam a aprender cada vez mais!

Ao Roberto Rocha, pela presença indispensável na minha vida!

À minha Maravilhosa Família: Flávia e Mariana, Robinho, Vó, Maurício e Rick, Eva e Márcio, Renatinha e Léo, aos meus sobrinhos encantados: Amanda, Bernardo e Laura, obrigada pelo amor de todos vocês!

Aos meus Pais, Robles e Ecléia Amorim, os meus exemplos, os meus tutores... muito obrigada pelo apoio, dedicação, incentivo e amor, durante todos os dias da minha vida.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	v
<b>RESUMO</b> .....	vii
<b>ABSTRACT</b> .....	viii
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>Aspectos gerais</b> .....	1
<b>Citogenética e suas Aplicações</b> .....	4
<b>Citogenética de peixes neotropicais com ênfase em Characiformes</b> ....	5
<b>OBJETIVOS</b> .....	8
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	10
<b>Área de Estudo</b> .....	10
<b>Material</b> .....	14
<b>Métodos</b> .....	15
Procedimentos Metodológicos para Coleta e Transporte.....	15
Obtenção das Metáfases Mitóticas.....	15
Método Indireto.....	15
Método Direto.....	16
Coloração convencional - GIEMSA.....	18
Coloração com Nitrato de Prata - AgRONS.....	18
Detecção da Heterocromatina Constitutiva.....	19
Montagem e Análise dos Cariótipos.....	19
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	21
<b>Estrutura Cariotípica</b> .....	21
<b>Sítios de rDNA</b> .....	27
<b>Heterocromatina e diferenciação do cromossomo sexual W</b> .....	28
<b>Conservação</b> .....	32
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	35

## LISTA DE FIGURAS

### Material e Métodos

- Figura 1** – Mapa Hidrográfico do Paraná, evidenciando a Bacia do Atlântico, com as seis sub-bacias..... 10
- Figura 2** – Mapa da Bacia Hidrográfica do Atlântico composta pelas seis sub-bacias representadas pelas letras: **R** – Sub-Bacia do Rio Ribeira; **L** – Sub-Bacia da Baía das Laranjeiras; **A** – Sub-Bacia da Baía de Antonina; **G** – Sub-Bacia da Baía de Guaratuba. As sub-bacias em destaque referem-se à Sub-Bacia do Rio Nhundiaquara, representada pela letra **N** e à Sub-Bacia da Baía de Paranaguá, representada pela letra **P**, nestas localizam-se os locais de coleta do presente estudo..... 11
- Figura 3** – Foto ilustrativa do Rio Ribeirão (Paranaguá, PR)..... 12
- Figura 4** – Foto ilustrativa do Rio Barroca (São João da Graciosa, PR)..... 13
- Figura 5** – Foto ilustrativa da espécie *Characidium lanei*..... 14

### Resultados e Discussão

- Figura 6** – Cariótipo de macho de *Characidium lanei* do rio Ribeirão com coloração convencional por Giemsa. Em destaque estão os cromossomos sexuais ZZ..... 22
- Figura 7** – Cariótipo de fêmea de *Characidium lanei* do rio Ribeirão com coloração convencional por Giemsa. Em destaque estão os cromossomos sexuais ZW..... 22
- Figura 8** – Cariótipo de *Characidium lanei* do rio Barroca com coloração convencional por Giemsa (a) e bandamento C seqüencial (b). No box está o par sexual portador das RONS..... 23
- Figura 9** – Metáfases somáticas de fêmea de *C. lanei* do rio Ribeirão: (a) as setas indicam os cromossomos portadores das Ag-RONS; (b) bandas C..... 28

**Figura 10** - Derivação hipotética do cromossomo W, a flecha indica a amplificação da heterocromatina..... **31**

## RESUMO

O presente estudo apresentou a caracterização cariotípica de populações de *Characidium lanei* do Rio Ribeirão (Paranaguá, PR) e do Rio Barroca (São João da Graciosa, PR), pertencentes ao Complexo Hidrográfico do Atlântico, no litoral paranaense. Foi realizada uma comparação citogenética entre estas duas populações e os resultados apresentados, demonstram que ambas mostram cariótipos com  $2n = 50$ , situação conservada no gênero *Characidium*, porém há diferenciação na estrutura cariotípica destas duas populações. Outra característica semelhante às duas populações estudadas é a presença de um sistema cromossômico de determinação sexual do tipo ZZ/ZW. Foi também discutido sobre a heterocromatina, sobre as RONS e a diferenciação do cromossomo sexual W. As populações apresentaram resultados distintos quanto à posição das regiões heterocromáticas. Na população do Rio Barroca, foi verificado um heteromorfismo de tamanho com relação aos blocos teloméricos de um par de homólogos. As diferenças citogenéticas são relevantes, podendo ser consideradas duas espécies distintas e não duas populações pertencentes à mesma espécie *Characidium lanei*. Este dado é discutido às vistas da Conservação não só a nível específico, como a do ambiente em questão, extremamente ameaçado.

## ABSTRACT

The present study shows the cariotipic characterization of two distinct populations of *Characidium lanei*. One from Ribeirão River (Paranaguá, PR) and another, from Barroca River (São João da Graciosa, PR), both of them pertaining to the Hydrographic Complex of Atlantic, in the Atlantic Forest, in Parana. A cytogenetic comparison was performed between these two populations and the presented results demonstrate that both revealed cariotypes with  $2n=50$ , which is conserved in the genus *Characidium*. However, there is a differentiation in the cariotipic structure of them. Another similar characteristic to these two populations is the presence of a chromosome system of sexual determination, recognize as ZZ/ZW type. The study analyzed the heterochromatin, the Nucleolar Organizer Regions (NORs) and the differentiation of sexual chromosome W. There are different results in the position of heterochromatin regions. In the Barroca River's population, there is a heteromorphism of size related to the telomeric blocks of one pair of homologous. The cytogenetic differences are relevant, therefore these two groups could be considered as distinct species and not two populations pertaining to the same *Characidium lanei* species. This data are argued to the Conservation subject, not only specific level, as the environment conservation, which is extremely threatened.

## INTRODUÇÃO

### Aspectos gerais

O ritmo atual de destruição, alteração e fragmentação de ambientes naturais devido ao crescente impacto das atividades humanas tem levado a uma alarmante perda da biodiversidade presente em nosso planeta (WILSON, 1997; ERLICH, 1997; AVISE, 1996). O Brasil possui uma das maiores extensões territoriais e a maior biodiversidade e rede hídrica do Planeta. Esta grande diversidade é expressa em espécies biológicas e em biomas, paisagens e ecorregiões (ARRUDA, 1997). Um destes biomas é a Floresta Atlântica, um dos ecossistemas mais ameaçados do mundo, que se estende ao longo da costa, onde a maior parte da população brasileira e as atividades econômicas estão localizadas (VIANA *et al.*, 1992).

Em virtude da sua riqueza biológica e níveis de ameaça, a Mata Atlântica ao lado de outras 33 regiões localizadas em diferentes partes do planeta, foi apontada como um dos *hotspots* mundiais, ou seja, uma das prioridades para a conservação de biodiversidade em todo o mundo (MYERS *et al.*, 2000). Apresenta grandes variações de relevo, nos regimes pluviométricos e nos mosaicos de unidades fitogeográficas, as quais contribuem para a grande biodiversidade encontrada nesse *hotspot* (PINTO *et al.*, 2006).

Segundo o INPE (2001) e a Fundação SOS Mata Atlântica (2006), a Floresta Atlântica brasileira, hoje reduzida a menos de 8% de sua extensão original perfazia cerca de 1.350.000 km<sup>2</sup> do território nacional e estende-se desde o Ceará até o Rio Grande do Sul. Essa região é de grande importância para o País, pois abriga mais de 60% da população brasileira e é responsável por quase 70% do PIB nacional. Por este motivo, a devastação deste bioma é um reflexo da ocupação territorial e da exploração desordenada dos recursos naturais.

A partir de 1970, o processo de adensamento populacional no litoral brasileiro intensificou-se com velocidade preocupante, considerando a fragilidade dos ecossistemas costeiros diante das conseqüências impostas pela

urbanização. Tais ecossistemas são ricos economicamente, devido aos seus componentes ambientais, mas altamente complexos em relação ao funcionamento, como exemplo das restingas, manguezais, estuários e baías. As pressões impostas durante o processo de ocupação da costa brasileira têm provocado inúmeros problemas ambientais.

O litoral paranaense estende-se desde a vila do Ararapira ao norte (25°12'44" S - 48°01'15" W Gr) até a barra do Saí-Guaçu, ao sul (25°58'38" S - 48°35'26" W Gr) e não fugiu à regra brasileira, pois sua ocupação não obedeceu a uma preocupação conservacionista já que a legislação ambiental foi implantada posteriormente ao processo de urbanização. No litoral norte ocorre um dos poucos remanescentes contínuos em área de Floresta Atlântica.

Segundo MAACK (2002), a bacia hidrográfica Litorânea ou Atlântica localiza-se a leste do Estado, com rios percorrendo a área serrana e desembocando na planície costeira. Tal complexo hidrográfico, com 14.674 km<sup>2</sup>, deságua diretamente no Oceano Atlântico através do vale do rio Ribeira, e dele fazem parte todos os rios que, oriundos da serra do Mar, considerado divisor de águas para a zona litorânea. Os sistemas fluviais da Bacia Atlântica são geologicamente recentes. Sua evolução ocorreu somente a partir do término do Neo-Cretáceo e princípio do terciário. Devido à proximidade do oceano, o rio Ribeira e seus afluentes entalharam profundamente a região montanhosa da parte norte do primeiro planalto, em consequência de sua força de erosão.

O continente sul-americano isolou-se de outras áreas continentais há cerca de 70 milhões de anos. A grande diversidade de ambientes ecológicos existentes permitiu uma grande irradiação evolutiva, possuindo hoje esta região uma fauna de peixes muito rica. SCHAEFER (1998) analisando tendências históricas estima que uma proporção considerável desta fauna seja desconhecida, estimando que existam cerca de 8.000 espécies de peixes de água doce neotropicais. As grandes áreas de endemismo de peixes identificadas são bastante influenciadas pela distribuição resultante do avanço decorrente da elevação de 100m do nível do mar que ocorreu durante o fim do Mioceno (HUBERT & RENNO, 2006). RIBEIRO (2006) descreve que as drenagens

costeiras do leste do Brasil correspondem a áreas de grande endemismo em sua fauna de peixes.

