

PRISCILLA MARIA MENEL LEMOS

ESTUDOS CITOGENÉTICOS BÁSICOS E EFEITOS DO CHUMBO
NO COMPLEXO CARIOTÍPICO DE *Hoplias aff. malabaricus*
(PISCES, CHARACIFORMES, ERYTHRINIDAE).

Monografia para obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas
apresentada à disciplina de Estágio em
Genética (BG 016), DEPARTAMENTO DE
GENÉTICA, SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS,
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ.

ORIENTADOR(A): Prof^a. Dr^a. Marta
Margarete Cestari

CURITIBA

2000

Agradeço aos meus pais que possibilitaram a minha entrada na Universidade e que se esforçaram tanto para que eu chegasse onde cheguei, ao meu grande companheiro João R. M. Alves Costa, pela sua paciência, pelo apoio incondicional em todos os momentos e pelo amor a mim dedicado. A minha Orientadora Prof. Dr^a Marta Margarete Cestari que me indicou o caminho a seguir, que ensinou a importância da disciplina e da dedicação como fatores, que somados a curiosidade intrínseca, levam ao desenvolvimento da pesquisa científica e que me ofereceu seus conhecimentos e amizade, ao Prof. Dr. Ciro de Oliveira Ribeiro pela oportunidade de desenvolver este estudo, pelos conselhos e pela sua amizade. Gostaria também de agradecer a todos os meus colegas de Laboratório, pela companhia e apoio e a todas as pessoas que trabalham no departamento de genética, mais especificamente, e no Setor de Ciências Biológicas, como um todo, que me ajudaram de forma direta ou indireta no desenvolvimento deste trabalho e na minha formação acadêmica.

SUMÁRIO

<u>MONOGRAFIA</u>	<u>PÁGINA</u>
<u>AGRADECIMENTOS</u>	ii
<u>SUMÁRIO</u>	iii
<u>LISTA DE TABELAS E FIGURAS</u>	iv
<u>RESUMO</u>	v
<u>ABSTRACT</u>	vi
<u>1. INTRODUÇÃO</u>	1
1.1. Importância dos estudos citogenéticos em peixes	1
1.2. Aspectos gerais de <i>Hoplias aff. malabaricus</i> (BLOCH, 1794)	4
1.3. Aspectos citogenéticos de <i>Hoplias cf. malabaricus</i> (BLOCH, 1794).	6
1.4. Importância dos estudos sobre citotoxicidade.	9
1.5. A toxicidade dos metais pesados	11
1.6. Disponibilidade do chumbo no ambiente	12
1.6.1. Chumbo: metabolismo e efeitos	14
1.6.2. Efeitos celulares	16
<u>2. OBJETIVOS</u>	20
<u>3. MATERIAL E MÉTODOS</u>	21
3.1. Material	21
3.2. Métodos	23
3.2.1. Das coletas	23
3.2.2. Da obtenção do material biológico	24
3.2.3. Obtenção das metáfases mitóticas	24
3.2.3.1. Cultura de curto tempo	24
3.2.3.2. Análise do material e a coloração convencional	25
3.2.3.3. Caracterização das regiões organizadoras de nucléolo (RONs)	26
3.2.3.4. Detecção das regiões de heterocromatina constitutiva (Banda C)	27
3.3. Montagem e análise dos cariótipos	28
<u>4. RESULTADOS</u>	30
4.1. Caracterização citogenética: cariótipos, RON e Banda C.	30
4.2. Relativos à citotoxicidade: alterações cromossômicas	38
<u>5. DISCUSSÃO</u>	52
<u>6. CONCLUSÕES</u>	55
<u>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	56

LISTA DE GRÁFICOS, TABELAS E FIGURAS

<u>Figura 01</u> - Laboratório onde o bioensaio foi realizado, mostra as traíras durante o período de aclimação.	22
<u>Figura 02</u> - Detalhe mostrando um dos exemplares que participou do bioensaio.	32
<u>Tabela 01</u> - Das frequências absolutas dos números diplóides encontrados nos indivíduos que fizeram parte do bioensaio de exposição ao chumbo (II).	33
<u>Gráfico 01</u> - Das frequências relativas dos números diplóides encontrados nos indivíduos que fizeram parte do bioensaio de exposição ao chumbo (II).	33
<u>Figura 03</u> : Cariótipo montado para fêmeas e machos respectivamente, coletados na Fazenda Canguiri, 2n=42 (16 M+03 SM + 02 ST), NF=84.	34
<u>Figura 04</u> : Metáfases tratadas com nitrato de prata, mostrando o polimorfismo cromossômico das RONS.	35
<u>Figura 05</u> : Metáfases tratadas com nitrato de prata, mostrando o polimorfismo cromossômico das RONS.	36
<u>Figura 06</u> : Metáfases mostrando o padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva evidenciado pela banda C.	37
<u>Figura 07</u> : Metáfases com alterações estruturais, provenientes dos animais expostos que foram sacrificados no 18° dia.	39
<u>Figura 08</u> : Metáfases com alterações estruturais, provenientes dos animais expostos que foram sacrificados no 18° dia.	40
<u>Figura 09</u> : Metáfases com alterações estruturais, provenientes dos animais expostos que foram sacrificados no 18° dia.	41
<u>Figura 10</u> : Metáfases com alterações estruturais, provenientes dos animais expostos que foram sacrificados no 18° dia.	42
<u>Figura 11</u> : Metáfases com alterações estruturais, provenientes dos animais expostos que foram sacrificados no 18° dia.	43
<u>Figura 12</u> : Metáfases com alterações estruturais, provenientes dos animais expostos que foram sacrificados no 41° dia.	44
<u>Figura 13</u> : Metáfases com alterações estruturais, provenientes dos animais expostos que foram sacrificados no 41° dia.	45
<u>Figura 14</u> : Metáfases com alterações estruturais, provenientes dos animais expostos que foram sacrificados no 41° dia.	46
<u>Figura 15</u> : Metáfases com alterações estruturais, provenientes dos animais expostos que foram sacrificados no 41° dia.	47
<u>Figura 16</u> : Metáfases com alterações estruturais, provenientes dos animais expostos que foram sacrificados no 41° dia.	48
<u>Figura 17</u> : Metáfases com alterações estruturais, provenientes dos animais expostos que foram sacrificados no 41° dia.	49
<u>Figura 18</u> : Metáfases com alterações estruturais, provenientes dos animais expostos que foram sacrificados no 41° dia.	50
<u>Tabela 02</u> : Das frequências em que foram observadas metáfases com alterações cromossômicas provavelmente em resposta à exposição aguda ao TBT.	51

RESUMO

Foram analisados nove exemplares pertencentes a espécie *Hoplias* aff. *malabaricus* (BLOCH, 1794), família Erythrinidae; coletados na Fazenda Canguiri, município de Piraquara-PR (Primeiro Planalto Paranaense - Bacia do Rio Iguaçu). Estes exemplares foram utilizados em um bioensaio de exposição crônica por via trófica ao chumbo (II). Todos os exemplares foram analisados sobre duas óticas distintas, primeiramente se deu a análise das características citogenéticas da espécie e depois uma análise mais detalhada para a detecção de qualquer modificação causada por uma possível ação do chumbo. Na primeira análise; foram determinados o número diplóide modal de $2n= 42$ cromossomos ($16M + 3SM + 2ST$) e $NF=84$. Foram observadas RONS múltiplas variando em número e localização, sendo que a maioria se localiza nos telômeros, em alguns casos ambos os telômeros aparecem marcados e também foram visualizadas marcas duplas em apenas uma das cromátides do par 21, mostrando uma possível transposição de segmento após a duplicação do DNA. Quanto ao padrão de distribuição de heterocromatina constitutiva, a banda C evidenciou blocos pericentroméricos em quase todos os pares de cromossomos, grandes blocos teloméricos e marcas intersticiais bem evidentes no primeiro par de cromossomos e marcas teloméricas menores em alguns pares. A análise referente a detecção de modificações devido ao tratamento com o chumbo (II), foi feita com a observação e contagem de metáfases tratadas com a coloração convencional (Giemsa 5%). Foram observadas em um número bastante significativo de metáfases, nos indivíduos expostos ao Chumbo(II), macroalterações estruturais (deleções, double minutes, poliploidia e desestruturações dos cromossomos). Quando consideramos as análises feitas, torna-se evidente a necessidade de estudos mais aprofundados, com o aumento da amostra e utilização de técnicas mais apuradas para detecção das macroalterações, além de ser interessante uma análise das possíveis alterações microestruturais.

ABSTRACT

Nine animals from the species *Hoplias* aff. *malabaricus* (BLOCH, 1794), Erythrinidae were collected from Fazenda Canguiri, Piraquara - PR (Paraná's First Plateau - Iguaçú River Basin). They were used in a lead (II) trofic exposure bioassay. All the specimens were analysed from two different points of view, first the karyotypic structure of the species was analysed and then a more detailed analysis for detection of any alteration caused by lead exposure. In the first observation, diploid number obtained was $2n= 42$ chromosomes (16M + 3SM + 2ST) e FN=84. Multiple NORs were observed, with variation in number and position, telomeric regions was stained in several pairs, in some cases both telomeric regions were stained. The 21th pair of chromosomes was double marked in only one chromatid, indicating a possible transposition in this segment after the DNA's duplication. The hetecromatin pattern, showed some pericentromeric blocks in almost all chromosomes, large telomeric blocks in the first pair of metacentric chromosomes and small telomeric blocks in some pairs. The chromosomal aberration detection analysis, was performed with observation and counting of metaphasis stained with Giemsa 5%. As result, structural macroalterations was detected (delections, double minutes, poliploidy and problems in spiralization of DNA) in exposed animals in significant number of metaphasis. Considering the analysis, is quite obvious the necessity of a more detailed study, increasing the sample and using anothers techniques for detection of possible alterations in the microstructure of chromosomes.

1. INTRODUÇÃO

1.1 IMPORTÂNCIA DOS ESTUDOS CITOGENÉTICOS EM PEIXES

A citogenética de peixes teve sua origem em 1943 com o trabalho de WICKBOM, sobre o cariótipo de algumas espécies de Cyprinodontiformes. Porém, foi apenas a partir dos anos 70, com a utilização da técnica de suspensão de células e secagem ao ar, que outras espécies como *Symbranchus marmoratus*, tiveram seu número cromossômico descrito. Modificações nos métodos diretos de obtenção de metáfases (BERTOLLO *et al.*, 1978), nos métodos de cultura de linfócitos (FENOCCHIO & BERTOLLO, 1988) e nos métodos de cultura de curto tempo de tecidos sólidos (FENOCCHIO *et al.*, 1991) levaram a citogenética a um maior desenvolvimento, já que permitiram uma melhor análise com o aumento da quantidade e da qualidade das metáfases visualizadas. Devido a estas modificações e outras que se sucederam, atualmente o estudo citogenético abrange um número bem maior de espécies. Até o presente momento são conhecidos os cariótipos em coloração convencional (Giemsa) de 706 espécies, 207 gêneros e 38 famílias de peixes de águas continentais (OLIVEIRA *et al.*, para revisão, 1996). Porém, apesar do número de espécies analisadas ter aumentado significativamente nas últimas décadas, as análises citogenéticas mais aprofundadas foram feitas em peixes do Hemisfério Norte, faltando este tipo de análise para a grande maioria das espécies tropicais e neotropicais. De fato, o número de espécies neotropicais já descritas citogeneticamente está muito aquém do número existente, sejam elas de águas continentais ou marinhas.

A bacia do Rio Iguaçu apresenta uma ictiofauna com considerável taxa de especiação, sendo considerada um importante centro de endemismo, mesmo que as estruturas de suas comunidades e populações ainda não estejam completamente elucidadas. HASEMAN (1911) estimou a ictiofauna da Bacia em 25

espécies, tendo descrito 11 das mesmas. SAMPAIO (1988) estudou a Família Characiformes da Bacia do Rio Iguçu e descreveu 9 espécies novas (6 do gênero *Astyanax*, 2 do gênero *Characidium* e 1 do gênero *Bryconamericus*). Atualmente acredita-se que a ictiofauna é composta por pelo menos 47 espécies, distribuídas em 35 gêneros e 15 famílias. Destas, 33 espécies (70%) e dois gêneros (6%) são endêmicos; 11 espécies (23%) são comuns a outras bacias e 3 (6%) são exóticas.

