

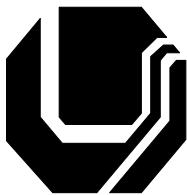
**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

## **Biomonitoramento e citogenética dos afluentes do rio Paranaíba**

**Aluna: Sabrina Vaz dos Santos e Silva**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Sandra Morelli**

**UBERLÂNDIA - MG  
2013**



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

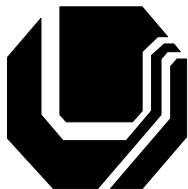
# **. Biomonitoramento e citogenética dos afluentes do rio Paranaíba**

**Aluna: Sabrina Vaz dos Santos e Silva**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Sandra Morelli**

**Tese apresentada à  
Universidade Federal de  
Uberlândia como parte dos  
requisitos para obtenção do  
Título de Doutor (a) em  
Genética e Bioquímica (Área  
Genética)**

**UBERLÂNDIA-MG  
2013**



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**Aluna: Sabrina Vaz dos Santos e Silva**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

**Presidente:** Prof. Dr<sup>a</sup> Sandra Morelli (Orientador)

**Examinadores:** Prof. Dr<sup>a</sup> Mônica Lúcia Adam (UFPE)

Prof. Dr Bruno Lassmar Bueno Valadares (UFS)

Prof. Dr Alexandre Azenha Alves de Rezende (UFU)

Prof. Dr Boscolli Barbosa Pereira (UFU)

**Data da Defesa:** 19 /12 / 2013

As sugestões da Comissão Examinadora e as normas do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica para o formato da tese foram contempladas

---

Prof. Dr<sup>a</sup> Sandra Morelli

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

S586b Silva, Sabrina Vaz dos Santos e, 1979-  
2013      Biomonitoramento e citogenética dos afluentes do rio Paranaíba /  
Sabrina Vaz dos Santos e Silva-- 2013.  
118 p. : il.

Orientador: Sandra Morelli.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.  
Inclui bibliografia.

1. Bioquímica - Teses. 2. Monitoramento biológico - Teses. 3.  
Cito-  
genética animal - Teses. I. Morelli, Sandra. II. Universidade Federal  
de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e  
Bioquímica. III. Título.

CDU: 577.1

---

Dedico esta tese aos meus pais, Suzete e Reinaldo, pela paciência, amor e apoio financeiro. E a minha amada “canorinha” Circe, pelos preciosos ensinamentos que só um animal tão sensível pode dar.

“Todas as decepções são secundárias. O único mal irreparável é o desaparecimento físico de alguém a quem amamos.”

(Romain Rolland)

## **AGRADECIMENTOS**

À Prof. Dr<sup>a</sup>. Sandra Morelli, pela orientação ao longo dos anos, paciência, amizade, dedicação e por acreditar em mim.

Ao Prof. Boscolli Barbosa Pereira, do Instituto de Geografia da Universidade Federal de Uberlândia, pela paciência, disponibilidade e auxílio prestado neste trabalho.

Ao Prof. Dr Robson José de Oliveira Júnior, pelos anos de trabalho, amizade e sugestões.

Ao José Clidenor, sem o qual essa dissertação não seria possível, pelo auxílio e paciência nas coletas noturnas.

Aos amigos e companheiro do Laboratório de Citogenética Animal da Universidade Federal de Uberlândia, por tornarem o local de trabalho mais leve.

Aos professores do Instituto de Genética e Bioquímica, pessoas responsáveis pela minha formação acadêmica e profissional.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia e a CAPES pela oportunidade dada para a realização deste trabalho e apoio financeiro.

Aos meus pais, por uma vida cheia de amor, incentivo, apoio e por sempre acreditar em mim.

À minha avó Raimunda Brito da Silva pelo exemplo de força e persistência.

Agradeço a todos que torceram e contribuíram para realização deste trabalho.