Os ecossistemas aquáticos da Mata Atlântica Brasileira possuem uma fauna de peixes rica e variada, intimamente associada à floresta que proporciona proteção e alimento (MENEZES *et al.*, 1990; MENEZES, 1994). Segundo BUCKUP (1991), o alto grau de endemismo encontrado neste ambiente pode ser explicado à concentração do grande número de bacias hidrográficas independentes, aliada ao efeito isolador que as cadeias de montanhas que separam os diversos vales da região exercem sobre as várias populações de peixes. As características topográficas e fisionômicas proporcionam uma ampla gama de ambientes distintos, o que favorece a ocorrência de um grande número de espécies, cada uma das quais adaptadas a um subconjunto particular destes ambientes, o que eleva o número de espécies endêmicas na área. A predominância de cursos d'água relativamente pequenos favorece a ocorrência de espécies de pequeno porte, com limitado potencial de dispersão espacial e tendências de fixação de divergências genéticas interpopulacionais (RIBEIRO, 2006).

Observa-se frequentemente entre as espécies de peixes uma subdivisão em populações locais isoladas. Este fenômeno é mais acentuado em peixes de água doce que habitam rios ou lagos com barreiras físicas, enquanto que populações de peixes marinhos são menos delimitados (CARVALHO, 1993). Portanto, fatores históricos, tais como as colonizações e o surgimento de barreiras físicas ou geográficas podem influenciar a distribuição dos peixes (CARVALHO *et al.*, 1991), bem como fatores incluindo movimento das águas, salinidade, pH, temperatura, disponibilidade do alimento, predadores e doenças. LOWE MCCONNELL (1999) ressalta que peixes de água doce fluviais possuem um amplo espectro alimentar, sendo capazes de mudar a sua dieta quando há alterações na disponibilidade de alimentos, por exemplo.

## Citogenética e suas Aplicações

Os peixes representam o grupo mais diversificado entre os vertebrados, e por ocupar uma posição basal na filogenia deste grupo, é de extremo interesse para estudos de variabilidade genética e evolução (NELSON, 1994). A fauna neotropical de peixes de água doce é a mais diversificada do mundo, com mais de 4.000 espécies descritas (REIS *et al.*, 2003). Embora informações detalhadas referentes à citogenética de espécies de peixes estejam cada vez mais disponíveis devido ao incremento das atividades de pesquisa neste campo, o conhecimento de cariótipos de peixes é ainda bastante reduzido e muito inferior ao de mamíferos e de outros grupos de seres vivos. Há pelo menos duas razões para isto: 1 - os cromossomos da maioria dos peixes são bem menores em relação aos vários outros grupos animais; 2 - as técnicas de bandamento que não são tão resolutivas no estudo de cromossomos de peixes como se mostram nos de mamíferos, (BRUM, 1995). No início dos anos 70, a citogenética de peixes teve que adequar técnicas utilizadas em outros grupos de vertebrados, principalmente mamíferos, que devido ao natural interesse pela espécie humana, estava evidentemente bem adiantada. Os primeiros trabalhos desenvolvidos em citogenética de peixes restringiram-se apenas à determinação do número cromossômico de cada espécie. Conforme as técnicas foram sendo aprimoradas e adequadas aos estudos em peixes, vários trabalhos puderam ser desenvolvidos e vários grupos de peixes vêm sendo estudados desde então (MIYAZAWA, 1991).

A citogenética pode representar um eficiente complemento nas investigações de taxonomia e sistemática (BERTOLLO *et al.*, 1986). Dados citogenéticos têm sido utilizados tanto por sistematas na formulação de hipóteses mais rigorosas relativas a filogenias de grupos sob investigação, quanto por geneticistas para o entendimento e construção de cenários de evolução cromossômica. Novas evidências sugerem que alterações no cariótipo podem ter um papel primário na especiação ao contrário do que se pensava antes, onde apenas a poliploidia e o isolamento geográfico acarretariam a formação de novas espécies (SOLA *et al.*, 1981).

## Citogenética de peixes neotropicais com ênfase em Characiformes

A fauna de peixes de água doce do Brasil é a mais rica do mundo, com cerca de 2.587 espécies, existindo ainda muitas espécies desconhecidas (BUCKUP *et al.*, 2007). E o grupo de teleósteos de água doce mais importante, em termos de diversidade de espécies são os Ostariophysi. Estes peixes representam cerca de 90% de toda a ictiofauna neotropical. Um complemento diplóide com 50 cromossomos tende a prevalecer entre seus representantes, principalmente entre os Otophysi. Um outro grupo importante de Ostariophysi, os Characiformes, é um dos três maiores grupos de peixes de água doce do mundo, com mais de 1343 espécies (NELSON, 1994). Possui um número modal de cromossomos igual a  $2n = 54$ , e várias de suas famílias podem ser caracterizadas com base em seus números cromossômicos, tais como Anostomidae, Parodontidae e Prochilodontidae, nas quais as espécies apresentam uma nítida estabilidade da macroestrutura do cariótipo, sugerindo que o cariótipo representa uma sinapomorfia para estes grupos, que podem assim, serem considerados como grupos-irmão.

Entre os Characiformes neotropicais, poucos grupos continuam desconhecidos quanto à citogenética (MAISTRO *et al.*, 1998). Entre eles está a subfamília Characidiinae, que juntamente com Crenuchinae pertence à família Crenuchidae, ambas sendo monofiléticas e compreendendo um total de 67 gêneros (MALABARBA *et al.*, 1998). *Characidium* é o gênero mais diversificado e bastante distribuído, incluindo 74 taxa, dos quais 49 são considerados espécies válidas. A maioria das espécies são habitantes de pequenos córregos que fluem rapidamente, onde pairam em torno dos seixos, da rocha e da vegetação (FISHBASE, 2007). Compreende peixes de tamanho pequeno com o corpo alongado, a boca pequena e a nadadeira anal curta, amplamente distribuídos em regiões neotropicais (BUCKUP, 1991). Diversos são os trabalhos que têm abordado aspectos biológicos do grupo, como os relacionados com a alimentação e uso do habitat de espécies simpátricas (ARANHA *et al.*, 1998; ARANHA *et al.*, 2000), estrutura populacional e táticas reprodutivas

(FEHLAUER, 2002), descrição da nova espécie *Characidium vestigipinne* da Bacia do Rio Uruguai (BUCKUP & HANH, 2000), entre outros.

Os primeiros estudos citogenéticos com o gênero foram realizados por MIYAZAWA (1991), com abordagens citotaxonômicas e evolutivas. Mais tarde uma mais completa descrição cariotípica foi realizada para as espécies *C. fasciatum*, *C. zebra*, *C. lagosantensis* e *C. pterostictum* (MIYAZAWA & GALETTI, 1994). Desde então a maioria dos dados disponíveis mostram que a diversificação de *Characidium* é acentuada principalmente no que se refere à presença de cromossomos sexuais heteromórficos. Embora a maior parte das populações e/ou espécies dos *Characidium* analisadas até o momento não possuam sistema de cromossomos sexuais heteromórficos, ocorrem espécies que detêm um sistema do tipo ZZ/ZW bem diferenciado (MAISTRO *et al.*, 1998; CENTOFANTE *et al.*, 2001, CENTOFANTE *et al.*, 2003).

Os peixes são caracterizados por uma variabilidade notável de sistemas da determinação de sexo. Enquanto os mamíferos são caracterizados pelo sistema XY e os pássaros pelo ZW, oito tipos de sistemas cromossômicos sexuais têm sido descritos para peixes (TAVE, 1993; MOREIRA-FILHO *et al.*, 1993), apesar do número relativamente baixo de ocorrências. Existem os sistemas envolvendo cromossomos homólogos morfologicamente diferenciados ou não, os ditos simples com heterogametia masculina (XX/XY) e feminina (ZZ/ZW) e os múltiplos  $X_1X_2Y$ ,  $XY_1Y_2$  e  $ZW_1W_2$ . Na maioria dos casos, a diferença entre os homólogos é devido à adição/deleção de heterocromatina ao X, ao Y, ao Z ou ao cromossomo W. A diferenciação morfológica destes cromossomos é muito bem estudada nos sistemas ZZ/ZW, nos quais o cromossomo W tem uma região heterocromática não presente no cromossomo Z (HAAF & SCHMID, 1984; FELDBERG *et al.*, 1987; BERTOLLO & CAVALLARO, 1992; MOREIRA-FILHO *et al.*, 1993). Os cromossomos sexuais diferenciados apresentam uma distribuição muito peculiar entre as espécies de peixes. O mesmo sistema pode ser encontrado em todas as espécies de um grupo, como é o exemplo do sistema de ZZ/ZW encontrado em todo o gênero *Triportheus* (BERTOLLO & CAVALLARO, 1992; ARTONI & BERTOLLO, 2002);

ou pode estar presente apenas em parte de um grupo maior, como constatado nas espécies do gênero *Leporinus* (GALETTI & FORESTI, 1986).

## OBJETIVOS

O presente trabalho visa o estudo de duas populações da espécie *Characidium lanei* do Complexo Hidrográfico do Litoral Paranaense, no sul do Brasil. A diversificação cariotípica e a evolução dos caracteres cromossômicos foram discutidos relativos à sua distribuição geográfica e à evidência filogenética disponível, além de vistas à Conservação do Bioma.

Portanto, as seguintes hipóteses e questões foram levantadas:

- Com o soerguimento da Serra do Mar em época bem remota, as populações das diversas espécies de peixes que habitavam esta região poderiam ter sido redistribuídas ou fragmentadas em populações menores. Assim, este isolamento geográfico teria originado uma situação de alopatria para a fauna ictiológica destes rios.

Diante deste cenário as seguintes questões são levantadas:

- Ocorreriam ainda formas idênticas entre as sub-bacias hoje isoladas?
- Se assim for, apresentariam elas, algum nível de diversificação em relação a algum aspecto detectável em nível cromossômico?
- Diferenciação evolutiva no sistema cromossômico sexual ZW pode estar associada às barreiras biogeográficas?