O estudo citogenético mostra-se importante como ferramenta na caracterização diagnóstica de espécies (taxonomia), nas inferências de parentesco (relações evolutivas) entre as espécies de um gênero ou família e como um novo campo de análise auxiliando nos estudos de ecotoxicologia. Os estudos citogenéticos utilizam dados obtidos a partir de dois diferentes níveis de análise:

- um nível mais básico, que leva em conta os números diplóides ($2n$), a morfologia dos cromossomos (NF), os sistemas de determinação sexual e a descrição e localização de marcadores citogenéticos (banda C e RONS)
- um nível mais apurado de análise, que envolve a utilização de bandamento de alta resolução e técnicas de citogenética molecular.

O padrão morfológico do cariótipo pode ser considerado como uma característica resultante dos processos evolucionários. Evidências sobre este fato podem ser obtidas considerando-se a existência de alguns grupos de peixes onde os padrões cromossômicos se mantêm inalterados e outros grupos que possuem padrões cromossômicos extremamente distintos, mesmo em se tratando de espécies relacionadas (BENAZZI *apud* ALMEIDA-TOLEDO, 1998).

Considerando-se o conjunto total de dados obtidos com o estudo citogenético dos peixes neotropicais até o presente momento, nota-se que estes podem ser separados quanto ao grau de variabilidade cromossômica em pelo menos três conjuntos distintos; um conjunto que pode ser caracterizados pelo

número cromossômico e fórmula numérica apresentando grande constância, outro onde o grau de variação cariotípica pode ser considerado mediano e ainda. Um outro conjunto que apresenta alto grau de variabilidade cromossômica.

Pode-se utilizar como exemplo para grupos de peixes que apresentam grande similaridade entre seus cariótipos, os integrantes das famílias Anostomidae, Curimatidae, Hemiodontidae, Parodontidae e Prochilodontidae. Das 53 espécies já analisadas citogeneticamente, 50 apresentam $2n=54$ com todos os cromossomos com dois braços. Enquanto que outros grupos, com, *Eigenmannia* e *Hoplias*, acumularam um grande número de mudanças estruturais ao longo da sua diversificação, de forma que mesmo espécies proximamente relacionadas possuem cariótipos com alto grau de diferenciação. Estas formas opostas de apresentação cariotípica podem estar relacionadas com a vagilidade da espécie e o tamanho das populações em que estas se organizam (GALETTI *apud* ALMEIDA-TOLEDO, 1998).

No entanto a estrutura populacional não pode ser considerada como a única responsável pela estrutura cariotípica, esta pode ser explicada também pela ortoseleção cariotípica proposta por WHITE (1973), onde considera que espécies que possuem uma mesma estrutura cromossômica devem ter passado por um processo de canalização. Este processo estaria relacionado a: 1) possibilidade de que mudanças cromossômicas do mesmo tipo possuam o mesmo efeito fisiológico ou 2) a existência de uma possível correlação entre o tamanho e forma dos cromossomos e a dimensão das células do indivíduo (*op. cit.*).

1.2. ASPECTOS GERAIS DE *Hoplias aff. malabaricus* (BLOCH, 1794)

A classificação sistemática da espécie:

FILO CHORDATA

SUBFILO VERTEBRATA

SUPERCLASSE PISCES

CLASSE OSTEICHTHYES

SUBCLASSE ACTINOPTERYGII

INFRACLASSE NEOPTERYGII

DIVISÃO TELEOSTEI

SUBDIVISÃO EUTELEOSTEI

SUPERORDEM OSTARIOPHYSI

SÉRIE OTOPHYSI

SUBSÉRIE CHARACIPHYSI

ORDEM CHARACIFORMES

FAMÍLIA ERYTHRINIDAE

GÊNERO *Hoplias* - ESPÉCIE *Hoplias aff. malabaricus*

Os peixes pertencentes a ordem CHARACIFORMES, quase sempre apresentam dentes bem desenvolvidos (geralmente carnívoros); a nadadeira adiposa está presente na maioria dos casos; o corpo apresenta-se sempre recoberto por escamas (a ausência de escamas é muito rara, ocorrendo somente em poucas espécies sulamericanas); a mandíbula superior raramente é verdadeiramente protátil; dentes na faringe estão freqüentemente presentes, mas não especializados como em Cypriniformes; barbelas ausentes; o primeiro hypural é separado do centrum por uma fenda nos adultos (NELSON, 1994).

Existem discordâncias entre os sistematas quanto ao número de famílias que compõem a ordem, alguns consideram-na como uma família única, outros dividem-na em até 16 famílias, porém a divisão mais aceita atualmente é em 10 famílias. A origem monofilética de muitas famílias é incerta e as interrelações destas são pouco conhecidas. Existe uma grande diversidade de formas, sendo

provavelmente comum, as múltiplas origens independentes de caracteres e a evolução paralela de linhagens (NELSON, 1994.).

A família ERYTHRINIDAE possui ampla distribuição na América do Sul, habitando exclusivamente águas continentais. Os membros dessa família possuem a boca bem fendida (grande abertura) que se estende posteriormente até a margem anterior da órbita, são predadores muito eficientes. Alguns apresentam respiração aérea facultativa e podem mover-se pela terra entre poças de água. O comprimento máximo aproximado é de 1,0m, observado em *Hoplias macropthalmus* das Guianas. Esta família é composta por três gêneros: *Erythrinus*, *Hoplerythrinus* e *Hoplias*, com pelo menos dez espécies (*op. cit.*).

O gênero *Hoplias* aparece no registro fóssil (dentes e mandíbulas) a partir do Mioceno médio (ca. 10 Ma) no Equador, Peru e Colômbia (ROBERTS, 1975; LUNDBERG, 1997 *apud* LUNDBERG, 1998), existem, no entanto, registros que datam do final Cretáceo/início do Paleoceno de fósseis que se assemelham muito aos integrantes da família Erythrinidae, com pelo menos um, assemelhando-se muito ao padrão do gênero *Hoplias*. Estudos filogenéticos efetuados com a família Erythrinidae (OYAKAWA *apud* LUNDBERG, 1998) concluiu que os gêneros *Erythrinus* e *Hoplerythrinus* formam o clado irmão de *Hoplias* (proposto de ser dividido em três gêneros).

H. malabaricus apresenta a língua provida de placas com dentículos; crânio sem fontanela; boca prognata; pré-maxilar com dentes cônicos e caninos; estes últimos são tipicamente recobertos anteriormente por pregas labiais e nadadeira adiposa ausente (AGOSTINHO & GOMES, 1997).

As traíras (*H. malabaricus*) são peixes com ampla distribuição geográfica, que abrange quase todas as bacias desde a América Central ao Rio Colorado (na Argentina) e apresentam diferentes áreas de endemismo. Habitam preferencialmente ambientes lênticos, apresentando comportamento

territorialista (LOPES & FENOCCHIO, 1994). São onívoros, com uma dieta que compreende microcrustáceos, algas e insetos aquáticos, durante o primeiro ano do desenvolvimento. Após este período (normalmente após alcançarem 12 cm de comprimento) tornam-se estritamente carnívoros, alimentando-se preferencialmente de peixes. Os lambaris (*Astyanax* sp) são os itens alimentares preferenciais; porém, em situações de pouca abundância de presas, enriquecem a sua dieta com outros itens, como crustáceos por exemplo, estas presas alternativas tanto podem ser animais que habitam a coluna de água quanto animais bentônicos (LOUREIRO, 1995).

Quanto a estratégia reprodutiva *H. malabaricus* pode ser classificada como de fecundação externa, não-migradora e com cuidado parental. Possuem ovócitos relativamente grandes, baixa fecundidade e desova predominantemente parcelada, tendo início no mês de novembro e estendendo-se até fevereiro/março, este tipo de estratégia garante o sucesso desta espécie nos ambientes em que é encontrada (AGOSTINHO *et al.*, 1999 *apud* LOWE- McCONNEL, 1999).

1.3. ASPECTOS CITOGENÉTICOS DE *Hoplias aff malabaricus*

Dentre as espécies da família Erythrinidae, *Hoplias aff. malabaricus* foi a mais extensivamente estudada citogeneticamente. Já nos primeiros estudos realizados (BERTOLLO, 1978) foram descritos vários polimorfismos cromossômicos. Desde então os registros de novas variações no número e morfologia dos cromossomos têm surgido adicionando-se a estas variações, os diferentes sistemas sexuais já encontrados.

A ampla distribuição geográfica destes peixes e possíveis isolamentos são fatos que ajudam a explicar as diferenciações cromossômicas numéricas e/ou estruturais. Tais diferenças poderiam se estabelecer dando origem a

polimorfismos interpopulacionais que, chegando a citótipos tão diversos, caracterizariam o isolamento reprodutivo. Os peixes de diferentes bacias hidrográficas apresentam comumente diferentes citótipos, estes dados indicam que possivelmente o que tratamos como sendo a espécie *H. malabaricus* seja na verdade um complexo de espécies. Porém não foram ainda encontradas diferenças morfométricas, ecológicas ou comportamentais que corroborem tais diferenças cariotípicas, tornando a revisão da espécie muito difícil.

A seguir uma listagem dos citótipos já detectados para o complexo:

- 2n=42 para ambos os sexos, não apresentando sistema de determinação sexual, encontrado em exemplares do Rio Aguapey (Corrientes, Argentina) (LOPES & FENOCCHIO, 1994) e Alto Iguaçu (São Mateus do Sul, PR) (CESTARI, 1998).
- 2n=42 para ambos os sexos, sistema de determinação sexual do tipo XX/XY, encontrado em exemplares do Vale do Rio Doce (MG) e Rio Juquiá (SP) (BERTOLLO *et al.*, 1979), na Lagoa Varjão II e Lagoa Beija-Flor (Luiz Antônio-SP) (SCAVONE *et al.*, 1994) e no Alto Iguaçu (São José dos Pinhais-PR) (LEMOS & CESTARI, 1999).
- 2n=40 para ambos os sexos, sem sistema de determinação sexual, encontrado em exemplares do Rio Paraná (Misiones, Argentina) (LOPES & FENOCCHIO, 1994), do Rio Negro (AM) e do Rio Miranda (MS) (BERTOLLO *et al.*, 1980) e Rio São Francisco (MG) (DERGAM & BERTOLLO, 1990).
- 2n=40 para fêmeas e 2n=39 para machos, com sistema sexual do tipo $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$, encontrado em exemplares do Rio Piracicaba (Piracicaba-SP), do Rio Três Pontes (Novo Horizonte-SP), Rio Passa Cinco (Ipeúna-SP), Lagoa VarjãoII e Lagoa Beija-Flor (Luiz Antônio-SP) (SCAVONE *et al.*, 1994); Reserva Monjolinho (São Carlos-SP) e Rio Mogi-

Guaçu (SP) (BERTOLLO *et al.*, 1997); Reserva do Lobo (Itarapina-SP) (BERTOLLO & MESTRINER, 1998).

- 2n=40 para fêmeas e 2n=41 para os machos, com sistema sexual do tipo XX/XY₁Y₂, encontrado em exemplares do Rio Aripuanã (MT) (BERTOLLO *et al.*, 1983).

Diferentes organismos e células de um mesmo organismo são dotadas de variações no número de nucléolos. A situação mais comum é existirem dois nucléolos em uma célula diplóide. O nucléolo contém RNA ribossômico, sendo este um importante componente dos ribossomos e também grandes alças de DNA que emanam de vários cromossomos, cada uma das quais contendo um grupamento de genes de rRNA, estes grupamentos são conhecidos como regiões organizadoras de nucléolos (RONs) e possuem localizações mais ou menos específicas no genoma, variando segundo o organismo analisado.

Os trabalhos feitos com *H. malabaricus* para a caracterização das regiões organizadoras de nucléolos, constataram a presença constante de RONs múltiplas, variando de duas a oito o número de regiões marcadas. Esta variação se apresenta de forma intrapopulacional e intraindividual, mostrando que o polimorfismo de RONs é traço comum a este grupo de peixes (DERGAM & BERTOLLO, 1990; JORGE, 1995; CESTARI, 1998, entre outros).