## Lista de Figuras

- **Capítulo I: Fundamentação Teórica**

**Figura 1:** Ideograma representativo das variabilidades de NOR em Heptapteridae 15

**Figura 2:** Ganho de sequências e evolução do cromossomo B. 18

**Capítulo II: Comparação citogenética de cinco populações de *Rhamdia quelen* da Microrregião do Triângulo Mineiro**

**Figura 1:** Mapa da hidrografia do Triângulo Mineiro. 60

**Figura 2:** Metáfases da população do rio Uberabinha. 63

**Figura 3:** Diferentes padrões observados de regiões organizadoras de Nucléolos (NOR). 63

- **Capítulo III: Emprego do teste de micronúcleo em peixes para avaliação de contaminação ambiental na microrregião de Catalão-GO**

**Figura 1:** Mapa do estado de Goiás mostrando os locais de monitoramento e ponto de referência. 86

## Lista de Tabelas

- **Capítulo I: Fundamentação Teórica**

**Tabela 1:** Possíveis resultados da rejeição no genoma fitness do hospedeiro e taxa de estabelecimento do cromossomo B. 20

**Capítulo II: Comparação citogenética de cinco populações de *Rhamdia quelen* da Microrregião do Triângulo Mineiro**

**Tabela 1:** Frequência Absoluta e Frequência Relativa da presença de Cromossomos B em relação ao sexo. 61

**Tabela 2:** Frequência Absoluta e Frequência Relativa da presença de Cromossomos Bs, em relação aos 5 pontos de coleta das amostras de *Rhamdia quelen*.. 62

- **Capítulo III: Emprego do teste de micronúcleo em peixes para avaliação de contaminação ambiental na microrregião de Catalão-GO**

**Tabela 1:** Características gerais dos 4 pontos de amostragem, durante o período da seca e cheia. 92

**Tabela 2:** Análises físico-químicas dos sedimentos durante a estação seca e de cheia. 93

**Tabela 3:** Frequência de Micronúcleos (MN) para *A. fasciatus*, *A. altiparanae* e *C. fasciatum* obtidos nos pontos 1-4 durante o biomonitoramento nas estações indicadas. 94

**Tabela 4:** Coeficiente de correlação de Pearson entre as concentrações de metais pesados e o teste de Micronúcleos nas células de peixes. 95

## Lista de Abreviaturas

---

|        |                                                    |
|--------|----------------------------------------------------|
| A      | Cromossomo do lote principal                       |
| a      | Acrocêntrico                                       |
| B      | Cromossomo B                                       |
| C      | Graus Celsius                                      |
| CCME   | Conselho Canadense de Ministérios de Meio Ambiente |
| CONAMA | Conselho Nacional do Meio Ambiente                 |
| Cr     | Cromo                                              |
| Km     | Quilômetro                                         |
| m      | Metacêntrico                                       |
| Mg     | Miligramma                                         |
| ml     | Mililitro                                          |
| MN     | Micronúcleo                                        |
| NTU    | Unidades Nefelométricas de Turbidez                |
| OMS    | Organização Mundial de Saúde                       |
| pH     | Potencial hidrogeniônico                           |
| Ppm    | Parte por milhão                                   |
| S      | Siemens                                            |
| sm     | Submetacêntrico                                    |
| St     | Subtelocêntrico                                    |
| Zn     | Zinco                                              |
| NOR    | Região Organizadora de Nucléolo                    |

---

## Sumário

|                                                |            |
|------------------------------------------------|------------|
| <b>Apresentação.....</b>                       | <b>1</b>   |
| <b>Capítulo I: Fundamentação Teórica.....</b>  | <b>3</b>   |
| Citogenética de peixes neotropicais .....      | 3          |
| Marcações e Bandeamento Cromossômico .....     | 7          |
| Regiões Organizadoras de Nucléolo (NORs) ..... | 7          |
| Marcações das regiões de Heterocromatina ..... | 8          |
| Citogenética da família Heptapteridae .....    | 10         |
| Cromossomos B .....                            | 16         |
| Biomonitoramento de ambientes aquáticos .....  | 23         |
| Metais pesados.....                            | 25         |
| Micronúcleo .....                              | 27         |
| Referências Bibliográficas .....               | 30         |
| <b>Capítulo II .....</b>                       | <b>56</b>  |
| Resumo .....                                   | 56         |
| Abstract.....                                  | 56         |
| Introdução.....                                | 57         |
| Material e Métodos .....                       | 59         |
| Resultados.....                                | 60         |
| Discussão .....                                | 64         |
| Referências Bibliográficas .....               | 70         |
| <b>Capítulo III .....</b>                      | <b>79</b>  |
| Resumo .....                                   | 79         |
| Abstract.....                                  | 79         |
| Introdução.....                                | 80         |
| Material e Métodos .....                       | 82         |
| Resultados e Discussão .....                   | 85         |
| Referências Bibliográficas .....               | 95         |
| <b>Anexos .....</b>                            | <b>102</b> |
| Anexo 1: Métodos.....                          | 102        |
| Anexo 2: Tabela.....                           | 104        |

## Apresentação

O Brasil abriga na sua extensa rede hidrográfica a maior diversidade de ictiofauna do mundo, entretanto, a quantidade de estudos realizados com esse grupo ainda não corresponde, proporcionalmente, a sua riqueza. Os peixes possuem um importante papel ecológico, econômico e evolutivo que justifica um aprofundamento do conhecimento de seus membros. A citogenética é uma das ferramentas mais utilizadas para compreender sua taxonomia e relações evolutivas.