Assim, foram objetivos deste trabalho:

- a) Caracterizar cariotipicamente diferentes populações de *Characidium lanei*, espécies residentes dos rios Ribeirão e Barroca;
- b) Identificar marcadores cromossômicos informativos para análises comparativas entre as populações em estudo;

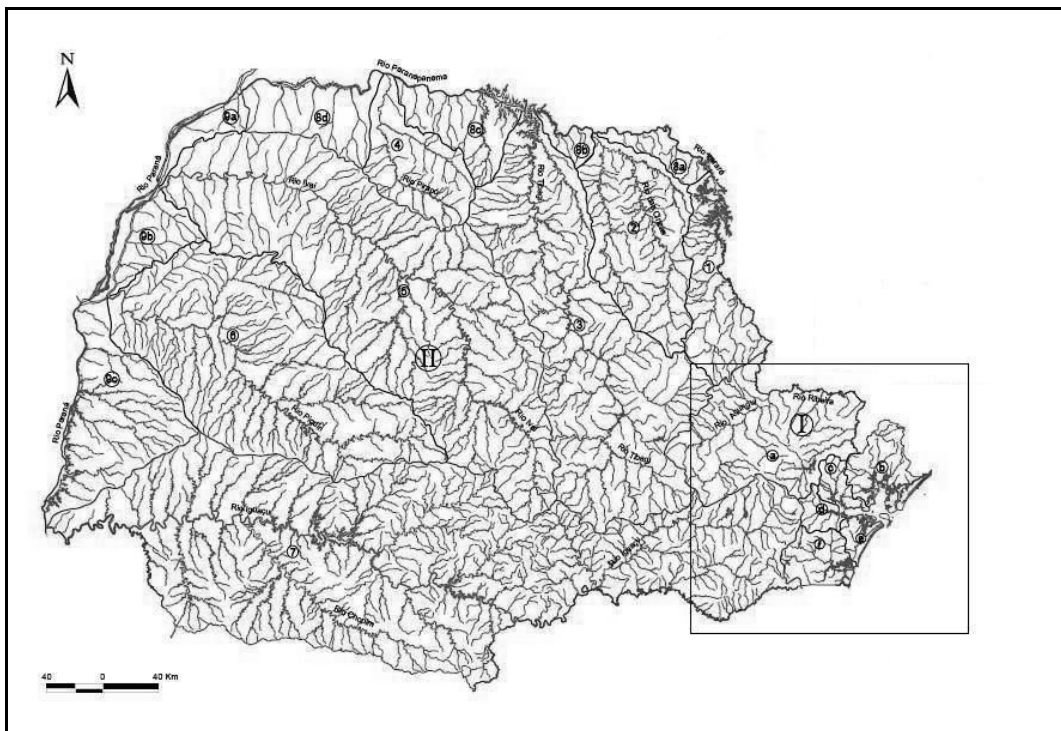
Para obter tais respostas ou esclarecimentos foram utilizadas as seguintes estratégias:

- Caracterização da macroestrutura cromossômica de duas populações da espécie *Characidium lanei* com a utilização de coloração convencional (Giemsa);
- Caracterização das Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONs), através de impregnação por nitrato de prata e localização de regiões heterocromáticas pelo bandamento C.

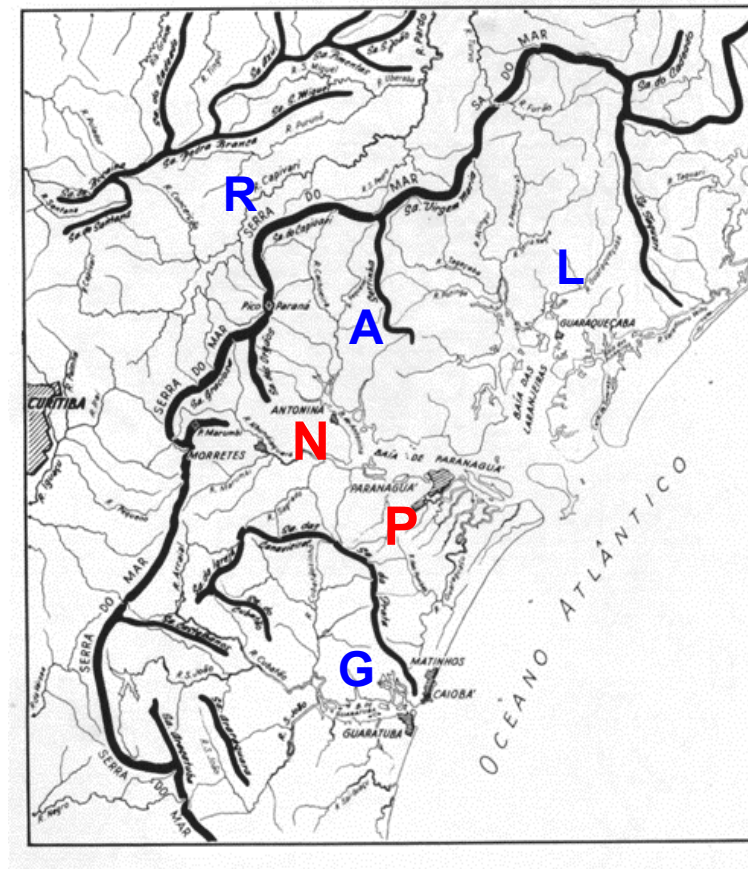
## MATERIAL E MÉTODOS

### Área de Estudo

O Estado do Paraná possui dois grandes Complexos Hidrográficos: a Bacia Hidrográfica do Rio Paraná e a Bacia Hidrográfica do Atlântico (Figura 1). Esta última, também conhecida como Bacia Litorânea, situa-se na região leste e é formada por seis sub-bacias. Para o presente trabalho foram utilizados dois rios pertencentes a duas micro-bacias diferentes: o Rio Ribeirão, pertencente à Sub-bacia da Baía de Paranaguá e o Rio Barroca, pertencente à sub-bacia do rio Nhundiaquara (Figura 2).

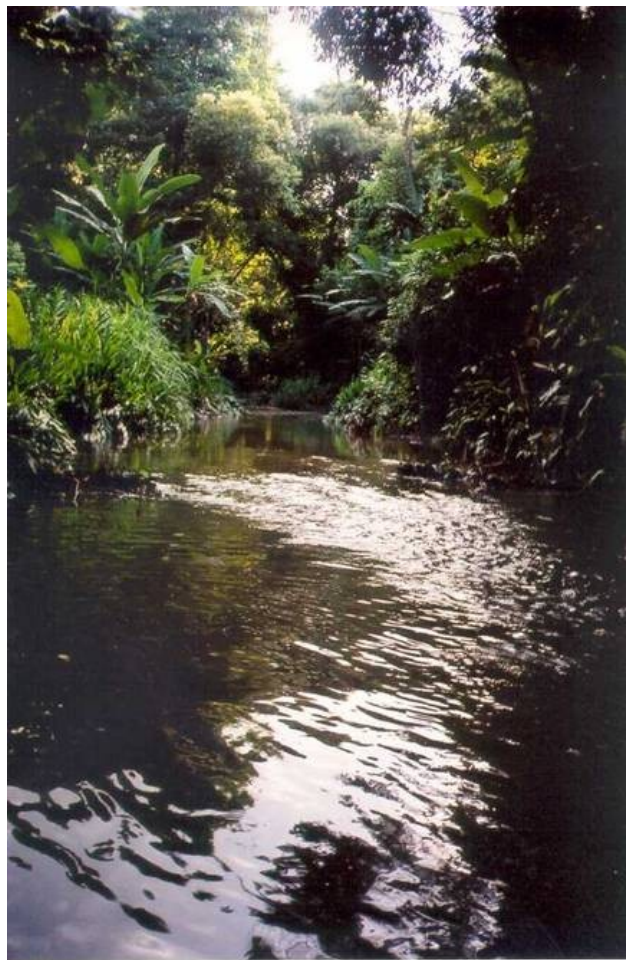


**Figura 1** - Mapa Hidrográfico do Paraná, evidenciando a Bacia do Atlântico, com as seis sub-bacias.



**Figura 2** – Mapa da Bacia Hidrográfica do Atlântico composta pelas seis sub-bacias representadas pelas letras: **R** – Sub-Bacia do Rio Ribeira; **L** – Sub-Bacia da Baía das Laranjeiras; **A** – Sub-Bacia da Baía de Antonina; **G** – Sub-Bacia da Baía de Guaratuba. As sub-bacias em destaque referem-se à Sub-Bacia do Rio Nhundiaquara, representada pela letra **N** e à Sub-Bacia da Baía de Paranaguá, representada pela letra **P**, nestas localizam-se os locais de coleta do presente estudo.

O Rio Ribeirão (25°35'S; 48°37'O) nasce a 766m de altitude em relação ao nível do mar, na Serra da Prata. Este rio é caracterizado por águas claras, variado sombreamento pela vegetação marginal, correnteza moderada e substrato composto por areia, folhiço e cascalho (Figura 3). Situa-se em uma região bem conservada da Floresta Atlântica com as nascentes no Parque Nacional Saint-Hilaire/Hugo Lange. Apesar de ser utilizado esporadicamente para recreação e de um dos trechos situar-se próximo a uma rodovia, a influência antrópica não é significativa (FEHLAUER, 2002).



**Figura 3** – Foto ilustrativa do Rio Ribeirão (Paranaguá, PR).

O Rio Barroca (25°24'S; 48°50'O) com elevação de 63 metros pertence à Sub-bacia do Rio Nhundiaquara. É caracterizado por possuir águas claras, com fundo arenoso, com cascalho e folhiço. Possui correnteza moderada, e está situado em uma região conservada do Bioma Floresta Atlântica, na Estrada São João da Graciosa, próximo à cidade de Morretes. (Figura 4).



**Figura 4** - Foto ilustrativa do Rio Barroca (São João da Graciosa, PR).

## MATERIAL

Foram realizadas várias coletas de exemplares de *Characidium lanei* (Figura 5) pertencentes aos rios estudados. Nem todos os exemplares da espécie coletados apresentavam metáfases mitóticas em condições de análise em Giemsa e aplicação das técnicas de Bandamento C e RONS, devido ao pequeno tamanho dos animais. Os procedimentos metodológicos foram aplicados em 61 peixes, sendo 23 pertencentes ao sexo masculino, 28 pertencentes ao sexo feminino e não foi possível determinar o sexo de dez exemplares, antes da análise citogenética. As melhores metáfases foram consideradas para este trabalho, totalizando um número de 17 exemplares com metáfases em boas condições de análise.