Quando um cromossomo é tratado segundo a técnica da banda C, revela-se visualmente regiões distintas com diferentes características de coloração. As regiões densamente coradas são designadas como heterocromatina, denomina-se de eucromatina as regiões fracamente coradas. Supõe-se que esta distinção reflita diferenças no grau de compactação do DNA no cromossomo. A heterocromatina pode ser constitutiva ou facultativa. O tipo constitutivo é um aspecto permanente de uma localização cromossômica específica sendo, neste

sentido, uma característica hereditária. O tipo facultativo pode estar presente ou não em qualquer localização cromossômica particular. Os padrões de hetero e eucromatina ao longo de um cromossomo constituem bons marcadores citogenéticos. As regiões heterocromáticas são em grande parte geneticamente inertes.

Em *H. malabaricus* observa-se a presença de pequenos blocos teloméricos em um dos braços de alguns cromossomos, algumas marcações biteloméricas foram detectadas (DERGAM & BERTOLLO, 1990; JORGE, 1995). Nos exemplares que apresentam sistemas sexuais é comum observar a presença de grandes blocos de heterocromatina nos cromossomos sexuais, evidenciando na maioria das vezes as inversões que originaram estes cromossomos (BERTOLLO *et al.*, 1997).

Outras técnicas com a finalidade de ajudar no pareamento dos homólogos, também já foram utilizadas com a traíra, como por exemplo a banda G. Esta é comum na análise cariotípica de mamíferos e é pouco utilizada em peixes por não apresentar bons resultados, isto provavelmente por diferenças na própria estrutura dos cromossomos destes animais.

1.4. IMPORTÂNCIA DOS ESTUDOS SOBRE CITOTOXICIDADE

Os estudos sobre a citotoxicidade são de enorme importância por permitir a avaliação das respostas dos organismos sob contaminação, o impacto e o efeito de agentes tóxicos sobre os tecidos e as células, podendo-se ainda inferir sobre os tipos de perturbações metabólicas que os xenobiontes podem causar (MANAHAN, 1999).

Os ambientes aquáticos recebem uma enorme quantidade de dejetos, tendo sido considerados por muito tempo como locais apropriados para a liberação de uma variada gama de resíduos produzidos pela sociedade humana. Até recentemente acreditava-se que os oceanos possuíam uma capacidade quase

infinita de absorver tais resíduos. A descarga de esgoto humano e lixo dentro dos corpos d'água é ainda prática comum em várias partes do globo terrestre, sendo importante ressaltar que tal prática ocasiona a liberação de vários componentes tóxicos no ambiente aquático (JOBILING, 1995).

Segundo o "Chemical Abstract Service's Registry of Chemicals" (*apud* OLIVEIRA RIBEIRO, 1998¹) existem mais de 9 milhões de componentes químicos registrados e estima-se que 75 a 80 mil sejam diariamente utilizados. Quando estes compostos chegam aos corpos d'água são freqüentemente transferidos para as cadeias tróficas e podem mostrar seus efeitos em locais afastados da origem e depois de um grande intervalo de tempo. Os estudos sobre estes contaminantes são ainda muito escassos em organismos neotropicais, sendo que a grande maioria dos trabalhos realizados se concentram na análise de organismos do Hemisfério Norte.

Da miríade de compostos tóxicos a que a maioria dos ecossistemas aquáticos está exposta, apenas uma pequena porção já foi estudada e estes estudos não foram realizados de maneira mais aprofundada, limitando-se muitas vezes ao relato da quantificação do contaminante na água, no sedimento e em porções de tecido. Não que esta análise seja de pouca importância, mas são necessários estudos mais amplos que envolvam várias áreas do conhecimento como a ecologia, fisiologia, histologia, biologia molecular e a genética.

A falta de estudos mais aprofundados é fonte de grande preocupação, pois com tantos contaminantes disponíveis no meio ambiente, pode-se pensar que pelo

¹ Texto não publicado e comunicação pessoal. O Prof. Dr. *Ciro A. OLIVEIRA RIBEIRO* trabalha com ecotoxicologia, metais pesados e compostos organometálicos derivados (como o mercúrio e o TBT) no Departamento de Morfologia (Biologia Celular) desta instituição.

menos uma pequena parcela chega ao topo das cadeias alimentares, podendo atingir os seres humanos.

1.5. A TOXICIDADE DOS METAIS PESADOS

Alguns metais como o chumbo, por exemplo, são, invariavelmente, tóxicos ao funcionamento da célula enquanto outros, como o cobre, o zinco e o ferro são considerados elementos essenciais à vida e não são considerados agentes tóxicos, quando ocorrem em baixas concentrações (MANAHAN, 1999). Porém esses mesmos metais podem adquirir propriedades tóxicas, quando em interações que excedem em qualidade ou quantidade, as necessidades metabólicas da célula. Sob certas situações o metal não contamina a célula mas torna-se elemento integral do seu funcionamento, portanto o termo tóxico, atribuído a certos metais, deve ser utilizado com cautela, já que podem existir diferentes situações de contaminação por estes elementos.

Em relação à toxicidade dos metais pesados, deve-se considerar ainda que a presença e a biodisponibilidade, de dois ou mais deles no ambiente, pode estabelecer, dois a dois, casos de antagonismo ou sinergismo relacionados a fatores como tempo de exposição, efeitos deletérios para indivíduos ou populações e taxas de absorção, acúmulo e desintoxicação (PAIN, 1995; LANDIS & YU, 1995).

Vários estudos e levantamentos alertam para a presença destes elementos em ecossistemas aquáticos, bem como à contaminação dos organismos que neles habitam, implicando em sérias consequências, pois tais elementos agem sobre o metabolismo dos seres vivos impossibilitando certas vias metabólicas e influenciando a integridade celular. Metais pesados freqüentemente estão associados à casos observados de bioacumulação nos organismos e de

biomagnificação em cadeias tróficas. Na maioria dos casos os metais pesados não são eliminados totalmente pelos organismos (TESSIER & TURNER, 1995).

1.6. DISPONIBILIDADE DO CHUMBO NO AMBIENTE

O chumbo (Pb) é um metal pesado, elemento da família 4A da tabela periódica ($6p^2$); tem massa atômica equivalente a 207,2 e possui 82 elétrons em seu estado elementar; tem eletronegatividade de 1,8 e.v. e seu ponto de fusão é relativamente baixo (327°C), o que permite sua extração fácil do minério, através do uso de calor. É um importante constituinte de mais de 200 minerais. O chumbo ocorre naturalmente em oito formas isotópicas, das quais quatro são estáveis e quatro são radioativas. Os isótopos estáveis, Pb-206, Pb-207 e Pb-208, são respectivamente, os produtos finais da série de decaimento radioativo do urânio, actínio e tório; o Pb-204, também estável, não possui precursores radioativos naturais.

Por ser de extração fácil o chumbo tem sido aproveitado pelos humanos a milênios. Existem registros de aproximadamente 7000 anos do uso de chumbo pelos egípcios na confecção de pesos e âncoras, utensílios de cozinha e soldas. Os romanos também utilizavam extensivamente o chumbo. A solubilização do chumbo em recipientes para cozimento, utilizados na confecção do xarope de uva para a produção de vinho e para a preservação de frutas, pela aristocracia da época, pode ter sido uma das principais causas do declínio da cultura romana, que teve início no século V d.C. A alta concentração deste metal em ossos exumados de indivíduos pertencentes a aristocracia romana endossam esta hipótese (PAIN, 1995).

O chumbo pode ser encontrado naturalmente em todos os meios (água, ar e solo), sendo eliminado na atmosfera durante erupções vulcânicas, existindo como elemento constituinte de várias rochas que através do desgaste por

intemperismo acabam originando a camada superior do solo, como produto final do decaimento radioativo de vários elementos, sendo encontrado, também, em corpos d'água, no sedimento e em baixíssimas concentrações em suspensão, como parte do processo natural de desgaste das rochas e posterior transporte. No entanto a concentração deste metal globalmente tem aumentado significativamente nos últimos séculos, a partir da Revolução Industrial (PAIN, 1995).

Emissões atmosféricas do chumbo resultantes de atividades humanas são estimadas como sendo pelo menos duas vezes maiores que as provenientes de fontes naturais. As mais importantes fontes de emissão atmosférica são resultado da produção de compostos tetralquilados de chumbo (chumbo tetrametilado -TML e chumbo tetraetilado -TEL), evaporação e eliminação de porções não degradadas destes através dos canos de escape da grande maioria dos automóveis. Estes compostos orgânicos do chumbo são utilizados como aditivo na gasolina impedindo a ignição espontânea do combustível em presença do ar sob pressão no interior dos motores. As emissões provenientes da atividade industrial produzem um maior impacto nas cercanias de minas de extração de chumbo e de outros metais, fundições primárias e secundárias, e outras indústrias que produzem, usam ou reciclam produtos que contenham chumbo na sua composição (PAIN, 1995).

A liberação do chumbo nos oceanos pelas indústrias é pelo menos 2,6 vezes maior atualmente do que no período pré-industrial. Acredita-se que as maiores concentrações do metal, ocorram nas águas continentais, principalmente nas proximidades de grandes centros urbanos. As fontes mais comuns de contaminação incluem a deposição seca e úmida do chumbo presente na atmosfera, que tem influência global, e fontes mais restritas como os esgotos domésticos e industriais não tratados.

A utilização de tintas contendo pigmentos derivados de compostos de chumbo (por exemplo: carbonato de chumbo - pigmento de cor branca, monóxido de chumbo - pigmento amarelo e pigmentos vermelhos originados da oxidação do monóxido de chumbo) tem diminuído substancialmente nos últimos anos devido ao reconhecido perigo de envenenamento.

1.6.1. CHUMBO: METABOLISMO E EFEITOS

O chumbo não é um elemento essencial em organismos e é considerado altamente tóxico, sendo que todos os seus efeitos conhecidos, em sistemas biológicos, são deletérios. Pode existir no meio ambiente na forma inorgânica, como íons Pb^{2+} e Pb^{4+} (menos freqüente) e na forma orgânica, complexado covalentemente a compostos de carbono ($Pb-C-R_3$). A forma inorgânica é menos tóxica que a orgânica, já que usualmente a membrana plasmática apresenta-se mais permeável ao organometal (lipossolúvel) (PAIN, 1995).

Os organismos aquáticos são contaminados principalmente através da água e por via trófica, com o metal sendo absorvido pela pele, brânquias e intestino. Fatores ambientais como por exemplo a dureza da água e o seu pH, parecem influenciar a disponibilidade do chumbo. A concentração de chumbo em certos teleósteos, como *Lepomis gibbosus* e *Salmo gairdneri*, parece aumentar conforme o pH da água diminui (PAIN, 1995). Efeitos tóxicos do chumbo em animais aquáticos variam de acordo com a espécie considerada, o tempo e modo de exposição, o desenvolvimento de tolerância fisiológica e os teores de metal. A tolerância fisiológica ao metal pode ser adquirida pelo indivíduo ou controlada por expressão gênica hereditária. (*op. cit.*).

Em peixes (*Pleuronectes platessa*, sob baixos teores de chumbo na água, já foram observados efeitos subletais a 7 $\mu\text{g/l}$ e inibição da atividade de enzimas hematopoiéticas a 10 $\mu\text{g/l}$. Sob altos teores, há relatos de anemia, redução na

eclosão dos ovos, escurecimento da região dorso-caudal e curvatura lateral da espinha. Em doses letais o Pb aumenta a produção de muco, o que obstrui as brânquias, matando por anoxia. (PAIN, 1995).

Não foram encontradas evidências plausíveis de biomagnificação, ou acúmulo crescente de chumbo por estágios ascendentes de cadeias tróficas (PAIN, 1995). De outra forma, VIGH (1981) demonstrou com um sistema laboratorial de fluxo contínuo, que os níveis tróficos analisados (alga-crustáceo, planctônico-peixe) em ascendência, não acumulavam chumbo em correlação positiva. Contudo o mesmo trabalho indica que o nível mais elevado da cadeia experimental que envolveu três espécies, ou seja, o peixe *Poecilia reticulata* acumulou mais chumbo pela via trófica que pela hídrica.