Citogenética é a área da genética que estuda os cromossomos, contribuindo com diversas áreas da biologia, tais como, ecologia, biologia médica, evolução e taxonomia. A citogenética evolutiva estuda a variabilidade genética, conservação e evolução dos cromossomos. Dados citogenéticos auxiliam a caracterizar e esclarecer os eventos evolutivos de um grupo e sua taxonomia.

A família Heptapteridae é a terceira maior família da ordem dos Siluriformes. Seus espécimes possuem o corpo nu, morfologia e hábitos alimentares semelhantes. O gênero mais controverso desta família é o gênero *Rhamdia*. Ele é formado por apenas 11 espécies, classificados por morfologia interna dos seus representantes, sendo a espécie *Rhamdia quelen* a mais estudada.

Atualmente, *R. quelen* possui mais de 40 espécies sinônimas, com diferentes nomes aplicados ao mesmo táxon. A ampla distribuição e qualidade da carne tornaram o bagre, nome popular do *R. quelen*, o segundo mais cultivado na aquicultura brasileira. Os exemplares possuem número diploide de 58 cromossomos, ausência de cromossomos sexuais e com ocorrência de cromossomos Bs, em ambos os sexos. As diferenças na morfologia, tamanho e heterocromatina dos cromossomos Bs descritos. A morfologia dos exemplares encontrados em regiões geográficas diferentes indicam que essa espécie é na verdade um complexo de espécies.

Exemplares de *R. quelen* estudadas na região do Triângulo Mineiro apresentaram diferenças quando comparadas as espécimes descritos em outras regiões do Brasil, sendo a ictiofauna da região do Triângulo Mineiro ainda é pouco conhecida e estudada. O Triângulo Mineiro é drenado pelas bacias

hidrográficas dos rios Araguari e Tejuco, o segundo maior afluente do rio Paranaíba. A bacia do rio Araguari abrange a porção leste do município de Uberlândia, tendo como principal afluente o rio Uberabinha, que travessa da cidade de Uberlândia (MG). O rio Uberabinha, na zona rural, é abastecido pelo rio das Pedras.

As ações antrópicas na microrregião de Catalão (GO) e do Triângulo Mineiro representam impacto para o ecossistema aquático. Os parâmetros físico-químicos para determinar a qualidade de água ainda são insuficientes, pois não levam em consideração as reações biológicas.

Para uma completa avaliação do ambiente é necessário conhecer os efeitos dos contaminantes *in vivo*, sendo assim o monitoramento biológico é essencial. As regiões em crescimento urbano e industriais são mais susceptíveis à contaminação dos córregos e dos rios devido a pouca fiscalização e monitoramento. Estudos realizados na cidade de Uberlândia com *R. quelen* mostraram que a ictiofauna nativa é uma importante ferramenta para o monitoramento e detecção de contaminantes genotóxicos nesses locais.

Espécies como *Astyanax altiparanae* e *Astyanax fasciatus*, amplamente distribuídos pelo território brasileiro, são considerados onívoros e nectônicos. Na região estudada estes espécimes são usados para alimentação da população ou como isca, juntamente, com a espécie *Characidium fasciatum*, que possui hábito bentônico e apesar de ser considerado um peixe ornamental, possui autorização para ser utilizado na aquicultura.

O presente estudo visa analisar citogeneticamente espécimes de *R. quelen* a fim de auxiliar na sua sistemática e a problemática da poluição dos ecossistemas aquáticos da microrregião do Triângulo Mineiro e Catalão (GO).