**Figura 5** - Foto ilustrativa da espécie *Characidium lanei*.

## MÉTODOS

### Procedimentos Metodológicos para Coleta e Transporte

As coletas foram realizadas com rede de mão e peneira. Os peixes foram colocados em um isopor com água do próprio rio e transportados vivos ao laboratório de Citogenética Animal da Universidade Federal do Paraná. No laboratório, foram mantidos em tanques aerados.

### Obtenção das Metáfases Mitóticas

#### Método indireto

Alguns dos animais foram processados através do método indireto “in vitro” de cultura de tecidos sólidos de curto tempo, utilizando a porção anterior do rim, descrito por FENOCCHIO *et al.* (1991), com algumas modificações.

- Retirou-se a porção anterior do rim, (MOREIRA-FILHO & BERTOLLO, 1991), no caso específico do *Characidium lanei*, por ser um animal de proporções diminutas, foi utilizado todo o rim (porção anterior e posterior). O tecido foi transferido para uma placa de Petri contendo 7 ml de meio de cultura RPMI e 20% de soro bovino fetal.

- Em seguida, o material foi desagregado com pinças de ponta fina com posterior aspensão e expiração da solução com uma seringa de vidro sem agulha.

A solução de células obtida foi incubada em estufa a 29 °C por sete horas em média.

Os exemplares foram devidamente numerados, segundo o Livro de Registros de Citogenética de Peixes do laboratório de Citogenética Animal, e em seguida fixados em formol por 24 horas e colocados em álcool 70%.

O procedimento de processamento do material foi o seguinte:

- 25 minutos antes de completar o tempo de cultura, foram pingadas duas gotas de colchicina (0,025%) em cada recipiente. A placa de Petri foi então

gentilmente agitada para homogeneizar o material e este foi mantido em estufa até completar o tempo necessário (7 horas e meia).

- Passado os 25 minutos, a cultura foi sacrificada e transferida para um tubo de ensaio que foi centrifugado por 10 minutos a 800-900 rpm.

- O sobrenadante foi descartado e completou-se o tubo de ensaio com 8 ml com solução hipotônica de KCl (0,075M). A solução foi ressuspensa e ficou por cerca de 30 minutos a uma temperatura de 37°C.

- O fixador foi preparado com três partes de metanol para uma parte de ácido acético e mantido sob refrigeração.

- Dado o tempo de hipotonização, foram pingadas algumas gotas do fixador em cada tubo. A solução foi ressuspensa até ficar homogêneo (por volta de 30 vezes), e centrifugada por 10 minutos a 800-900 rpm.

- O sobrenadante foi descartado e em seguida o tubo foi completado até o volume de 8 ml com fixador. Novamente o material foi ressuspensa e centrifugado por 10 minutos a 800-900 rpm.

- Esta última etapa foi repetida por mais duas vezes.

- Após a terceira e última centrifugação com fixador, o sobrenadante foi descartado. Foi colocado 1,0 ml de fixador e o material foi ressuspensa por mais uma vez. Esta solução foi armazenada em tubo de micropipeta do tipo Eppendorf (1,5ml) em freezer a - 20° C.

### **Método direto**

Alguns peixes foram processados através do método direto, utilizando a técnica convencional de preparação de cromossomos mitóticos de peixes, descrito por BERTOLLO *et al.* (1978).

- Injetou-se dorsalmente no animal uma solução de levedura (1ml/100g);

- O peixe foi mantido em aquário bem aerado, por um período de 48 horas.

- Decorrido este tempo injetou-se intra-abdominalmente, entre as nadadeiras peitorais e ventrais, solução aquosa de colchicina (0,0125%) na proporção de 1ml/100g de peso do animal.

- O peixe foi deixado em aquário bem aerado, por um certo período de tempo (20 minutos a 1 hora), em seguida o animal foi sacrificado e retirou-se o rim (anterior e/ou posterior) ou, no caso de animais muito pequenos, retirou-se todo o conjunto de órgãos, exceto vesícula biliar, sob estereomicroscópio.

- Lavou-se rapidamente o material retirado em solução hipotônica de KCl a 0,075 M e transferiu-o para pequenas cubas de vidro contendo solução hipotônica (cerca de 5 mL).

- Dissociou-se bem o material, com pinças de dissecação e uma seringa desprovida de agulha, aspirando e expirando suavemente para facilitar a separação das células e para obter uma suspensão celular homogênea.

- Colocou-se a suspensão obtida em estufa a 36-37°C, durante cerca de vinte e cinco - trinta minutos.

- O material foi ressuspendido com bastante cuidado, com auxílio de uma pipeta Pasteur, e então a suspensão obtida foi transferida para um tubo de centrífuga. Pedacos de tecido ainda não desfeitos foram descartados.

- Algumas gotas de fixador (álcool metílico 3 : ácido acético 1), recém-preparado foram acrescentadas e então, o material foi ressuspendido e centrifugado por 10 minutos, a 900 rpm, descartando o sobrenadante com uma pipeta Pasteur.

- Foi adicionado, vagorosamente, 5-7 ml de fixador recém-preparado, deixando escorrer através das paredes do tubo de centrífuga.

- O material foi mais uma vez ressuspendido, cuidadosamente, com auxílio de uma pipeta Pasteur.

- Repetiu-se o processo de fixação por duas vezes. Após a última centrifugação e eliminação do sobrenadante, cerca de 1 mL de fixador, dependendo da quantidade de material sedimentado, foi adicionado e o material foi ressuspendido.

- O material foi então, guardado em freezer, acondicionado em pequenos frascos tipo Eppendorf.

### **Coloração Convencional - GIEMSA**

Para análise do número e morfologia dos cromossomos, lâminas foram lavadas e em seguida receberam três gotas do material preparado anteriormente. Este material foi pingado em banho-maria a 60°C e seco ao ar. As lâminas foram coradas com solução de corante Giemsa 5%, diluído em tampão fosfato pH 6,8 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) durante aproximadamente 10 minutos. Em seguida foram lavadas em água corrente e secas ao ar.

### **Coloração com Nitrato de Prata - AgRONS**

A técnica de coloração com nitrato de prata descrita por HOWELL & BLACK (1980), foi realizada com lâminas envelhecidas por pelo menos um dia, em estufa à 42° C.

- Foram pingadas duas gotas de solução coloidal reveladora (1g de gelatina dissolvida em 50 ml de água destilada + 0,5 ml de ácido fórmico) e uma gota da solução de nitrato de prata (1g de  $\text{AgNO}_3$  dissolvida em 2 ml de água destilada) sobre o material na lâmina.

- Em seguida foi colocada uma lamínula sobre a lâmina e imediatamente levada à estufa a 60°C até que a mistura das soluções alcançasse uma coloração marrom-dourada.

- Em seguida a lâmina foi lavada em água corrente, deixada secar ao ar.

- Para diminuir o brilho da lâmina, pode-se colocá-la em Giemsa, bastante diluída em tampão fosfato pH 6,8 por 10 segundos.

## **Detecção da Heterocromatina Constitutiva**

Os estudos de heterocromatina foram realizados segundo a técnica de SUMNER (1972).

- O material acondicionado no freezer foi pingado sobre a lâmina e em seguida, a lâmina foi colocada em solução de HCl 0,2N à temperatura ambiente por 15 minutos.

- A lâmina foi então lavada com água destilada e seca ao ar. Em seguida, a lâmina foi colocada em solução de Bário a 5% ( $\text{Ba}(\text{OH})_2$ ) à 42°C por aproximadamente 15 segundos.

- Rapidamente a lâmina foi inserida no HCl, apenas para remover o excesso de Bário, e então lavada com jato de água destilada.

- A lâmina foi colocada em uma solução de 2xSSC (15,53g de NaCl + 8,82g de Citrato Trissódico + água deionizada) a 60°C por uma hora.

- Após este tempo, a lâmina foi novamente lavada com água destilada e seca ao ar.

A lâmina foi corada com Giemsa diluída a 2% em tampão fosfato pH 6,8 durante 15 minutos.

## **Montagem e Análise dos Cariótipos**

Foi utilizado um sistema de captura digital de imagens, com microscópio Carl Zeiss Axiophot acoplado a este o sistema Applied Spectral Imagem. As análises cromossômicas foram realizadas no computador através do software Case Data Manager Expo 2.0, e as medições cromossômicas foram feitas com o software Corel Draw 9 para a determinação da relação entre os braços (RB).

Para o cálculo do NF os cromossomos metacêntricos (m), submetacêntricos (sm) e subtelocêntricos (st) foram considerados como bíbraquiais, enquanto que os cromossomos acrocêntricos (a) constituídos por um único braço.

A classificação dos cromossomos quanto à relação entre os braços seguiu conforme LEVAN, FREDGA e SANDBERG (1964), determinando os tipos a seguir:

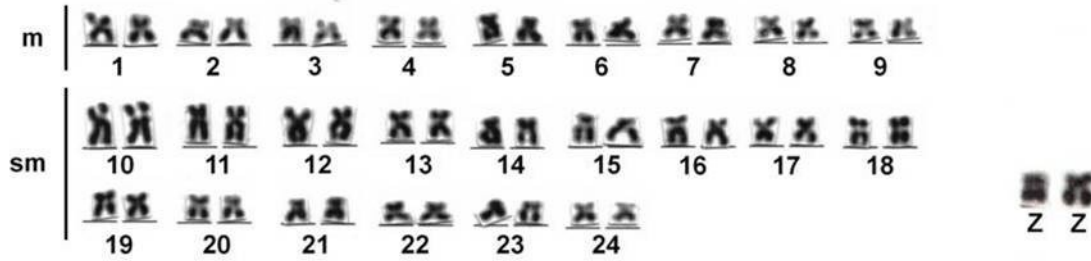
Metacêntrico (m)	RB = 1,00 a 1,70
Submetacêntrico (sm)	RB = 1,71 a 3,00
Subtelocêntrico (st)	RB = 3,01 a 7,00
Acrocêntrico (a)	RB > 7,01

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

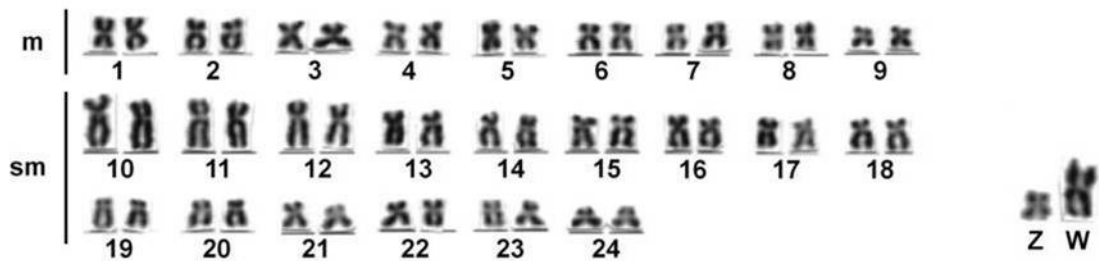
### Estrutura cariotípica

O estudo comparativo entre duas populações de *C. lanei* da Bacia Litorânea paranaense mostrou que as duas populações apresentam  $2n = 50$  cromossomos, mas com fórmulas cariotípicas distintas.