Conclui-se que dados obtidos *in natura*, quando isolados, são ineficazes para a constatação de biomagnificação. Isto porque a absorção do chumbo pode não se dar exclusivamente por via trófica.

Experimentos indicam que animais jovens absorvem muito mais chumbo pelo trato digestivo que os adultos. Fatores de dieta, como baixos teores de cálcio, deficiência de vitamina C e ferro podem realçar a absorção do chumbo pelo trato digestivo (MERIAN, 1991). Uma vez absorvido pelo epitélio, o chumbo é distribuído pelo organismo através da corrente sanguínea. Os órgãos apresentam afinidade diferenciada pelo chumbo. No sangue humano mais de 95% do chumbo encontrado está associado aos eritrócitos, principalmente à hemoglobina. A quantidade de chumbo em um organismo (dados relativos a humanos e a alguns mamíferos) pode ser dividido em três frações:

- No sangue e nos tecidos moles com rápida renovação: meia-vida média de 19 dias.
- Tecidos moles e ossos com rápida renovação: meia-vida média de 21 dias.
- Ossos do esqueleto: meia-vida média de 10 a 20 anos (MERIAN, 1991).

O chumbo não absorvido pelo epitélio intestinal é eliminado nas fezes (o chumbo orgânico é mais facilmente eliminado que o inorgânico). A porção de chumbo que é absorvida, tanto pelo epitélio intestinal quanto pelo epitélio respiratório, e não é acumulada, é excretada principalmente na urina, via filtração glomerular nos rins. Outras formas de excreção já foram relatadas, como por exemplo, secreção gastrointestinal, suor e leite (no caso dos mamíferos).

BAATRUP (1991) comenta sobre o efeito neurotóxico do Pb^{++} , com alteração dos teores normais de neurotransmissores, em peixes expostos de forma crônica. Efeitos do chumbo no sistema nervoso de animais podem estar relacionados com alterações de comportamento, afetando a alimentação, a reprodução ou a migração dos indivíduos. Outros órgãos ou sistemas de um organismo podem sofrer alterações por exposição ao chumbo inorgânico. Disfunções renais crônicas ou agudas podem ocorrer, em resposta a: danos nos túbulos proximais, decréscimo da reabsorção tubular, arterioesclerose local, fibrose intersticial, atrofia glomerular e degeneração hialina dos vasos associados. O Pb^{++} também está associado a alterações cardiovasculares, como o aumento da pressão arterial. Os sistemas endócrino, hematopoiético e imunológico podem ser afetados. (MERIAN, 1991).

1.6.2. EFEITOS CELULARES:

O chumbo é um contaminante não específico que age em nível molecular levando a inibição de várias enzimas necessárias a manutenção da homeostase celular. Podem-se citar alterações na atividade catalítica da aminoacil-t-RNA-sintetase de peixes (NICHOLLS *et al.*, 1989), inibição da atividade de muitas enzimas envolvidas com a produção do grupo heme, levando a diminuição da atividade catalítica de várias outras enzimas, como por exemplo: a mioglobina,

citocromos, catalase e a hemoglobina. Os problemas com esta última leva a um sintoma da contaminação com o chumbo comumente observado em vários vertebrados, inclusive em peixes, que é a anemia.

Em relação a outros metais, como o mercúrio e o cobre, o chumbo inorgânico tem restrita movimentação através de membranas biológicas. Isto se deve à baixa solubilidade dos sais de chumbo, com freqüente formação de precipitados, como $Pb(OH)^+$ e $PbHCO_3^+$. Foi portanto sugerido que, em peixes, há um menor acúmulo de chumbo, relativo àqueles dos outros metais citados (BAATRUP, 1991).

O chumbo causa diversos danos à regulação celular das condições oxidativas normais, inibindo a ação de diversas enzimas responsáveis pela eliminação celular de compostos de oxigênio parcialmente reduzidos, como p.ex., o superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e a hidroxila (OH^-). Devido a sua reatividade, esses compostos são altamente tóxicos à célula, podendo promover oxidações (quebras) de vários componentes celulares.

Caso um destes componentes seja o DNA, o risco de mutagenicidade por exposição ao metal, pode ser iminente. Vários estudos mostram que aberrações cromossômicas podem ser encontradas em populações expostas ao chumbo, em concentrações que variam de 10 a 100 μg por ml de sangue. Este efeito genotóxico resulta, provavelmente, não da interação direta do metal com o DNA, mas sim de distúrbios na atividade enzimática que prejudicam os mecanismos de replicação, transcrição e reparação do material genético.(MERIAN, 1991).

Uma reação celular característica da intoxicação com chumbo observada em vários experimentos, é a formação de corpos de inclusão intranucleares densamente corados, principalmente nas células do fígado e rim. Estas inclusões mostram-se sempre independentes do nucléolo. Através de estudos histoquímicos e de análise direta após tais estruturas terem sido isoladas sugere-se que tais

corpos sejam formados por proteínas nucleares provavelmente não-histônicas, ricas em grupos sulfidril, complexadas com o chumbo, aproximadamente 50 μg de chumbo por mg de proteína. Estas proteínas possuem grandes quantidades de ácido aspártico e glutâmico, glicina, cistina e triptofano (GOYER *et al.*, 1974).

O mesmo autor sugere ainda que tais corpos de inclusão servem de mecanismo adaptativo e de proteção durante o transporte transcelular do metal, mantendo uma concentração citoplasmática relativamente baixa, reduzindo seu efeito sob funções importantes para a manutenção da homeostase, como por exemplo, a respiração mitocondrial e a síntese protéica.

Apesar do chumbo estar presente no núcleo complexado a proteínas, o seu efeito nas funções nucleares é ainda incerto. Estudos mostram que a presença de chumbo no núcleo estimula a síntese do DNA e a proliferação celular no rim de ratos, levando a crer que a exposição crônica deve desencadear processos carcinogênico.

A exposição excessiva a este metal produz alterações cromossômicas no homem e em animais de laboratório, dentre elas tetraploidias, anormalidades mitóticas e quebras envolvendo normalmente apenas uma das cromátides (MURO & GOYER, 1969 *apud* GOYER, 1974). Em trabalhadores expostos ao chumbo por risco ocupacional, foram observadas além das alterações supracitadas, defeitos de adesão e condensação dos cromossomos além de aumento do índice mitótico.

Somando-se à associação a proteínas nucleares insolúveis, responsáveis pela formação dos corpos de inclusão, o chumbo também pode se associar a proteínas ácidas solúveis em NaOH, este tipo de proteína está envolvida na regulação e replicação do DNA e influencia a síntese de RNA DNA-dependente. Algumas informações tais como, a observação de polirribossomos desagregados e a despolicimerização *in vitro* de RNA purificado de *E. coli* em presença do chumbo,

levam a crer que este pode afetar a síntese protêica no nível dos ribossomos (GOYER, 1974).

2. OBJETIVOS

CARACTERIZAR cromossomicamente exemplares da espécie *Hoplias* aff. *malabaricus* (traíra) pela coloração convencional em Giemsa (macroestrutura), pelas regiões organizadoras de nucléolos (RONS) e pelo padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva (Banda C).

COMPARAR os dados cariotípicos obtidos de exemplares não expostos ao chumbo (Pb^{++}), com aqueles obtidos após a realização do bioensaio de exposição crônica por via trófica ao metal.

CONSTATAR as alterações que por ventura houverem nos cromossomos e correlacioná-las às dosagens de chumbo a que os peixes foram expostos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

Foram analisados nove exemplares da espécie *Hoplias aff. malabaricus* (BLOCH, 1794) coletados em tanques de represas artificiais na Fazenda Canguiri- UFPR, no município de Piraquara-PR (Bacia do Rio Iguaçu - Primeiro Planalto Paranaense). Esta espécie foi escolhida por apresentar fácil adaptação e manutenção nas condições laboratoriais e por ser um predador de hábito alimentar piscívoro, representando assim um nível trófico elevado dentro das cadeias alimentares dos ecossistemas aquáticos.

Após a coleta os animais foram mantidos em aquários individuais de 20 litros por um período de aclimatação de no mínimo 20 dias, com temperatura e aeração controladas. A alimentação foi efetuada com exemplares vivos de *Cyprinus sp.* (carpa) a cada 5 dias (120 horas).

Decorrido o período de aclimatação, os exemplares foram utilizados em um teste de bioensaio onde foram expostos ao chumbo (II) (figura 1) via alimentação (exposição trófica). A solução estoque do chumbo foi obtida a partir do sal nitrato de chumbo ($PbNO_3$) no Laboratório de Bioensaios do depto. de Biologia Celular.

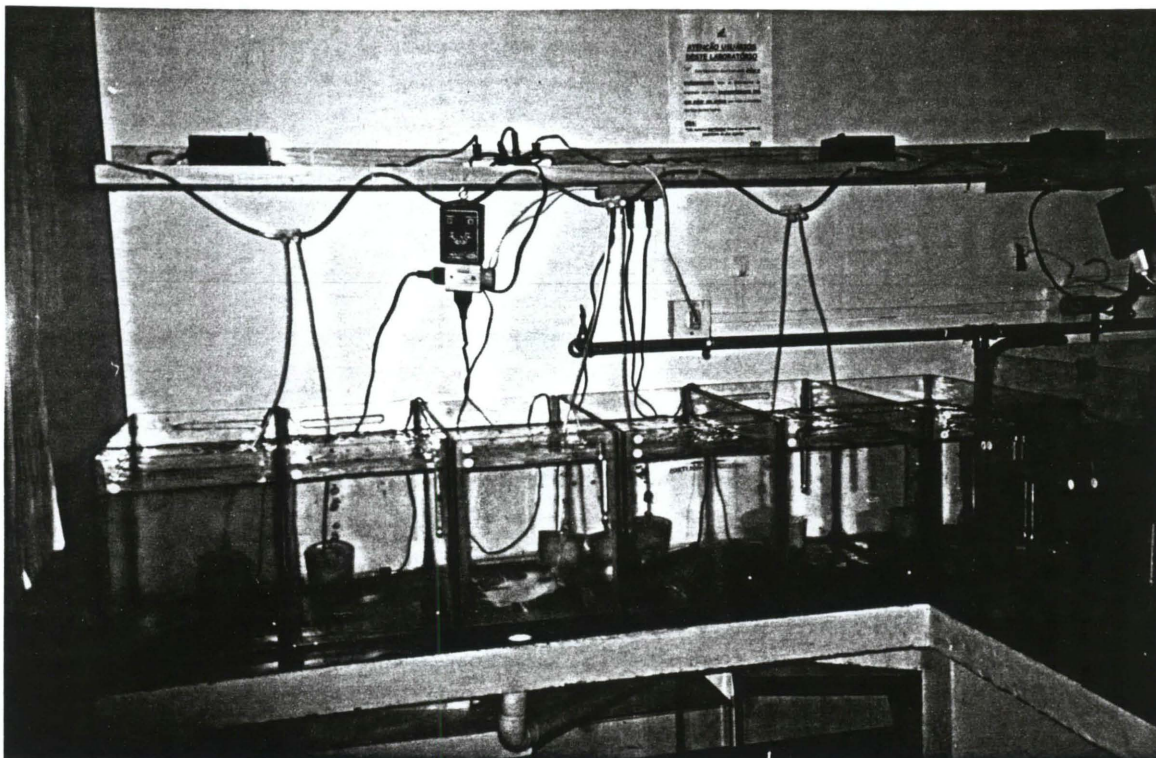


Figura 1: Laboratório onde o bioensaio foi realizado, mostra as traíras durante o período de aclimação

3.2. MÉTODOS

3.2.1. DAS COLETAS

Os animais foram coletados com auxílio de:

→ *Rede de arrasto de malha 1,2 cm entre nós*

3.2.2. DA OBTENÇÃO DO MATERIAL BIOLÓGICO

Dos nove exemplares de *H. malabaricus* que fizeram parte do bioensaio, três foram utilizados como controle, sendo alimentados com carpas a cada 120 horas às quais receberam intraperitonealmente apenas água destilada. Os seis outros indivíduos foram expostos ao xenobionte, alimentados da mesma forma descrita anteriormente, onde as carpas serviram de veículo para a dosagem: 21 ($\mu\text{g Pb/g}$ traíra a cada 120h). Três animais expostos foram sacrificados 18 dias (4 doses) após o início do bioensaio e os outros (3 controles e 3 expostos) no 41º.dia (8 doses).