## Capítulo I: Fundamentação Teórica

### ***Citogenética de peixes neotropicais***

A citogenética é uma ciência multidisciplinar com técnicas baseadas nos avanços teóricos e técnicos da biologia celular e molecular, citometria e bioinformática. A citogenética auxilia nas elucidações de dúvidas evolutivas e filogenéticas (ROBINSON; YANG, 2012), além de ser uma importante ferramenta para diagnósticos e selecionamento de embriões (FRAGOULI *et al.*, 2013). A citogenética aborda análises do cromossomo isolado ou em conjunto, estuda sua replicação, organização, função, possíveis variações e evolução. Logo, a citogenética pode ser definida como a ciência dos cromossomos, que inclui não só seu comportamento durante a interfase e divisão celular, como também o estudo das suas características microscópicas e moleculares (GUERRA, 1988).

Mais de um milhão de análises citogenéticas são realizadas por ano. Na área da medicina, análises citogenéticas são rotineiras, auxiliando no diagnóstico de pacientes com mal formações, câncer e problemas reprodutivos (GERSEN; KEAGLE, 2005). Na citogenética clássica, variações numéricas, morfológicas, comportamento meiótico e conteúdo de DNA, são importantes ferramentas para análises taxonômicas (GUERRA, 1988). O auxílio da citogenética nessa área deve-se à relação evolucionária entre estrutura e número de cromossomos com as espécies (O'BRIEN *et al.*, 2006 *apud* ROBINSON; YANG, 2012). Extensos trabalhos desenvolvidos no campo da citogenética animal, principalmente, na região neotropical proporcionaram o aumento do conhecimento de várias espécies (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

A região neotropical possui a maior diversidade de ictiofauna do mundo, com aproximadamente 6000 espécies catalogadas que representam 20-25% de todas as espécies descritas no mundo (REIS *et al.*, 2003). A vasta rede hidrográfica brasileira abriga uma grande parte dessa biodiversidade. A ictiofauna nativa está distribuída pelas 12 regiões hidrográficas e possui uma importância econômica, ecológica e evolutiva.

A maior parte dos estudos de citogenética se concentra nos peixes, pois eles possuem uma posição chave para o conhecimento da filogenia de

vertebrados, auxiliando a determinar as linhas evolutivas da superclasse Tetrapoda. Deste modo, o estudo evolutivo de peixes assume grande importância biológica. São descritos citogeneticamente 1962 espécies de Characiformes, 2214 Siluriformes, 572 espécies de Perciformes, destas ordens, mais do que a metade das espécies descritas pertencem à família Characidae, Loricariidae e Cichlidae (REIS *et al.*, 2003).

Os conhecimentos citogenéticos da ictiofauna, além de auxiliarem na classificação e compreensão da dinâmica evolutiva, são importantes ferramentas para determinação dos impactos ambientais e antropológicos nas espécies. Apesar do valor científico dos estudos citogenéticos poucas espécies neotropicais são estudadas. As análises se concentram em 475 espécies de Characiformes, 318 das espécies de Siluriformes e 48 de Gymnotiformes (OLIVEIRA *et al.*, 2009). Nas espécies estudadas, a determinação do número diploide e técnicas de estruturação de cromossomos, possibilitam um conhecimento mais profundo (TORRES-MARIANO, 2001), como a descrição de cromossomos Bs em 38 espécies e cromossomos sexuais em 62, sendo a fêmea como sexo heterogamético em 40 espécies e 22 espécies possuem os indivíduos machos heterogaméticos (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Os primeiros estudos citogenéticos foram realizados em Characidae, com o gênero *Astyanax* (JIM; TOLEDO, 1975 *apud* OLIVEIRA *et al.*, 2009), seguido da primeira descrição de Siluriformes com o controverso grupo *Pimelodidae* (TOLEDO; FERRARI, 1976).

Há uma grande diversidade cromossômica no grupo de peixes. A extensiva variabilidade não ocorre apenas nos rearranjos cromossômicos, mas também no número diploide. A família Rivulidae possui o exemplar com o menor número diploide já descrito, ( $2n=20$ ) na espécie *Pterolebias longipinnis*. O maior número diploide é encontrado no grupo dos Siluriformes para *Corydoras aeneus* com  $2n=134$  (ARTONI *et al.*, 2000). O gênero *Corydoras* apresenta uma variação interna, com espécies descritas contendo  $2n=46$ , em *C. arcuatus*, *C. trilineatus* e *C. schwartzi*,  $2n=62$  é encontrado em *C. cf. simulatus* e *C. simulatus*, já a espécie de *C. reticulatus* possui  $2n=74$  e *C. metae*  $2n=92$  (OLIVEIRA *et al.*, 1992) até o máximo observado em *Corydoras aeneus*.