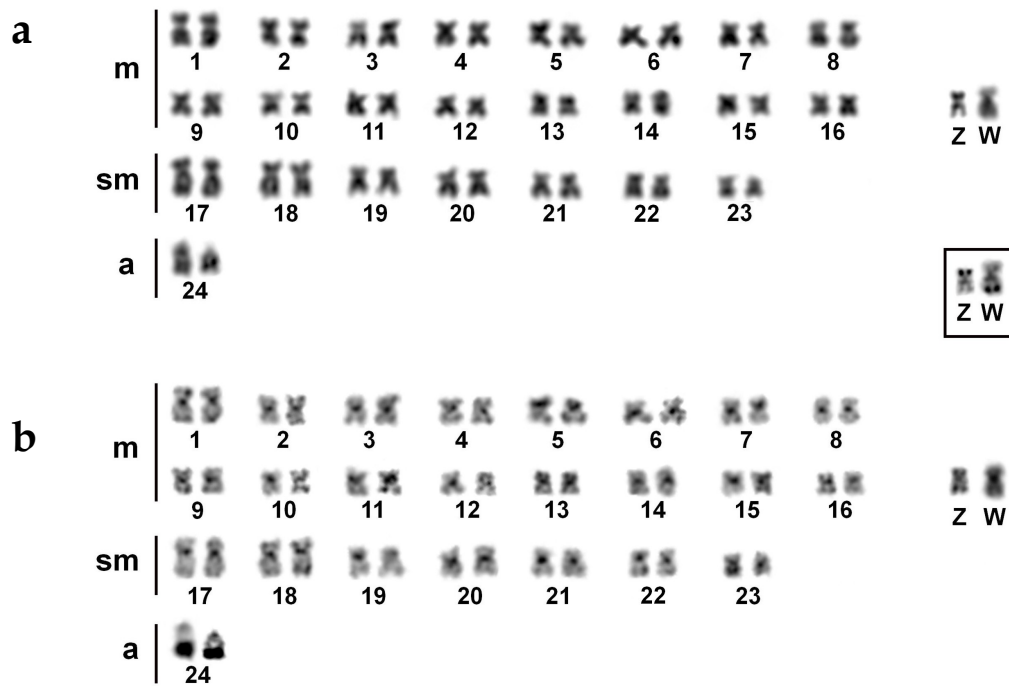
A população de *Characidium lanei* do Rio Ribeirão apresentou um número diplóide modal de 50 cromossomos e um sistema de cromossomos sexuais heteromórficos do tipo ZZ/ZW, no qual o cromossomo Z consiste de um pequeno submetacêntrico (sm), e o cromossomo W um cromossomo metacêntrico (m) maior em tamanho em relação ao Z. Portanto, os machos apresentaram uma fórmula cariotípica composta de  $18m + 32sm$  (Figura 6) e as fêmeas  $19m + 31sm$  (Figura 7). Uma constituição diferente foi observada no cariótipo da população de *Characidium lanei* do Rio Barroca, no qual também foi encontrado um  $2n = 50$  cromossomos mas com uma fórmula cariotípica constituída por 32 cromossomos metacêntricos, 16 submetacêntricos e um par de cromossomos acrocêntricos tanto em fêmeas quanto em machos. Nesta população ambos os cromossomos sexuais são do tipo submetacêntricos com W novamente possuindo um maior tamanho em comparação com o cromossomo Z (Figura 8a).



**Figura 6** - Cariótipo de macho de *Characidium lanei* do rio Ribeirão com coloração convencional por Giemsa. Em destaque estão os cromossomos sexuais ZZ.



**Figura 7** - Cariótipo de fêmea de *Characidium lanei* do rio Ribeirão com coloração convencional por Giemsa. Em destaque estão os cromossomos sexuais ZW.



**Figura 8** - Cariótipo de *Characidium lanei* do rio Barroca com coloração convencional por Giemsa (a) e bandamento C seqüencial (b). No box está o par sexual portador das RONS.

Ao contrário dos vertebrados superiores, cromossomos sexuais heteromórficos não constituem uma condição plesiomórfica em peixes. De fato, cromossomos heteromórficos parecem evoluir independentemente na história evolutiva deste grupo (ARTONI *et al.*, 2001). Aproximadamente 50% das ocorrências de cromossomos sexuais reportadas para a fauna neotropical correspondem ao sexo heterogamético feminino (MOREIRA-FILHO *et al.*, 1993). A diferenciação morfológica dos vários sistemas sexuais é bem conhecido no sistema ZZ-ZW, onde o cromossomo W possui uma região heterocromática não presente no cromossomo Z (ALMEIDA-TOLEDO *et al.*, 2001).

Entre a família Characidae, cromossomos sexuais representam uma ocorrência rara. Na verdade, cromossomos ZW diferenciados foram descritos apenas em três outras espécies de *Characidium*, enquanto as outras espécies não apresentam sistema cromossômico sexual (MAISTRO *et al.*, 1998 entre outros), *Characidium fasciatum* (MAISTRO *et al.*, 1998), *Characidium gomesi* (CENTOFANTE *et al.*, 2001) e *Characidium alipioi* (VICARI, 2006). As espécies de *Characidium* que apresentam sistema cromossômico sexual estão mais relacionadas entre si do que as espécies que não possuem tal sistema. Nas três espécies, os cromossomos Z e W podem apresentar tamanho comparável entre si ou diferenciado, no caso o W de tamanho menor que o Z. No entanto, o cromossomo W sempre é identificado por se mostrar completamente heterocromático (CENTOFANTE *et al.*, 2003).

Embora o gênero *Characidium* apresente uma estrutura cariotípica relativamente estável, usualmente com um número diplóide  $2n=50$  e cromossomos bibraquiais, algumas divergências inter-específicas e inter-populacionais têm sido observadas (Tabela 1), inclusive com a ocorrência de cromossomos B (MIYAZAWA & GALETTI Jr., 1994; MAISTRO *et al.*, 1998).

**Tabela 1** – Dados cromossômicos para as espécies do gênero *Characidium*.

Espécie	Fórmula Crom.	Sistema Sexual	RONs	Localidade	Ref.
<i>C. cf zebra</i>	32M+18SM	Ausente	Par 25	Reserva Jataí, SP	1
<i>C. cf zebra</i>	32M+18SM	Ausente	Par 25	Rio Passa-Cindo, SP	2
<i>C. cf zebra</i>	32M+18SM	Ausente	Par 25	Rio Piracicaba, SP	1
<i>C. zebra</i>	32M + 18SM	Ausente	Par 23	Córrego Paiol, SP	3
<i>C. zebra</i>	32M + 18SM	Ausente	Par 23	Rio Machado, MG	4
<i>C. lagosantensis</i>	32M+18SM	Ausente		Reserva Jataí, SP	1
<i>C. lagosantensis</i>	32M+18SM	Ausente		Rio Mogi- Guaçu, SP	1
<i>C. pterostictum</i>	32M, 16SM, 2ST	Ausente		Reserva Carlos Botelho, SP	1
<i>C. pterostictum</i>	32M, 16SM, 2ST	Ausente		Reserva Jataí, SP	1
<i>C. lauroi</i>	24M, 24SM, 2ST	Ausente	5 e 23	Ribeirão Grande, SP	5
<i>C. cf fasciatum</i>	32M+18SM	Presente	Par 17	Quinta e Rio Pardo, SP	6
<i>C. cf fasciatum</i>	32M+18SM	Ausente	Par 23	Rio Machado, MG	7
<i>C. gomesi</i>	32M+18SM	Ausente	Par 17	Rio Machado, MG	4
<i>C. cf zebra</i>	32M+18SM	Ausente	Par 23	São Bento Sapucaí, SP	3
<i>C. gomesi</i>	32M+18SM	Presente	Par 18	São Bento Sapucaí, SP	3
<i>C. gomesi</i>	32M, 18SM	Presente	18	Córrego Paiol, SP	3
<i>C. sp. cf. C. gomesi</i>	32M, 18SM	Presente	17 e 2	Rio Parda e da Quinta, SP	6
<i>C. sp. cf. C. gomesi</i>	f: 31M, 18SM, 1ST m: 32M, 18SM	Presente	10 e 2	Rio Quebra Perna, PR	8
<i>C. sp. cf C. alipioi</i>	30M, 20SM	Presente	16	Ribeirão Grande SP	5
<i>C. lanei</i>	f: 17M, 33SM m: 19M, 31SM	Presente		Rio Ribeirão, PR	9
<i>C. lanei</i>	32M, 16SM, 2A	Presente		Rio Barroca, PR	9

Referências: 1. MIYAZAWA & GALETTI Jr (1994); 2. MIYAZAWA (1991); 3. CENTOFANTE *et al.* (2001); 4. SILVA & MAISTRO (2006); 5. CENTOFANTE *et al.* (2003); 6. MAISTRO *et al.* (1998); 7. BRAGA & MAISTRO (2000); 8. VICARI (2006); 9. Presente estudo.