Após o sacrifício dos animais, anteriormente anestesiados com MS 222, alguns órgãos foram retirados para análise morfológica. O rim anterior, que é de interesse à citogenética, foi dividido, sendo o tamanho do bloco de tecido utilizado de aproximadamente 3 mm^3 , e colocado em meio de cultura RPMI.

As gônadas foram identificadas no momento de retirada dos órgãos, sendo que cada animal teve o seu sexo determinado e catalogado. A seguir o material foi processado para obtenção das metáfases mitóticas conforme a metodologia que segue.

3.2.3. OBTENÇÃO DAS METÁFASES MITÓTICAS

3.2.3.1. Cultura de curto tempo

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

- 1) Retira-se a porção anterior do rim com aproximadamente 3 mm³ e transfere-se para uma placa de petri contendo 10 ml de meio de cultura RPMI mais 20% de soro bovino fetal.
- 2) Dissocia-se bem o material com o auxílio de duas pinças de ponta fina. Para melhor desagregação do tecido, asperge-se e expira-se a solução com o auxílio de uma seringa de vidro sem agulha com a ponta pressionada ao fundo da placa de Petri.
- 3) Após a obtenção de uma suspensão de células, transfere-se o material da placa para os recipientes que continham o meio de cultura.
- 4) Incuba-se a solução de células então obtida em estufa a 29°C por 6-7 horas em média.
- 5) Vinte minutos antes de se interromper a proliferação celular, pingam-se 3 gotas de colchicina (0,025%) em cada recipiente. Agita-se gentilmente o frasco para homogeneizar o material. O frasco é mantido na estufa durante os vinte minutos restantes.
- 6) Decorrido este período, interromper-se a proliferação celular, transferindo-o para um tubo de centrífuga graduado e centrifugando-o por 10 minutos a 800-900 rpm. Descarta-se o sobrenadante e completa-se o tubo (8ml) com solução hipotônica (KCl_{aq.} 0,075M); ressuspende-se o material e coloca-se o tubo em estufa por 20 minutos a 37°C.

7) Prepara-se o fixador usando 3 partes de metanol para cada parte de ácido acético; devendo-se conservá-lo sob refrigeração, enquanto não estiver sendo utilizado. Dado o tempo da hipotonização, pinga-se algumas gotas do fixador em cada tubo; ressuspende-se o material até ficar homogêneo, e centrifuga-se por 10 minutos a 800-900 rpm.

8) Após descarte do sobrenadante, adicionam-se 2ml de fixador; ressuspende-se muito bem o material de forma que a solução se torne homogênea; completa-se o volume do tubo com fixador, até 8ml; resuspende-se novamente o material e centrifuga-se por 10 minutos a 800-900 rpm.

9) A etapa acima é então repetida mais uma vez. Após o tubo ter sido preenchido com o fixador, pela segunda vez, este é guardado em um refrigerador (freezer) à temperatura de -20°C , por 24h.

10) Decorrido este período, os tubos são retirados do freezer e o material é ressuspendido e centrifugado. Retira-se o sobrenadante e completa-se o tubo até o volume de 1,5ml, o material é então transferido para microtubos (tipo ependorfe), que são guardados no refrigerador (freezer) à temperatura de -20°C .

3.2.3.2. A análise do material e a coloração convencional

O material, após ter sido retirado do freezer (-20°C) foi gotejado (2 a 3 gotas) sobre uma lâmina colocada no vapor de um banho maria à 37°C . As lâminas devem ter sido meticulosamente limpas e conservadas em álcool, na geladeira, antes de receberem a solução dos ependorfes. Após gotejamento, as lâminas foram secas ao ar.

A coloração segue a técnica convencional, com uso de uma solução de Giemsa a 5% em tampão fosfato (pH 6,8). Esta foi colocada sobre as lâminas por

um período de cerca de 10 minutos. Decorrido tal tempo, as lâminas foram lavadas em água corrente e secas ao ar.

Esta coloração convencional permitiu a análise do número, morfologia e fórmula cromossômica e também a observação das alterações macroestruturais provocadas pela contaminação com o chumbo.

3.2.3.3. Caracterização das regiões organizadoras de nucléolo (RONs)

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

A técnica descrita por HOWELL & BLACK (*op. cit.*) pode ser resumida nas etapas seguintes:

→Foram utilizadas lâminas preparadas conforme a técnica supracitada, em alguns casos a lâmina foi envelhecida por até 5 dias em uma estufa de aproximadamente 45 °C.

→A técnica utiliza 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 deve ser acondicionada em frasco âmbar e mantida em geladeira

→Pinga-se sobre a lâmina 2 gotas da solução de gelatina, 4 gotas da solução aquosa de nitrato de prata e uma gota de água destilada.

→Misturam-se as gotas e cobre-se então a lâmina com uma lamínula.

→Leva-se a lâmina assim preparada para estufa de 60 °C, permanecendo na estufa por aproximadamente 9 minutos ou até que a lâmina adquirira uma coloração dourado-acastanhada.

→Remove-se então a lamínula com um jato de água destilada, coloca-se a lâmina em uma solução de Giemsa (1%) por 30", apenas para retirar o brilho da coloração.

→Deixa-se a lâmina secar ao ar.

→As lamínulas são então lavadas em solução sulfocrômica, enxaguadas em água corrente e deixadas secando ao ar, para que sejam reaproveitadas.

3.2.3.4. Detecção das regiões de heterocromatina constitutiva (Banda C)

Para a detecção da banda C foi utilizada a técnica descrita por SUMNER (1972), com algumas modificações:

→A lâmina foi preparada conforme o protocolo já citado, em seguida esta é colocada em uma solução de HCL 0,2N, a temperatura ambiente durante 15 minutos. Decorrido este tempo, lava-se a lâmina em água deionizada e deixa-se secar ao ar.

→Coloca-se a lâmina em solução salina 2xSSC, a 60 °C, por 15 minutos.

→Lava-se a lâmina em água deionizada, deixa-se secar ao ar.

→Submergir a lâmina em um tubete contendo uma solução aquosa de hidróxido de bário($Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$) a 5% a uma temperatura de 42°C durante 1 a 2,5 minutos.

→Lava-se em solução de HCL 0,2N, para retirar o excesso de hidróxido de bário.

→Lava-se em água deionizada e deixa-se secar ao ar.

→Incuba-se as lâminas numa solução salina de 2xSSC, por 1 hora a 60 °C.

→Após este período lava-se novamente e deixa-se secar ao ar.

→Corá-se, então, as lâminas com solução de Giemsa a 2% em tampão fosfato pH 6,8 durante 20 minutos.

→Lava-se em água deionizada e deixa-se secar ao ar.

3.3. MONTAGEM E ANÁLISE DOS CARIÓTIPOS

As preparações foram todas analisadas em microscópio binocular Olympus.

Nas preparações coradas segundo a técnica convencional (Giemsa), 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 de fêmeas.

Os cariótipos foram montados organizando-se os cromossomos segundo os critérios de relação de braços (RB) (q/p), proposto por LEVAN *et al.*, 1964), e classificados como metacêntricos (RB= 1,00 a 1,70); submetacêntricos (RB= 1,71 a 3,00); subteloêntricos (RB= 3,01 a 7,00) e acrocêntricos (RB= maior que 7,01). Os cromossomos assim separados foram então organizados em ordem decrescente de tamanho.

Ainda nas preparações coradas convencionalmente foram fotografadas as metáfases que apresentaram alterações cromossômicas estruturais, neste caso não foram montados cariótipos mas sim feitas ampliações para melhor observação das alterações; e após todas as lâminas terem sido analisadas foi possível estabelecer uma proporção entre o total de metáfases analisadas e o número absoluto e relativo de metáfases que apresentaram alterações para cada indivíduo, permitindo o estabelecimento de uma relação do número de metáfases com a quantidade de alterações observadas e o tipo de tratamento que o indivíduo recebeu, isto é se foi ou não exposto ao xenobionte.

As preparações que foram tratadas de forma a corarem as regiões organizadoras de nucléolo (RONs), foram também analisadas e tiveram as melhores metáfases fotografadas sendo então determinado o número e a localização das regiões marcadas pelo nitrato de prata. Foram feitas lâminas de cada um dos indivíduos.

As preparações de Banda C, foram analisadas da mesma forma e fotografadas de forma a caracterizar as regiões de heterocromatina constitutiva.

4. RESULTADOS:

4.1. CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA.

Foram analisados 9 exemplares de *Hoplias aff. malabaricus* (figura 2) 04 machos e 05 fêmeas, popularmente conhecidos como traíra, coletados na Chácara da Paz, município de São José dos Pinhais-PR. Estes apresentaram um número diplóide modal de 42 cromossomos (tabela 1 e gráfico 1), e número fundamental (NF) igual a 84. A macroestrutura cariotípica apresentou 16 cromossomos metacêntricos (M), 3 cromossomos submetacêntricos (SM) e 2 subtelocêntricos (ST). São apresentados na figura 3 os cariótipos montados para fêmea e macho, respectivamente.

Quanto a microestrutura, os exemplares analisados apresentaram um número variável de cromossomos marcados pelo nitrato de prata (RONS), de 2 a 6 marcas (figuras 4 e 5), que variaram também quanto aos cromossomos marcados e quanto a localização das marcas, a grande maioria mostrou-se telomérica, ocorrendo em alguns casos marcas nos dois telômeros (biteloméricas) (figura 4b). Estas variações ocorrem de forma intrapopulacional e intraindividualmente, caracterizando o polimorfismo de RONS. Segundo a literatura consultada o polimorfismo de RONS é uma característica cromossômica desta espécie, corroborando os dados encontrados neste estudo (DERGAM & BERTOLLO, 1990; JORGE, 1995; CESTARI, 1998).

A heterocromatina constitutiva, caracterizada pela técnica da banda C, mostrou-se distribuída nas regiões centroméricas e pericentroméricas de quase todos os cromossomos, coma presença de marcas teloméricas em alguns destes e de um grande bloco intersticial no par 1 (metacêntrico), as marcas teloméricas estão indicadas por cabeças de seta e os blocos maiores por setas (figura 6). As marcas pericentroméricas foram observadas em outros estudos feitos em *H. malabaricus* (DERGAM & BERTOLLO, 1990; JORGE, 1995). O bloco maior de

heterocrometina necessita de uma melhor caracterização não tendo sido observado em todas as metáfases analisadas. O fato de não ser visualizado em todas as metáfases se deve, possivelmente a problemas como técnica e diferenças entre as diferentes lâminas

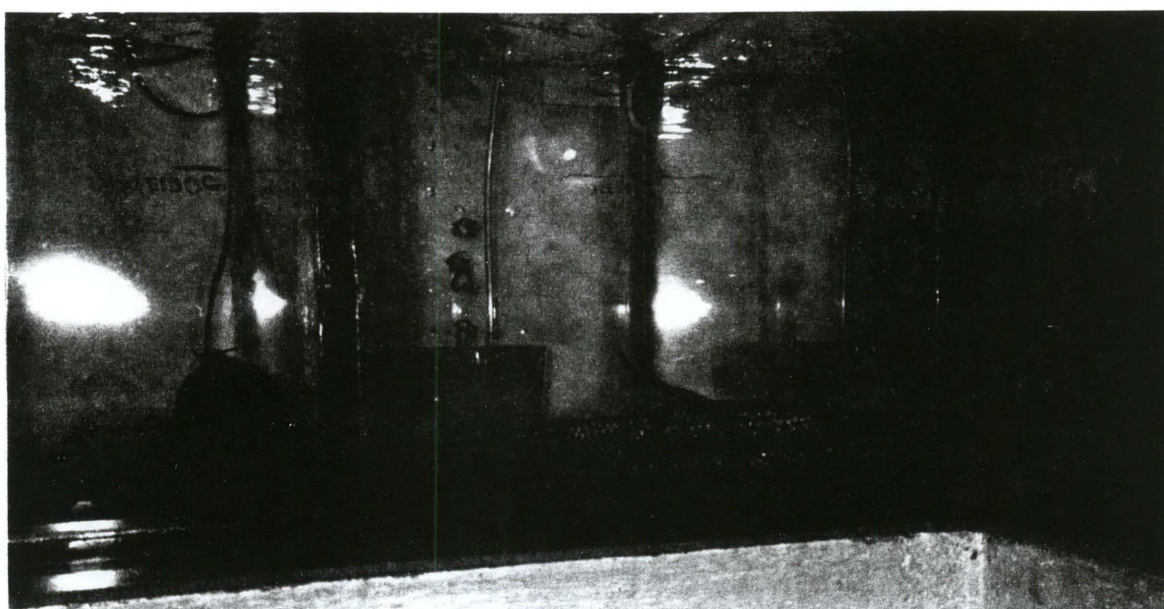


Figura 2: Detalhe mostrando um dos exemplares de *Hoplias aff. malabaricus* que participou do bioensaio.