Alguns grupos possuem uma menor variabilidade, ou seja, apresentam o número diploide conservado, como observado em várias espécies de Curimatidae, Prochilodontidae, Parodontidae e Anostomidae que apresentam  $2n=54$  com cariótipos constituídos principalmente por cromossomos meta e submetacêntricos. Subfamílias de Characidae exibem uma conservação em relação ao número diploide igual a 50 (MARGARIDO, 1995). Na ordem de Siluriformes, a nova família Heptapteridae apresenta o número diploide basal de 58 (GARCIA *et al.*, 2010) e o gênero *Pimelodus* como  $2n=56$  (SWARÇA *et al.*, 2013). No entanto, em uma das famílias mais antigas e estudadas dos Siluriformes, Loricariidae há ampla variação no número diploide, desde  $2n=36$  nos Loricariinae, *Rineloricaria latirostris*, até  $2n=80$  nas espécies Hypostominae (ARTONI; BERTOLLO, 2001; KAVALCO *et al.*, 2005). Desse modo, os rearranjos dos cromossomos atuam como divergentes na evolução.

Nos vertebrados as fusões cêntricas emergem como um processo potencialmente importante na evolução cariotípica (KAVALCO *et al.*, 2005). Também são observadas fissões cêntricas e translocações Robertsonianas, principalmente fusão de dois cromossomos acrocêntricos formando um metacêntrico. Responsável pelas diversificações cariotípicas numéricas e morfológicas sem alterar o número fundamental (número de braços dos cromossomos) como já observado em Characiformes, na família Curimatidae, em *Potamorhina altamazonica* e *Potamorhina latior* (FELDBERG, 1990). Isto não exclui a ocorrência de outros rearranjos cromossômicos na história evolutiva do grupo. Na família Callichthyidae, a subfamília Callichthyinae possui 8 vezes mais DNA quando comparada com a subfamília Corydoradinae (OLIVEIRA *et al.*, 1992). Esse aumento mostra a importância da poliploidia para a especiação.

Poliploides são espécimes com três ou mais cromossomos homólogos ao contrário de apenas dois lotes gênicos encontrados nos indivíduos normais. A poliploidia pode ser dividida em dois tipos: autopoliploidia, onde os lotes cromossômicos são originários da mesma espécie e aloploidia, onde o indivíduo possui lotes cromossômicos de espécies diferentes, ou seja, há uma hibridização interespecífica. Indivíduos aloploidos são mais comuns que autopoliploides. As espécies com aloploidos estabelecidos ocorrem onde

seus diploides não são encontrados (BROCHMANN *et al.*, 2004; PAUN *et al.*, 2011). Sendo assim, a poliploidia é um importante mecanismo de especiação por hibridação, pois cria uma barreira reprodutiva entre os indivíduos híbridos e seus parentes.

Nos vertebrados a poliploidia é considerada um evento raro, porém nos peixes há relatos na espécie *Astyanax shubarti* (MORELLI *et al.*, 1983), na família Poeciliidae nos gêneros *Poecilia* e *Poeciliopsis*, (QUATTRO *et al.*, 1992; SOLA *et al.*, 1993) e no gênero *Rhamdia* dos Siluriformes (TSUDA *et al.*, 2010; FUKUSHIMA *et al.*, 2012). Em estudos citogenéticos em triploides de *Eigenmania* sp. (ALMEIDA-TOLEDO *et al.*, 1985), *Astyanax scabripinnis* (MAISTRO *et al.*, 1995), e *Trichomycterus davis* (BORIN; MARTINS-SANTOS, 2000) mostraram atividade normal dos genes ribossomais. Apesar dessa aparente normalidade gênica, pode haver distribuições diferentes tornando os genótipos incompatíveis. Reforçando as divergências entre as populações, pois mantém suas diferenças e impedindo a troca gênica, o que acarreta em isolamento reprodutivo. A consequência é a formação de ilhas de especiação que favorecem rearranjos que reduzem a recombinação (BARTON, 2013).

O isolamento reprodutivo pode seguir dois caminhos, reforçar o isolamento ou formar locais de especiação com híbridos, os quais são responsáveis por introduzir alelos na população. A seleção sobre os indivíduos híbridos é maior em populações submetidas a estresse. Os genótipos híbridos que podem se estabelecer são aqueles que, além de adaptados ao ambiente, podem formar populações distintas, reprodutivamente isoladas de seus parentes (ABBOTT *et al.*, 2013).