O número diplóide  $2n = 50$  cromossomos é detectado em todas espécies do gênero consistindo de um caráter ancestral para o grupo (MIYAZAWA & GALETTI, 1994), e a macroestrutura cariotípica de  $32m + 18sm$  é a situação mais comumente verificada. Diante desta peculiaridade, os resultados observados para as duas populações de *Characidium lanei* do presente trabalho, representam uma descrição de novos citótipos, uma vez que o citótipo do rio Ribeirão mostra uma fórmula cariotípica oposta ao padrão do gênero e o do rio Barroca a divergência é dada pela presença de dois cromossomos acrocêntricos (par 25) o qual representa um importante marcador citotaxonômico para esta população. Rearranjos cromossômicos tais como

inversões e translocações poderiam ter desempenhado um papel importante na diversificação cariotípica destas populações.

Segundo MAISTRO *et al.* (1998), as diferenças nas estruturas cariotípicas entre espécies-populações de *Characidium* poderiam estar relacionadas ao modo de vida desses animais, típicos de cabeceiras, com baixa mobilidade, formando populações locais que poderiam facilitar a fixação de rearranjos cromossômicos.

Segundo BOHLKE *et al.* (1978), os pequenos caracídeos como os do gênero *Astyanax*, *Hyphessobrycon*, *Hemigrammus* e *Characidium* apresentam uma taxa elevada de especiação, sendo possível a ocorrência de muitas espécies desconhecidas devido ao alto grau de endemismo geográfico nesses grupos de peixes.

## Sítios de rDNA

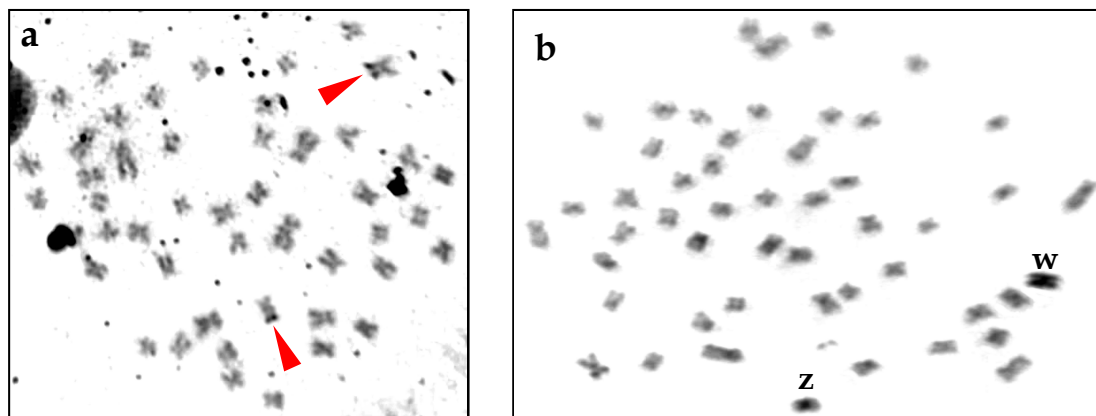
*Characidium lanei* do presente estudo possui RONS simples com apenas um par de cromossomos mostrando Ag-RONS ativa. Na população do rio Ribeirão elas estão localizadas em posição terminal de um par de cromossomos submetacêntricos não relacionados ao sexo (Figura 9a). Este par cromossômico é homólogo a outras espécies de *Characidium* que apresentam RONS simples (MAISTRO *et al.*, 1998; CENTOFANTE *et al.*, 2001, 2003; SILVA & MAISTRO; 2006).

A localização e o número de sítios de rDNA têm sido espécie-específico para algumas espécies de peixes neotropicais inclusive para o gênero *Characidium* (JESUS & MOREIRA-FILHO, 2000; ARTONI *et al.*, 2006). Contudo os sítios de rDNA também podem estar associados com a diferenciação de sistemas de cromossomos sexuais (BORN & BERTOLLO, 2000; ARTONI *et al.*, 2001; ARTONI & BERTOLLO, 2002; VICARI *et al.*, 2003), de modo que foi exatamente esta a situação observada para o citótipo do rio Barroca, no qual a localização destes sítios está no telômero do braço curto e no braço longo dos cromossomo Z e W respectivamente (Figura 8). Assim, a localização de sítios de rDNA maior sobre os cromossomos sexuais pode representar uma condição antiga, e provavelmente eles sempre estiveram presentes nos ancestrais dos cromossomos Z e W quando estes ainda eram um par homomórfico.

Portanto nossos dados sugerem que o rDNA maior de *Characidium lanei* desta população específica possui uma diversificação dependente da diferenciação dos cromossomos sexuais Z e W prosseguindo vinculados seus caminhos evolutivos. Para a comprovação de tal hipótese, é necessário a utilização da sonda de rDNA 18S.

### Heterocromatina e diferenciação do cromossomo sexual W

No presente estudo, a heterocromatina detectada pela técnica do bandamento C, corroborou com a identificação dos cromossomos relacionados com o sistema sexual para os espécimes de ambas as populações. Em *C. lanei* do Rio Ribeirão, o cromossomo Z apresenta apenas um bloco heterocromático na região proximal ao centrômero, o cromossomo W é completamente heterocromático (Figura 9). Bandas C também foram visualizadas nas regiões centroméricas de alguns cromossomos, mas através de marcações pequenas e fracas. Tais marcas não foram observadas em todos os cromossomos, como descrito para as outras espécies de *Characidium*. Este fato pode refletir a pequena quantidade de heterocromatina presente em *C. lanei* desta população.



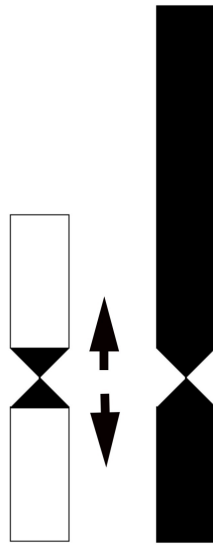
**Figura 9** - Metáfases somáticas de fêmea de *C. lanei* do rio Ribeirão: (a) as setas indicam os cromossomos portadores das Ag-RONs; (b) bandas C.

A população de *C. lanei* do Rio Barroca apresenta marcações heterocromáticas centroméricas na maioria dos cromossomos e ocupando todo um braço de alguns pares (Figura 8b). Além disso, foi verificado um heteromorfismo de tamanho com relação aos blocos teloméricos do par 25. O polimorfismo de heterocromatina é geralmente discreto nos peixes, envolvendo poucos cromossomos. Podem estar relacionados ao tamanho dos blocos (MARTINEZ *et al.*, 1991; JANKUN *et al.*, 1995) ou resultar da associação entre regiões heterocromáticas e RONS polimórficas (HARTLEY, 1988; AMORES *et al.*, 1993). Este polimorfismo intra-individual caracterizado pela diferença na quantidade de heterocromatina entre homólogos pode resultar da recombinação desigual causada por pareamento errôneo entre segmentos de DNA satélite, presente nestas regiões. Isto pode conduzir ao aumento ou à diminuição do número de repetições (SMITH, 1976). Entretanto, foi verificada em algumas células, coincidência espacial aparente entre a parcela heterocromática do cromossomo com a região eucromática do seu homólogo, de modo que um processo de heterocromatinização da eucromatina não pode ser descartado neste caso.

Quanto aos cromossomos sexuais, o Z apresenta uma pequena banda centromérica e o cromossomo W apresenta-se totalmente heterocromático. Esta situação é descrita para todas as espécies de *Characidium* que possuem o sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW heteromórficos, embora estes cromossomos possam variar em morfologia e tamanho. Para as populações de *C. fasciatum* do Rio Pardo e Rio da Quinta (MAISTRO *et al.*, 1998) o par submetacêntrico n. 19 foi considerado o par sexual ZW, não havendo diferenciação de tamanho entre Z e W. Em *C. gomesi* do córrego Paiol Grande, ambos os cromossomos sexuais são metacêntricos, mas o W é menor em tamanho que o Z (CENTOFANTE *et al.*, 2001). Já a população do córrego Quebra Perna, *C. gomesi* apresenta o cromossomo Z metacêntrico e o cromossomo W submetacêntrico maior em tamanho que o Z. *Characidium alipioi*, do córrego Ribeirão Grande, o primeiro par metacêntrico é considerado o par sexual, sem diferença de tamanho entre o Z e o W (CENTOFANTE *et al.*, 2003). A diferenciação evolutiva nos sistemas de cromossomos sexuais ZW podem estar associados com barreiras biogeográficas.

As formas exibindo um cromossomo W completamente heterocromático são relacionadas alopatricamente entre si (CENTOFANTE *et al.*, 2003).

Em alguns peixes, a diferenciação dos cromossomos sexuais parece ser um fato relacionado a segmentos de heterocromatina exclusivos dos cromossomos Y ou W. Na maioria dos casos, uma heterocromatinização primária, parece ter sido seguida por um processo de acúmulo de heterocromatina, com o conseqüente aumento do tamanho dos cromossomos Y ou W em relação aos seus homólogos originais (X ou Z) (Figura 10), como observado em *Characidium lanei*. Por outro lado, em várias espécies, este processo fora acompanhado pela redução no tamanho do cromossomo W, o qual é menor que o Z (CENTOFANTE *et al.*, 2001). Sendo assim, se os cromossomos Z e W do gênero *Characidium* foram inicialmente um par homólogo, a heterocromatinização parece constituir um passo decisivo na diferenciação do cromossomo W, seguido por modificações tais como deleções e/ou inversões. Nesta proposta, ambos cromossomos Z e W, estariam modificados em tamanho e forma, tendo sofrido reduções em tamanho em relação a possível condição ancestral. Este mecanismo está de acordo com o modelo para a evolução de cromossomos sexuais heteromórficos. Neste modelo, o cromossomo W é protegido da presença constante do cromossomo Z, que é evolutivamente confinado à homozigossidade em um dos sexos, e restrito quanto à habilidade para recombinação. Desta forma, é possível para o cromossomo W progredir de uma condição inicial de homomorfismo com o cromossomo Z para um cromossomo diferenciado, podendo mesmo se tornar pequeno e heterocromático, com poucos locos funcionais (GREEN, 1990).