NÚMERO DIPLÓIDE (2n)	42	41	40	39	38	Total de metáfases
601 (F)	202	11	4	10	4	231
602 (F)	84	7	1	6	1	99
606 (F)	209	13	9	12	6	249
607 (F)	203	8	13	5	5	234
610 (F)	200	6	4	6	2	218
SOMA	898	45	31	39	18	1031
603 (M)	207	10	7	6	10	240
605 (M)	201	9	8	6	7	231
608 (M)	95	4	4	5	3	111
609 (M)	207	9	8	8	6	238
SOMA	710	32	27	25	26	820
Total de metáfases	1608	77	58	64	44	1851

Tabela 1: Frequência absoluta correspondente ao número diplóide (2n) observado para cada indivíduo (fêmeas e machos) coletados na Fazenda Canguiri, no total de metáfases analisadas.

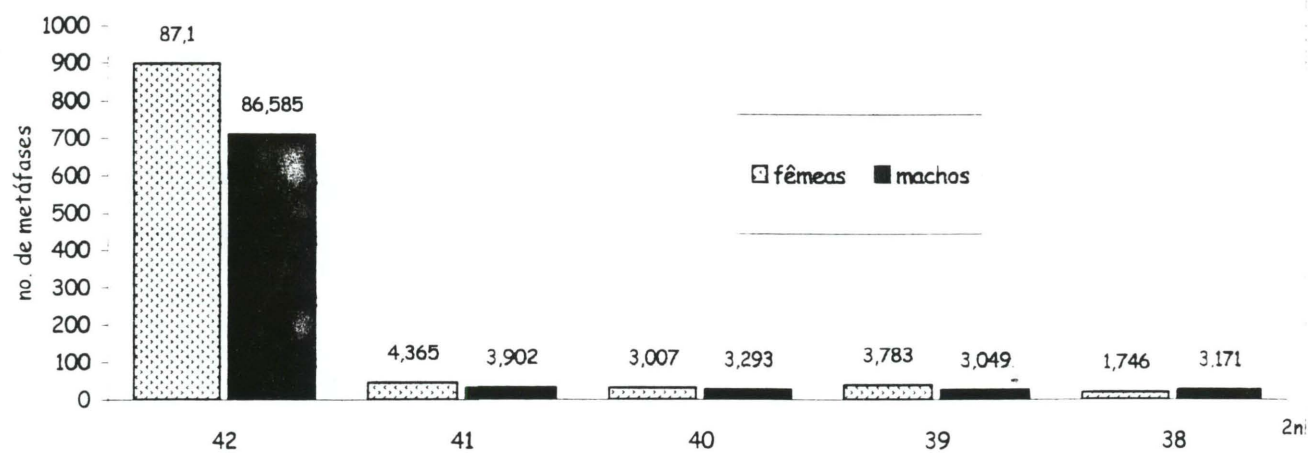
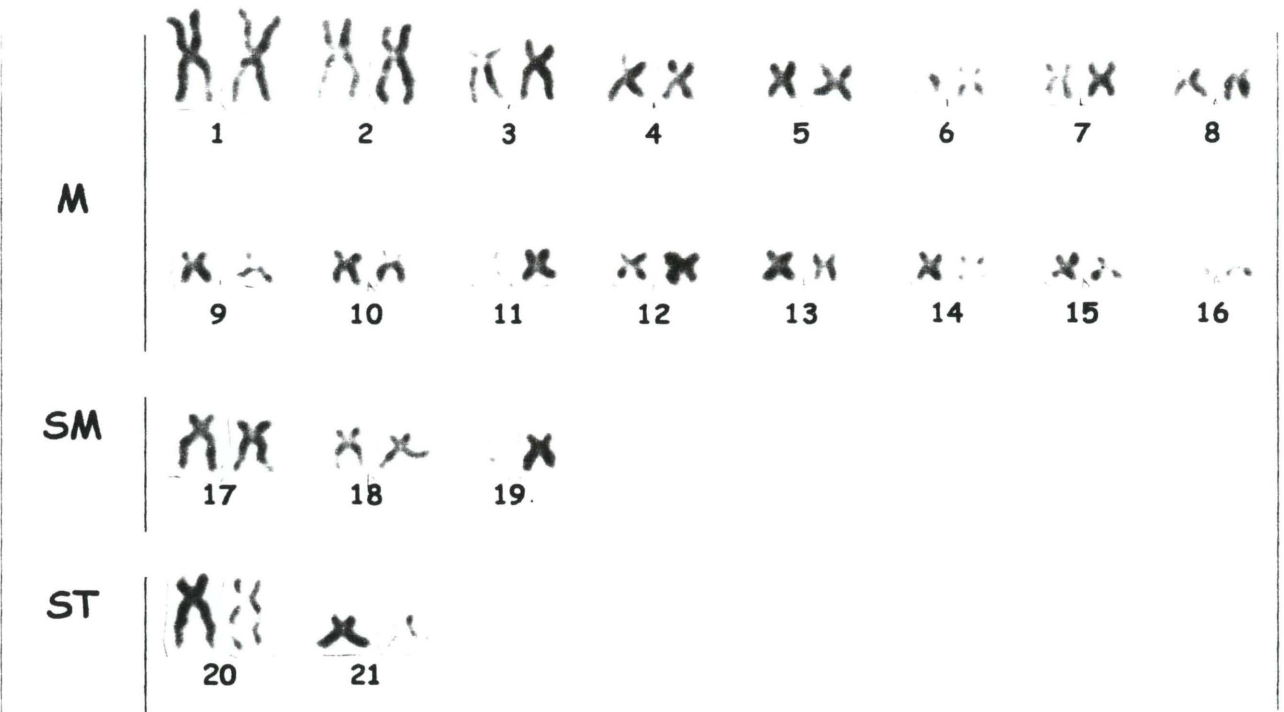


Gráfico 1: Frequência relativa correspondente ao número diplóide (2n) observado em machos e fêmeas coletados na Fazenda Canguiri, no total de metáfases analisadas.

♀



♂

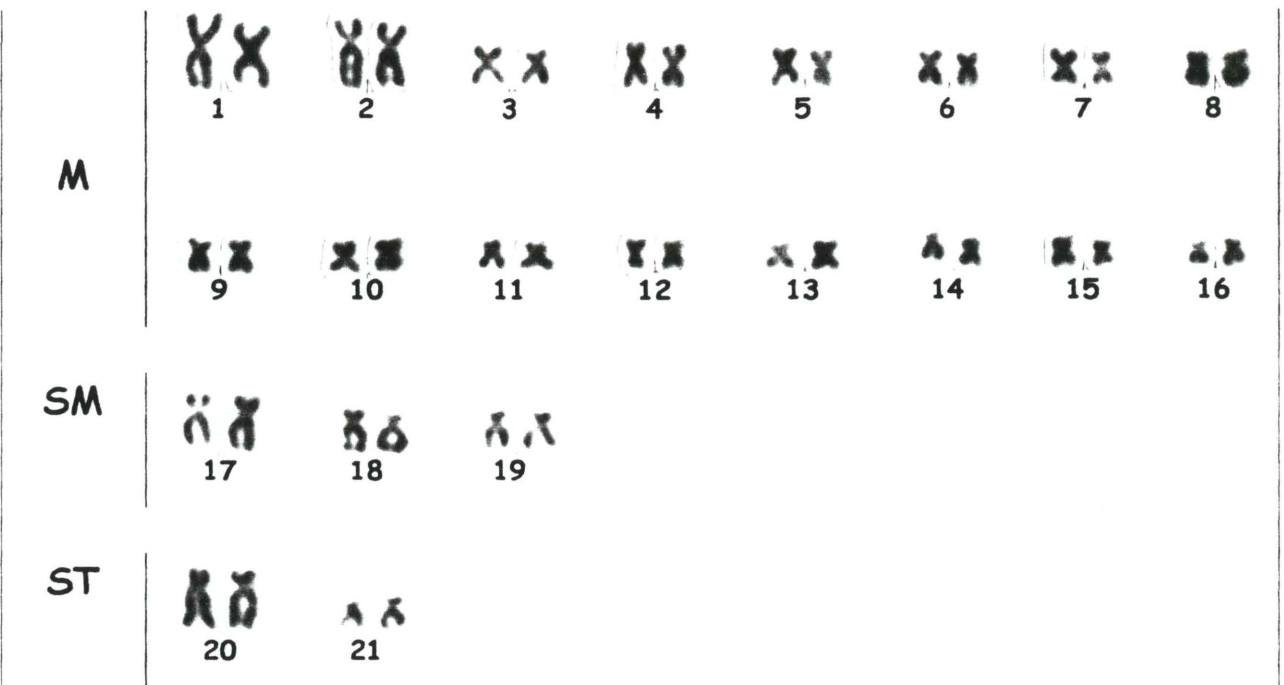


Figura 3: Cariótipos montados para fêmeas e machos, respectivamente, coletados na Fazenda Canguiri, que fizeram parte do bioensaio de exposição trófica ao chumbo (Pb^{++}), $2n=42$ (16 M+03 SM+ 02 ST), NF=84.



Figura 4: Metáfases tratadas com AgNO_3 , mostrando o polimorfismo cromossômico das RONS. As setas na **metáfase A** indicam as regiões teloméricas marcadas, as setas na **metáfase B** indicam uma marca telomérica e um cromossomo com ambos os telômeros marcados.



Figura 5: Metáfases tratadas com AgNO_3 , mostrando o polimorfismo cromossômico das RONS. As setas na **metáfase A** indicam uma marca telomérica e uma cromátide com duas marcas, as setas na **metáfase B** indicam as cromátides com marcas duplas nos cromossomos do par 21 e marcas teloméricas.



Figura 6: Metáfases mostrando o padrão de distribuição da heterocromatina constituída pela banda C. As setas indicam um grande bloco intersticial no primeiro par de cromossomos, as cabeças de seta indicam blocos teloméricos (em ambas as metáfases).

4.2. RELATIVOS À CITOXICIDADE:

ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS

Dentre os indivíduos que fizeram parte do bioensaio de exposição crônica ao chumbo (Pb^{++}), três foram utilizados como controle e seis foram expostos por via trófica. Nos indivíduos que foram expostos e sacrificados no 18º dia, após receberem 4 doses, foram observadas alterações cromossômicas em algumas metáfases. A saber: quebras envolvendo apenas uma das cromátides (**figuras 7 e 8**), inversões pericêntricas (**figura 9a**), cromossomos em que uma das cromátides parece ter executado um giro de 180º na região do centrômero (**figuras 9b e 10**) e quebras envolvendo ambas as cromátides que originaram pequenos fragmentos cromossômicos (**figura 11**). Nos indivíduos sacrificados no 41º dia, foram observadas alterações cromossômicas semelhantes as observadas no primeiro grupo de animais sacrificados (**figura 12**), e também modificações na estrutura do cromossomo com prováveis descondensações (**figuras 13 a 17**), aparentando problemas na espiralização das fitas de DNA, e poliploidia (**figura 18**).

A **tabela 2** fornece as frequências absolutas e relativas em que foram observadas metáfases com uma ou mais alterações cromossômicas. A tabela também relaciona os indivíduos, identificados por seus números (registro laboratorial), ao sexo e ao tipo de tratamento a que foram submetidos.



Figura 7: Metáfases com alterações estruturais, provenientes dos animais expostos que foram sacrificados no 18º dia. Na metáfase A, as setas indicam uma quebra simples (apenas uma das cromátides) e uma quebra dupla, na metáfase B, a seta indica uma quebra simples.



Figura 8: Metáfases com alterações estruturais, provenientes dos animais expostos que foram sacrificados no 18º dia. Na metáfase **A**, a seta indica uma quebra simples, na metáfase **B**, as setas indicam, também, quebras simples..

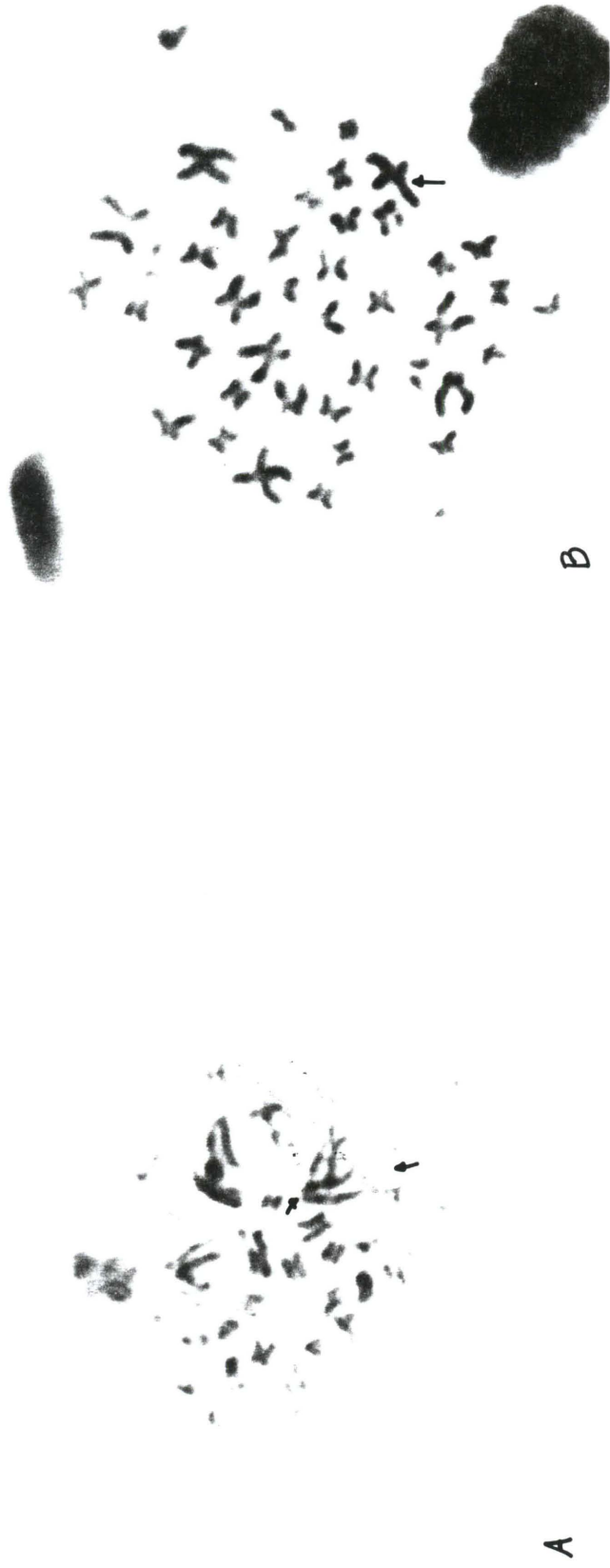


Figura 9: Metáfases com alterações estruturais, provenientes dos animais expostos que foram sacrificados no 18^o dia. Na metáfase A, as setas indicam uma quebra simples e um cromossomo acrocêntrico resultante de uma inversão pericêntrica, na metáfase B, a seta indica um cromossomo em que aparentemente uma das cromátides, sofreu uma rotação de 180° na região do centrômero.



Figura 10: Metáfases com alterações estruturais, provenientes dos animais expostos que foram sacrificados no 18^o dia. Em ambas as metáfases as setas indicam cromossomos em que aparentemente uma das cromátides, sofreu uma rotação de 180° na região do centrômero.

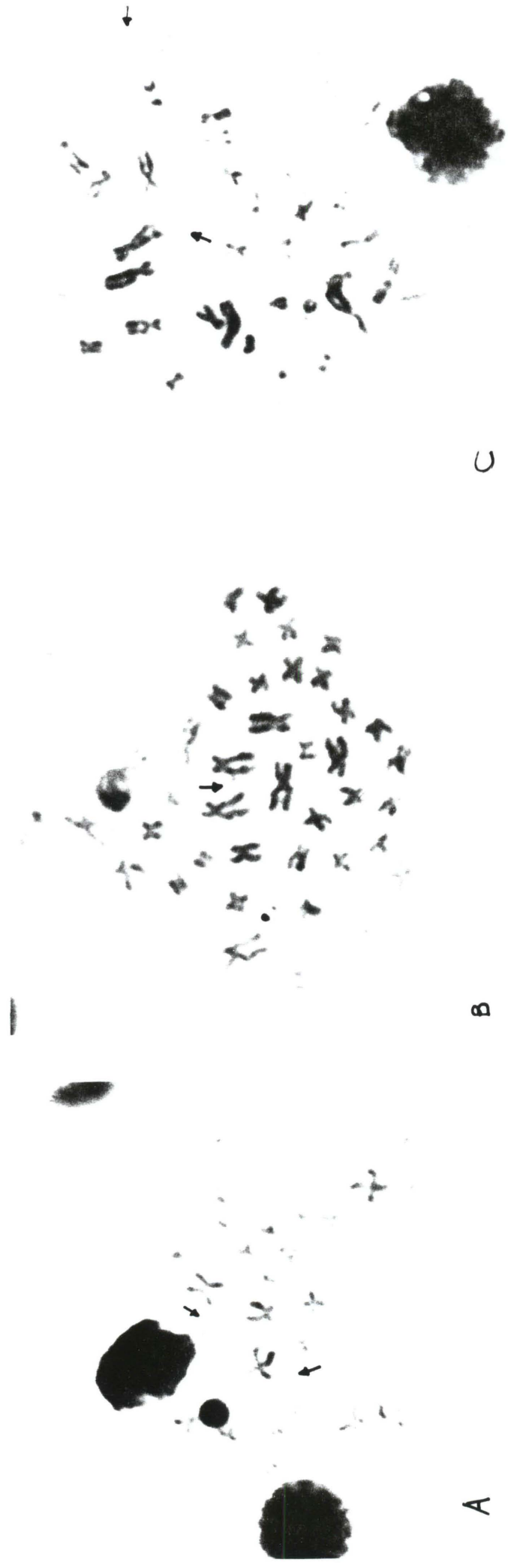


Figura 11: Metáfases com alterações estruturais, provenientes dos animais expostos que foram sacrificados no 18º dia. Na **metáfase A**, as setas indicam uma quebra simples e uma quebra dupla (envolvendo ambas as cromátides); na **metáfase B**, a seta indica uma quebra dupla e na **metáfase C**, as setas indicam duas quebras duplas.



Figura 12: Metáfases com alterações estruturais, provenientes dos animais expostos que foram sacrificados no 41º dia. Em ambas as metáfases as setas indicam quebras duplas.



Figura 13: Metáfases com alterações estruturais, provenientes dos animais expostos que foram sacrificados no 41º dia. Em ambas as metáfases as setas indicam porções aparentemente descondensadas dos cromossomos.



Figura 14: Metáfases com alterações estruturais, provenientes dos animais expostos que foram sacrificados no 41º dia. Em ambas as metáfases as setas indicam porções aparentemente descondensadas dos cromossomos.



Figura 15: Metáfases com alterações estruturais, provenientes dos animais expostos que foram sacrificados no 41º dia. Em ambas as metáfases as setas indicam porções aparentemente descondensadas dos cromossomos.



Figura 16: Metáfases com alterações estruturais, provenientes dos animais expostos que foram sacrificados no 41º dia. Em ambas as metáfases as setas indicam porções aparentemente descondensadas dos cromossomos.



Figura 17: Metáfases provenientes de animais expostos que foram sacrificados no 41º dia. As duas metáfases mostram cromossomos desestruturados e um grande número de filamentos de natureza não definida que se irradiam destes.



A

B

Figura 18: Metáfases com alterações numéricas, provenientes dos animais expostos que foram sacrificados no 41º dia. Ambas as metáfases indicam a presença de células poliplóides no rim destes exemplares.

IDENTIFICAÇÃO DO ANIMAL (N ^o .)	SEXO	TRATAMENTO	TOTAL DE METÁFASES ANALISADAS	METÁFASES COM ALTERAÇÕES: FREQUÊNCIAS ABSOLUTAS (E RELATIVAS)
601	F	<i>Sacrificado no 18^o dia</i>	202	47 (23,267)
602	F	<i>Sacrificado no 18^o dia</i>	84	20 (23,810)
603	M	<i>Sacrificado no 18^o dia</i>	207	59 (18,841)
605	M	Controle (água destilada)	201	2 (0,995)
606	F	Controle (água destilada)	209	0 (0,000)
607	F	Controle (água destilada)	203	5 (2,463)
608	M	<i>Sacrificado no 41^o dia</i>	95	18 (18,947)
609	M	<i>Sacrificado no 41^o dia</i>	207	39 (18,841)
610	F	<i>Sacrificado no 41^o dia</i>	200	38 (19,000)

Tabela 2: Tabela mostrando as frequências em que foram observadas alterações cromossômicas para cada indivíduo que fez parte do bioensaio de exposição trófica ao chumbo (Pb⁺⁺), no total de metáfases mitóticas analisadas.

5. DISCUSSÃO

Através dos resultados obtidos em *Hoplias aff. malabaricus* para a população analisada ($2n=42$, $NF=84$) (figura 3) podemos destacar similaridades com outros exemplares de outras bacias hidrográficas (BERTOLLO *et al.* 1979; SCAVONE *et al.*, 1994).

A impregnação pelo nitrato de prata ($AgNO_3$), evidenciou marcas múltiplas que indicam regiões organizadoras de nucléolos (RONs) em vários cromossomos (figuras 4 e 5). As marcas variaram em número (2 a 10) e localização. A presença de marcas duplas em apenas uma das cromátides dos cromossomos do par 21, possivelmente indicam a ocorrência de uma transposição de um segmento anteriormente duplicado. Estas variações ocorreram tanto entre os indivíduos (variação intrapopulacional) quanto entre as metáfases de um mesmo indivíduo (variação intraindividual), resultados estes que corroboram com os dados encontrados na literatura consultada que mostra o polimorfismo de RONs como uma característica comum a este grupo de peixes (DERGAM & BERTOLLO, 1990; JORGE, 1995; CESTARI, 1998).

A mesma similaridade com as outras populações de traíra foi observada na banda C (DERGAM & BERTOLLO, 1990; JORGE, 1995, BERTOLLO *et al.*, 1997b), através do padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva, principalmente como pequenos blocos centroméricos e pericentroméricos; blocos teloméricos pequenos aparecem em alguns pares, um bloco telomérico grande e uma banda intersticial bem evidente foram observados no primeiro par de cromossomos (figura 6).

A grande variação nos citótipos — especialmente aquelas que acarretam uma possível incompatibilidade entre os sistemas de determinação sexual — nas populações de diferentes bacias hidrográficas, sugere que a "espécie" *Hoplias aff. malabaricus* seja na verdade um complexo de espécies. Porém, algumas das

diferenças entre os citótipos podem apenas representar diferenciações cromossômicas entre as populações (BERTOLLO *et al.*, 1986). A origem destas mudanças cromossômicas entre as diferentes populações de uma mesma bacia hidrográfica ou de bacias diferentes, pode ser devido a ampla distribuição geográfica e a reduzida vagilidade desta espécie (DERGAM & BERTOLLO *apud* LOPEZ & FENOCCHIO, 1994).