**Figura 10** - Derivação hipotética do cromossomo W, a flecha indica a amplificação da heterocromatina.

## Conservação

Apenas na década de 1990, a Genética passou a auxiliar na compreensão dos problemas ligados à área de conservação ambiental (SOLÉ-CAVA, 2001). Tal interação se faz importante, pelo acelerado processo de desmatamento, degradação e mudanças climáticas, que tem acarretado a perda da biodiversidade. As planícies costeiras são particularmente vulneráveis à concentração de atividades humanas, juntamente com os sucessivos impactos resultantes de diferentes ciclos de exploração de recursos naturais e da concentração da população, levaram a uma drástica destruição da paisagem natural do Bioma Floresta Atlântica. Neste local, há a concentração de espécies com elevados níveis de degradação, sendo assim considerado um *hotspot*, em termos de conservação mundial (MEYERS *et al.*, 2000).

O papel da genética na conservação é muito diversificado e não se limita apenas à identificação e mitigação das conseqüências da endogamia e exogamia. Em combinação com a ecologia e com a biologia de populações, a genética se torna uma ferramenta importante na determinação das espécies a serem conservadas (sistemática molecular), dos locais onde focalizar os esforços de conservação (filogeografia) e das estratégias para conservar a maior quantidade de diversidade genética nas populações com o intuito de manter o potencial evolutivo de uma espécie ou população (genética de populações) (PEREZ-SWEENEY *et al.*, 2004).

A diversidade é fundamental para a manutenção de um táxon, pois se houver alguma mudança no ambiente, a população (ou as populações) com maior variabilidade possui maior chance de sobrevivência. Sendo assim, a análise das várias populações de *Characidium lanei* sob o aspecto da genética da conservação é de extrema importância. Basta considerar as características peculiares da espécie, bem como as características populacionais e também sob a relevância do hábitat da espécie, um importante remanescente de Floresta Atlântica no Paraná.

Bacia Hidrográfica é uma unidade natural que integra os processos socioambientais onde se pode avaliar os impactos ambientais decorrentes das

ações antrópicas e, pode ser objeto de estudo de pesquisas que enfoquem a compreensão dos mecanismos do seu funcionamento e da sua preservação.

A Genética contribui para a conservação com a caracterização da biodiversidade, seja populacional ou em níveis taxonômicos superiores. E tal caracterização permite compreender a relação entre indivíduos, populações e outros táxons. Os dados obtidos pelas técnicas genéticas só possuem significado biológico quando outras informações, tais como a biologia, a ecologia e a biogeografia se fazem disponíveis. Uma unidade evolutivamente significativa é definida como uma população ou grupo de populações que se encontram diferenciados em termos genéticos, morfológicos ou ecológicos de populações próximas (co-específicas), refletindo uma história de isolamento geográfico em níveis variáveis. Estas populações, ao possuírem características próprias mereceriam ser consideradas como unidades independentes para fins de conservação (EIZIRIK, 1996). A maneira de definir tais unidades depende de como interpretar os padrões de variação observados entre populações no contexto da história de vida de cada espécie, sua evolução e sua biogeografia.

Há concordância por parte de vários profissionais que a preservação de espécies como unidades simples (manejada em campo ou cativeiro com uma única população panmítica, em que se promova o fluxo gênico entre quaisquer indivíduos independentemente da sua origem geográfica) é inadequada e seria prejudicial não só por obscurecer parte da história evolutiva recente de populações já diferenciadas, o que seria uma irresponsabilidade, como também por promover graves problemas ao misturar repositórios genéticos adaptados a diferentes condições ecológicas (TEMPLETON, 1986; LYNCH, 1996).

O aprimoramento, bem como a utilização, das técnicas genéticas para a Biologia da Conservação se expandiu muito nas últimas décadas, indicando a sua relevância em estudos biogeográficos, sistemáticos, ecológicos e comportamentais ligados ao manejo e à preservação de espécies e habitats. As técnicas genéticas podem ser utilizadas para a discriminação de unidades genéticas distintas, para estimar a variabilidade genética de populações naturais, para determinação do sexo de indivíduos em estudos populacionais e também, na identificação de híbridos. Segundo SOLÉ-CAVA (2001), geralmente

os estudos genéticos são mais freqüentes com populações bastante reduzidas ou ameaçadas e, portanto, seria mais adequado um procedimento de prevenção do processo de extinção através da proteção ambiental.

Em alguns casos, o táxon analisado, inicialmente não é considerado ameaçado, mas após o estudo, se for confirmado que está subdividido em populações de menor número de indivíduos, essas populações, por sua vez, podem estar ameaçadas e merecem mais atenção (MIYAKI & ALVES, 2006). Sendo assim, a utilização das técnicas genéticas aliada à ampliação do estudo para outras espécies do gênero que também habitam os rios da Bacia Atlântica no Paraná, melhoraria o entendimento a cerca deste ambiente e das espécies que o habitam.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; FORESTI, F.; PÉQUIGNO, T.E.V.; DANIEL-SILVA, M.F.Z. 2001. XX:XY sex chromosome system with X heterochromatinization: an early stage of sex chromosome differentiation in the neotropical electric eel *Eigenmannia virescens*. **Cytogenet Cell Genet** 95: 73-78.
- AMORES, A.; MARTINEZ, G.; REINA, J.; ALVAREZ, M.C.. 1993. Karyotype, C-banding, and Ag-silver NOR analysis of *Diplodus bellottii* (Sparidae, Perciformes): intra-individual polymorphism involving heterochromatic regions. **Genome** 36(4): 672- 675.
- ARANHA, J.M.R.; TAKEUTI, D.F.; YOSHIMURA, T.M. 1998. Habitat use and food partitioning of the fishes in a coastal stream of Atlantic Forest, Brazil. **Rev. Biol. Trop.** 46(4): 951-959.
- ARANHA, J.M.R.; GOMES, J.H.C.; FOGAÇA, F.N.O. 2000. Feeding of two sympatric species of *Characidium*, *C.lanei* and *C.pterostictum* (Characidiinae) in a coastal stream of Atlantic Forest (Southern Brazil). **Brazilian Archives of Biology and Technology** 43: 527-531.
- ARRUDA, M. B. 1997. Conservação, Ecologia Humana e Sustentabilidade na Caatinga - Estudos da região do Parque Nacional da Serra da Capivara. In: *Série Meio Ambiente em Debate*. Ed. Ibama: Brasília, 96p.
- ARTONI, R.F.; FALCÃO, J.N.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L.A.C. 2001. An uncommon condition for a sex chromosome system in Characidae fish. Distribution and differentiation of the ZZ/ZW system in *Triportheus*. **Chromosome Research** 9: 449-456.

- ARTONI, R.F.; TERCENIO, M.L.; VICARI, M.R.; MATIELLO, M.C.A.; CESTARI, M.M.; BERTOLLO, L.A.C. 2006. Cytogenetic of two sympatric *Corydoras* species (Pisces, Siluriformes, Challichthyidae) of Southern Brazil. **Braz. J Biol** 66(1b): 29-41.
- ARTONI, R.F.; BERTOLLO, L.A.C. 2002. Evolutionary aspects of the ZZ/ZW sex chromosome system in the Characidae fish, genus *Triportheus*. A monophyletic state and NOR location on the W chromosome. **Heredity** 89: 15-19.
- AVISE, J. C. 1996. Introduction: the scope of conservation genetics. In: *Conservation Genetics: Case Histories from Nature*. (Avisé, J.C. and Hamrick, J.L., eds.) Chapman & Hall, New York, pp. 1-9.
- BERTOLLO, L.A.C.; TAKAHASHI, C.S.; MOREIRA-FILHO, O. 1978. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Rev. Bras. Genet.** 1 (2): 103-120.
- BERTOLLO, L.A.C.; MOREIRA-FILHO, O; GALETTI, P.M.Jr. 1986. Cytogenetics and taxonomy: considerations based on chromosome studies of freshwater fish. **J. Fish Biol.** 28: 153-159.
- BERTOLLO, L.A.C.; CAVALLARO, Z.I. 1992. A highly differentiated ZZ/ZW sex chromosome system in a Characidae fish, *Triportheus guentheri*. **Cyt. C. Genet.** 60: 60-63.
- BOHLKE, J.E.; WEITZMAN, S.H.; MENEZES, N.A. 1978. Estado atual da sistemática dos peixes de água doce da América do Sul. **Acta Amazônica**, 8: 657-677.

- BORN, G.G.; BERTOLLO, L.A.C. 2000. An XX/XY sex chromosome system in a fish species *Hoplias malabaricus* with a polymorphic NOR-bearing X chromosome. **Chromosome Res** 8: 111-118.
- BRAGA, R.J.; MAISTRO, E.L. 2000. Estudos citogenéticos em duas espécies de *Characidium* (Pisces, Characidiinae) coletadas simpatricamente no Rio Machado – MG. **Genet Mol Biol**, Suplement, p. 58.
- BRUM, M.J.I. 1995. Correlações entre a filogenia e a citogenética dos peixes teleósteos. In: *Serie Monografias 2*. Sociedade Brasileira de Genética: Ribeirão Preto, pp. 5-42.
- BUCKUP, P.A. 1991. **The Characidiinae: a phylogenetic study of the South American darters and their relations with other Characiformes fishes**. PhD Thesis. University of Michigan.
- BUCKUP, P.A.; HAHN, L. 2000. *Characidium vestigipinne*: A new species of Characidiinae (Teleostei, Characiformes) from Southern Brazil. **Copeia** 2000 (1): 150-155.
- BUCKUP, P.A.; MENEZES, N.A.; GHAZZI, M.S. (ed) 2007. **Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil**. Rio de Janeiro: Museu Nacional, UFRJ. Série Livros 23, 195p.
- CARVALHO, G.R.; SHAW, P.W.; MAGURRAM, A.E.; SEGHERS, B.H. 1991. Marked genetic divergence revealed by allozymes among population of the guppy *Poecilia reticulata* (Poeciliidae), in Trinidad. **Biol. J. Linnean Soc.** 42: 389-405.
- CARVALHO, G.R. 1993. Evolutionary aspects of fish distribution: genetic variability and adaptation. **J. Fish. Biol.** 43: 53-73.