Estudos recentes sobre similaridade molecular, diversidade genética e distribuição geográfica (DERGAM *et al.*, 1998) mostram que possivelmente a espécie foi introduzida no Rio Iguazu nas últimas décadas. Tendo em vista o relato publicado, indicando a presença da espécie no Rio Iguazu que data de 1979 (*op. cit.*), poder-se-ia aventar que a colonização e a conquista de ambientes distintos estariam associadas com pressões seletivas, que levaram ao estabelecimento dos diferentes citótipos.

Os resultados referentes a exposição trófica ao chumbo (Pb^{++}) mostram que os indivíduos expostos apresentaram modificações estruturais tais como: quebras cromossômicas envolvendo apenas uma das cromátides ou ambas, inversões pericêntricas, descondensações de porções cromossômicas, entre outras. A frequência em que foram observadas alterações nestes animais foi considerada alta em comparação com os controles (necessitando de confirmação estatística) (tabela 2). As alterações observadas, como a presença de quebras envolvendo apenas uma das cromátides (figuras 7 e 8) e a aparente desestruturação dos cromossomos (regiões decondensadas) (figuras 13 a 17), devem-se aos distúrbios no metabolismo oxidativo normal, causados pelo chumbo, que acarreta em um acúmulo de espécie reativas de oxigênio parcialmente reduzidas (H_2O_2 , O^- e OH^-); e estas por sua vez, podem causar quebras nas enzimas envolvidas nos mecanismos que asseguram a integridade do DNA ou causar trocas na sequência de bases de porções do DNA (mutações), podem ainda

atacar os resíduos de açúcar causando fragmentação, perda de bases e quebra de uma das fitas (FRIEDBERG *et al.*, 1995).

O chumbo pode também se complexar a proteínas nucleares, principalmente aquelas responsáveis pela manutenção da estrutura dos cromossomos, fazendo com que estas assumam uma configuração anormal (GOYER *et al.*, 1974).

Estas modificações mostram que o chumbo (II) possui efeitos genotóxicos, clastogênicos, e possivelmente carcinogênicos, para as traíras (predador que ocupa o topo da cadeia trófica de ecossistemas aquáticos continentais) expostas por via trófica a concentração utilizada ($21\mu\text{g Pb/g}$ traíra a cada 120h) no bioensaio aqui analisado.

6. CONCLUSÕES

- *Hoplias aff. malabaricus* coletado na Fazenda Canguiri no município de Piraquara (Primeiro Planalto Paranaense - Bacia do Rio Iguçu) apresenta $2n=42$ cromossomos, distribuídos em 16 M, e 3 SM e 2 ST, NF=84. As RONS se apresentaram múltiplas variando quanto ao número (2 a 10) e localização. A análise da banda C mostra que a heterocromatina constitutiva está distribuída em sua grande maioria nas regiões pericentroméricas e centroméricas, com presença de pequenos blocos teloméricos. Um grande bloco telomérico e um bloco intersticial foram observados no primeiro par de cromossomos.
- Os indivíduos que foram expostos ao chumbo (II), apresentaram alterações cromosômicas, como por exemplo, quebras envolvendo apenas uma das cromátides ou ambas, inversões pericêntricas, poliploidia e desestruturação do cromossomo. Estas modificações apareceram em 26,41% (média entre os 3 ind.expostos) das metáfases dos animais sacrificados após 4 doses e em 20,28% das metáfases dos indivíduos expostos sacrificados ao fim do experimento. Através dos dados obtidos até o presente momento, pode-se afirmar que o chumbo mostrou-se genotóxico, clastogênico e potencialmente carcinogênico para uma espécie de nível trófico elevado, como é o caso das traíras.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C. (Eds.). (1997). *Reservatório de Segredo: bases ecológicas para manejo*. Maringá: Eduem, 1997.
- ALMEIDA-TOLEDO, L. F. (1998) Cytogenetic markers in neotropical freshwater fishes. 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, part 7, 583-588.
- BAATRUP, E. (1991) Structural and functional effects of heavy metals on the nervous system, including sense organs, of fish. *Comp. Biochem. Physiol.* v. 100C, n.1/2, pp. 253-257.
- BERTOLLO, L. A. C. (1978). *Estudos citogenéticos no gênero *Hoplias* (Gill, 1903) (Pisces, Erythrinidae)*. Tese de Doutorado, Departamento de Genética e Matemática Aplicada. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo.
- BERTOLLO, L. A. C.; TAKAHASHI, C. S. & MOREIRA FILHO, O. (1978). Cytotaxonomic considerations of *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Rev. Brasil. Genet.* II, v.1, 103-112.
- BERTOLLO, L. A. C.; TAKAHASHI, C. S. & MOREIRA FILHO, O. (1979). Karyotypic studies of two allopatric populations of the genus *Hoplias* (Pisces, Erythrinidae). *Rev. Bras. Genet.*, 2: 17-37.

- BERTOLLO, L. A. C.; TAKAHASHI, C. S.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; GALETTI Jr, P. M.; FERRARI, I.; MOREIRA FILHO O. & FORESTI, F. (1980). Estudos citogenéticos em peixes da região amazônica I. Ordem Cypriniformes. *Ciência e Cultura Supl.* 32: 735.
- BERTOLLO, L. A. C.; TAKAHASHI, C. S. & MOREIRA FILHO, O. (1983). Multiple sex chromosomes in the genus *Hoplias* (Pisces, Erythrinidae). *Cytologia*, 48: 1-12.
- BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA FILHO, O.; GALETTI Jr, P. M. (1986). Cytogenetics and taxonomy: considerations based on chromosome studies of freshwater fish. *J. Fish Biol.*, v.28, 153-159.
- BERTOLLO, L. A. C.; FONTES, M. F.; FENOCCHIO, A. S.; CANO, J. (1997b). The X_1X_2Y sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus*. I. G-, C- and chromosome replication banding. *Chromosome Research*, v. 5, 493-499.
- BERTOLLO, L. A. C.; MESTRINER, C. A. (1998) The X_1X_2Y sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus*. II. meiotic analyses. *Chromosome Research*, v. 6, 141-147.
- BLOCH, M. E. (1794). Der malabarische hecht. In: *Naturgeschichte des Ausländische Fische*. Berlin, pp. 149-150.
- CESTARI, M. M. (1998). Estudos citogenéticos preliminares de *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae, Characiformes) de um lago de extração de xisto. 44^o. Cong. Nacional de Genética, 21: 3- Suplement, p. 66.

- DERGAM, J. A. & BERTOLLO, L. A. C. (1990). Karyotypic diversification in *Hoplias malabaricus* (Osteichthyes, Erythrinidae) of the São Francisco and Alto Paraná basins, Brazil. *Rev. Bras. Genet.*, 13: 755-766.
- DERGAM, J. A.; SUZUKI, H. I.; SHIBATTA, O. A.; DUBOC, L. F.; JÚLIO JR., H. F.; GIULIANO-CAETANO, L.; BLACK IV, W. C. (1998) Molecular biogeography of the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae: Characiformes) in the Iguaçú, Tibagi, and Paraná rivers. *Genetics and Molecular Biology*, v.21, n.4, 493-496.
- FENOCCHIO, A. S. & BERTOLLO, L. A. C. (1988). A simple method for fresh-water fish lymphocyte culture. *Rev. Brasil. Genet.*, 11 (4): 847-852.
- 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*, v.44, n.2, 161-166.
- FRIEDBERG, E. C.; WALKER, G. C.; SIEDE, W. (1995). DNA repair and mutagenesis. Washington: ASMpress. Cap.01.
- GOYER, R. A. & MOORE, J. F. (1974). Cellular effects of lead. *Adv. Exp. Med. Biol.* V. 48, pp. 447-462.
- HASEMAN, J. D. (1911). Some new species of fishes from the Rio Iguassu. *Ann. Carnegie Mus.* 7: 374-387.

- HOWELL, W. M.; BLACK, D. A. (1980) Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, v.36, 1014-1015.
- JOBLING, M. (1995). *Environmental Biology of Fishes*. 1st ed. London: Chapman & Hall.
- JORGE, L. C. (1995). Estudos citogenéticos comparativos de algumas espécies de peixes da região de Corrientes-Argentina e do Alto Paraná. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, SP, Brasil.
- LANDIS, W. G. & YU, M. (1995). *Introduction to environmental toxicology: impacts of chemicals upon ecological systems*. Boca Raton: LEWIS.
- LEMONS, P. M. M. & CESTARI, M. M. (1999) Estudo citogenético em *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae, Characiformes) do Primeiro Planalto do Rio Iguazu (PR). In: ENCONTRO BRASILEIRO DE ICTIOLOGIA (13.: 1999: São Carlos) Resumos. São Carlos : Universidade Federal de São Carlos.
- LEVAN, A.; FREDGA, K. & SANDBERG, A. A. (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, v.52, 201-220.
- LOPEZ, P. A.; FENOCCHIO, A. S. (1994) Confirmation of two different cytotypes for the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Gill 1903) (Characiformes). *Cytobios*, v.80, 217-221.

LOUREIRO, V. E. (1995). Dieta e atividade alimentar de *Hoplias malabaricus* (BLOCH, 1794) (Osteichthyes, Erythrinidae) do reservatório da UHE de segredo, PR, no primeiro ano de sua formação. RESUMOS DO XI ENCONTRO BRASILEIRO DE ICTIOLOGIA. L4, p 12.

LOWE-McCONNEL, R. H. (1999). Estudos ecológicos de comunidades de peixes Neotropicais. São Paulo: EDUSP.

LUNDBERG, J. G. (1998). The temporal context for the diversification of neotropical fishes. 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, part 1, 49-68.

MANAHAN, S. E. (1999) *Environmental chemistry*. 5ed. Boca Raton : Lewis.

MERIAN, E. (Ed.). (1991). *Metals and their compounds in the environment: occurrence, analysis, and biological relevance*. New York : VCH.

NELSON, J. S. (1994). *Fishes of the world*. 3rd ed., John Wiley & Sons Ltd. New York. Cap. 2, 45-50.

NICHOLLS, D. McE.; TEICHERT-KULISZEWSKA, K. & GIRGIS, G. R. (1989) Effect of chronic Hg chloride exposure on liver and muscle enzymes in fish. *Comp. Biochem. Physiol.* v. 94C, n.1, pp. 265-270.

OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. & FORESTI, F. (1996). Revisão dos estudos citogenéticos em peixes neotropicais de águas continentais. Res. VI Simp. Citogenet. Evol. Aplic. Peixes Neotrop. São Carlos, Brasil. P.104.

OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. (no prelo) Estudo do efeito tóxico do tributilestanho (TBT) em células e tecidos de *Hoplias malabaricus*. Departamento de Biologia Celular, UFPR.

PAIN, D. J. (1995). Lead in the environment. In: HOFFMAN, D. J. *et al.* (Eds.). *Handbook of ecotoxicology*. Boca raton: LEWIS, Cap. 16.

SAMPAIO, F. A. A. (1988). Estudos taxonômicos preliminares dos Characiformes (Teleostei, Ostariophysii) da Bacia do Rio Iguaçu. Com comentários sobre o endemismo desta fauna. Unpubl. Master's thesis, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil.

SCAVONE, M. D.; BERTOLLO, L. A. C.; CAVALLINI, M. M. (1994). Sympatric occurrence of two karyotypic forms of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae). *Cytobios*, 80: 223-227.

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

TESSIER, A. & TURNER, D. R. (Eds.). (1995). *Metal speciation and bioavailability in aquatic systems*. IUPAC: John Wiley & Sons Ltd.

VIGHI, M. (1981). Lead uptake and release in a experimental trofic chain.
Ecotoxicology and environmental safety. V.5, pp. 177-193.

WHITE, M. J. D. (1973). **Animal cytology and evolution**. Cambridge: Cambridge
University Press, 3rd ed.

WICKBOM, T. (1943). Cytological studies on the family Cyprinodontidae.
Hereditas, 29: 1-24.