- CENTOFANTE, L.; BERTOLLO, L.A.C.; MOREIRA-FILHO, O. 2001. Comparative Cytogenetics among sympatric species of *Characidium* (Pisces, Characiformes). Diversity analysis with the description of a ZW sex chromosome system and natural triploidy. **Caryologia** 54(3): 253-260.
- CENTOFANTE, L.; BERTOLLO, L.A.C.; MOREIRA-FILHO, O.; BUCKUP, P.A. 2003. Chromosomal divergence and maintenance of sympatric *Characidium* fish species (Crenuchidae, Characidiinae). **Hereditas** 138: 213-218.
- EIZIRIK, E. 1996. Ecologia Molecular, Genética da Conservação e o Conceito de Unidades Evolutivamente Significativas. **Braz J Genet** 19(4): 23-29.
- ERLICH, P. R. 1997. A perda da diversidade - causas e conseqüências. In: *Biodiversidade* (Wilson, E. O., ed). Rio de Janeiro: Nova Fronteira, pp. 27-35.
- FEHLAUER, K.H. 2002. **Estrutura da população e táticas reprodutivas de *Characidium lanei* no Rio Ribeirão (Paranaguá, Paraná, BR)**. Curitiba, 42 f. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- FELDBERG, L.; BERTOLLO, L.A.C.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; FORESTI, F.; MOREIRA-FILHO, O. 1987. Biological aspects of Amazonian fishes. IX Cytogenetic studies in two species of the genus *Semaprochilodus* (Pisces, Prochilodontidae). **Genome** 29: 1-4.
- FENOCCHIO, A.S.; VENERE, P.C.; CESAR, A.C.G.; DIAS, A.L.; BERTOLLO, L.A.C. 1991. Short term culture from solid tissues of fishes. **Caryologia** 44 (2): 161-166.
- FISHBASE, 2007. Fishbase: A global information system on fishes. Disponível em: <http://www.fishbase.org>, acesso em março/2007.

Fundação SOS Mata Atlântica, 2006. Disponível em:  
<http://www.sosmatatlantica.org.br>, acesso em julho/2006.

GALETTI Jr, P.M.; FORESTI, F. 1986. Evolution of the ZZ/ZW system in *Leporinus* (Pisces, Anostomidae). **Cytogenet Cell Genet.** 43: 43-46.

GREEN, D.M. 1990. Muller's Ratchet and the evolution of supranumerary chromosomes. **Genome** 33: 818-824.

HAAF, T.; SCHMID, M. 1984. An early stage of ZZ/ZW sex chromosomes differentiation in *Poecilia sphenops* var. *melanistica* (Poeciliidae, Cyprinodontiformes). **Chromosoma** 89: 37-41.

HARTLEY, S.E., 1988. Cytogenetic studies of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Scotland. **J. Fish Biol.** 33: 735-740.

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

HUBERT, N.; RENNO, J. 2006. Historical Biogeography of South American freshwater fishes. **J Biogeogr** 33: 1414-1436.

INPE. 2001. **Monitoring of the Brazilian Amazonian Forest by Satellite**. São José dos Campos, SP.

JANKUN, M.; KLINGER, M.; WOZNICKI, P. 1995. Chromosome variability in European vendace (*Coregonus albula* L.) from Poland. **Caryologia** 48(2): 165-172.

JESUS, C.M.; MOREIRA-FILHO, O. 2000. Cytogenetic studies in some *Apareiodon* species (Pisces, Parodontidae). **Cytologia** 65: 397-402.

- LEVAN, A.; FREGDA, K.; SANDBERG, A.A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas** 52: 210-220.
- LOWE-MCCONNELL, R.H. 1999. **Estudos Ecológicos de Comunidades de Peixes Tropicais**. São Paulo, Edusp, 534p.
- LYNCH, M. 1996. A quantitative- genetic perspective on conservation issues. In: *Conservation genetics: case histories from nature*. (Avise, J.C. & Hamrick, J.L. eds.) Chapman & Hall, New York, pp. 471-501.
- MAACK, R. 2002. **Geografia Física do Estado do Paraná**. Curitiba: Imprensa Oficial.
- MAISTRO, E.L.; MATA, E.P.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. 1998. Unusual occurrence of a ZZ/ZW sex-chromosome system and supernumerary chromosomes in *Characidium* cf. *fasciatum* (Pisces, Characiformes, Characidiinae). **Genetica** 104: 1-7.
- MALABARBA, R.E.R.; VARI, R.P.; LUCENA, Z.M.S.; LUCENA, C.A.S. 1998. **Phylogeny and classification of neotropical fishes**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 603p.
- MARTÍNEZ, P.; VIÑAS, A.; BOUZA, C.; ARIAS, J; AMARO, R.; SÁNCHEZ, L. 1991. Cytogenetical characterization of hatchery stocks and natural populations of Sea and Brown Trout from northwestern Spain. **Heredity** 66: 9-17.
- MENEZES, N.A.; CASTRO, R.M.C.; WEITZMAN, S.H.; WEITZMAN, M.J. 1990. Peixes de riacho da Floresta Costeira Atlântica Brasileira: Um conjunto pouco conhecido e ameaçado de vertebrados. In: (Watanabe, S. coord.) II Simpósio de Ecossistemas da costa sul e sudeste brasileira: Estrutura,

manejo e função. Academia de Ciências do estado de São Paulo, pp. 290-295.

MENEZES, N.A. 1994. Importância da conservação da ictiofauna dos ecossistemas aquáticos brasileiros. Seminários sobre fauna aquática e o setor elétrico brasileiro. COMASE, ELETROBRÁS. Caderno 3, Conservação. pp. 7-13.

MIYAKI, C.Y.; ALVES, M.A.S. 2006. Técnicas Genéticas aplicadas à Conservação. In: *Biologia da Conservação: essências* (Rocha, C.F.D. et al., ed). São Carlos: RiMa, pp. 437-458.

MIYAZAWA, C.S. 1991. **Estudo cariotípico comparativo de espécies e populações distintas do gênero *Characidium* (Characidiinae, Characidae). Considerações citotaxonomicas e evolutivas.** São Carlos, 82 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) - Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de São Carlos.

MIYAZAWA, C.S.; GALETTI Jr. P.M. 1994. First cytogenetical studies in *Characidium* (Characidiinae, Characidae). **Cytologia** 59: 73-79.

MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L.A.C. 1991. Extraction and use of the cephalic kidney for chromosome studies in small fish. **Revista Brasileira de Genética** 14 (4): 1085-1090.

MOREIRA-FILHO, P.; BERTOLLO, L.A.C. & GALETTI JR, P.M. , 1993. Distribution of sex chromosome mechanisms in neotropical fish and description of a ZZ/ZW system in *Parodon hilarii* (Parodontidae). **Caryologia** 46 (2-3): 115-125.

- MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; FONSECA, G.A.B.; KENT, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature** 403: 853-858.
- NELSON, J.S. 1994. Fishes of the world. John Wiley & Sons, New York. 600p.
- PEREZ-SWEENEY, B.M.; RODRIGUES, F.P.; MELNICK, D.J. 2004. Metodologias moleculares utilizadas em genética da conservação. In: *Métodos de Estudo em Biologia da Conservação & Manejo da Vida Silvestre* (Cullen Jr, L. et al., org). Curitiba: Ed. da UFPR; Fundação O Boticário de Proteção à Natureza, pp. 343-380.
- PINTO, L.P.; BEDÊ, L.; PAESE, A.; FONSECA, M.; PAGLIA, A.; LAMAS, I. 2006. Mata Atlântica Brasileira: O desafio para a conservação da biodiversidade de um *Hotspot* mundial. In: *Biologia da Conservação: Essências*. (Rocha, C.F.D.; Bergallo, H.G.; Alves, M.A.S.; Sluys, M.V., ed). São Paulo: Rima Editora, pp. 91-118.
- REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS, C.J. 2003. **Check list f the freshwater fishes of South and Central América**. Porto Alegre: Edipucrs, 729p.
- RIBEIRO, A.C. 2006. 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 (2): 225-246.
- SCHAEFER, S.A. 1998. Conflicts and Resolution: impact of new taxa on Phylogenetic studies of the neotropical cascudinhos (Siluroidei: Loricariidae). pp. 375-400. 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, 603.

- SILVA, A.R.; MAISTRO, E.L. 2006. Cytogenetic divergence between two sympatric species of *Characidium* (Teleostei, Characiformes, Crenuchidae) from the Machado river, Minas Gerais, Brazil. **Genet Mol Biology** 29 (3): 459-463.
- SMITH, G.P. 1976. Evolution of repeated DNA sequences by unequal crossover. **Science** 191: 528-535.
- SOLA, L.; CATAUDELLA, S. & CAPANNA, E. 1981. New developments in vertebrate citotaxonomy: III. Karyology of bony fishes. **Genetica** 54: 285-328.
- SOLÉ-CAVA, A.M. 2001. Biodiversidade Molecular e genética da conservação. In: *Biologia molecular e evolução*. (Matioli, S.R., ed). Ribeirão Preto: Holos, pp. 172-192.
- SUMNER, A.T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Expl. Cell. Res** 74: 304-306.
- TAVE, D. 1993. **Genetics for Fish Hatchery Managers**. 2a edição. Van Nostrand Reinhold, New York.
- TEMPLETON, A.R. 1986. Coadaptation and outbreeding depression. In: *Conservation Biology: the science of Scarcity and Diversity* (Soulé, M.E.; ed.) Sinauer Associates Inc., Sunderland, USA, pp. 105-116.
- VIANA, V.M.; TABANEZ, A.J.; AGUIRRE, J. 1992. Restauração e Manejo de Fragmentos de Florestas Naturais. II Congresso Nacional sobre Essências Nativas. Instituto Florestal, São Paulo, SP.

VICARI, M.R.; ARTONI, R.F.; BERTOLLO, L.A.C. 2003. Heterochromatin polymorphism associated with 18S rDNA. A differential pathway among *Hoplias malabaricus* fish population. **Cytogenet Genome Res** 101: 24-28.

VICARI, M.R. 2006. **Diversidade de Peixes residentes em cabeceiras de rios. Uma abordagem cromossômica em três diferentes biomas aquáticos da região sul do Brasil.** São Carlos, SP. 158f. Tese de Doutorado - Programa de Pós-graduação em Genética e Evolução - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos.

WILSON, E. O. 1997. A Situação Atual da Diversidade Biológica. In: *Biodiversidade* (Wilson, E. O., ed). Rio de Janeiro: Nova Fronteira, pp. 3-18.