Deste modo, o isolamento reprodutivo devido às ações antropológicas, como a construção de barragens e rodovias, desmatamento, introdução de espécies e crescimento industrial, possuem implicações maiores do que o desaparecimento de espécies. Essas ações podem iniciar um processo de especiação devido ao tamanho reduzido das populações. A estrutura populacional das espécies estudadas influenciam a manutenção ou variabilidade do cariótipo das mesmas. Populações pequenas e com pouca mobilidade apresentam uma maior variabilidade quando comparadas com

populações grandes e com poder de dispersão (MAISTRO, 1996), pois nessas não há populações divergentes que impeçam o fluxo gênico (BARTON, 2013).

### ***Marcações e Bandeamento Cromossômico***

#### ***Regiões Organizadoras de Nucléolo (NORs)***

Em eucariontes superiores, nas regiões organizadoras de Nucléolos (NORs) ocorrem cístrons repetidos em tandem. Os genes que formam os cístrons são responsáveis pelas transcrições de um RNA ribossômico precursor (pré-rRNA) e uma região conhecida como espaçador intergênico (IGS), que é transcrito em um RNA instável e abortado (MESTRINER, 1993). Os segmentos dos RNAs ribossômicos 18S, 5,8S e 28s, intercalados por quatro regiões espaçadoras, são formados por moléculas de rRNA precursor, que possui um coeficiente de sedimentação de 45S.

As moléculas produzidas permanecem vizinhas ao DNA ribossômico (rDNA) que se combinam com várias proteínas para formar as subunidades ribossomais. Esse conjunto de moléculas ao redor do rDNA é o responsável pela produção de uma região com coloração mais intensa no núcleo, o nucléolo. Com a condensação dos cromossomos, durante a metáfase, os genes ribossômicos param suas atividades, o que provoca o desaparecimento dos nucléolos. A técnica de marcação com solução de nitrato de Prata permite visualizar as regiões organizadoras de Nucléolos, que estavam ativas na interfase anterior. A Prata combina-se com as proteínas presentes ao redor dos genes ribossômicos e não com o próprio DNA, sendo assim, (HSU *et al.*, 1975). As características dessas regiões podem auxiliar no maior entendimento dos sistemas evolutivos de diferentes espécies e as possíveis variações individuais.

A metilação do DNA é a chave do mecanismo de regulação da expressão gênica. Há mudança dos padrões de metilação que estão ligados com a atividade das regiões organizadoras de Nucléolos. Diferenças na atividade transcricional dos genes para rDNA é geralmente evocada para explicar o heteromorfismo de NORs (DIMITROVA *et al.*, 2012). Outra explicação é a ocorrência de rearranjos desiguais entre cromossomos homólogos, possuidores de NOR, que se fixam na população provocando o heteromorfismo. Em algumas espécies pertencentes à família Scianidae, a

evolução deve ter ocorrido primeiramente na localização e tamanho da NOR. (FELDBERG et al., 1999). Isto significa que os genes ribossomais tem um importante papel na plasticidade cariotípica do grupo

Alguns grupos de peixes apresentam a NOR em um único par cromossômico (Curimatidae, Anastomidae, Prochilodontidae e Cichlidae), outros possuem NORs múltiplas (Lebiasinidae, Loricariidae, Erythrinidae e Callichthyidae), incluindo no cromossomo sexual (VALENTIM et al., 2013). A presença de NOR simples e múltiplas é observada em Characidae e na Ordem Gymnotiformes (BALEN et al., 2013, MILHOMEM et al., 2013, PISCOR et al., 2013). A NOR simples, em apenas um par de cromossomos, é considerada primitiva em relação à NOR múltipla, entretanto, a heterogeneidade observada dentro de um mesmo gênero, como *Gymnotus*, sugere que a composição do grupo não é monofilética. Desta forma, não se pode afirmar qual o tipo de NOR é primitiva ou derivada, uma vez que uma espécie pode ter origem e composição divergente das outras espécies (MILHOMEM et al., 2013). A NOR pode ser detectada diretamente com a hibridização fluorescente *in situ* (FISH) com sondas específicas, ou indiretamente com o uso de nitrato de Prata (Ag-NOR) (KAVALCO et al., 2005).

Em *Rhamdia* sp. observou-se uma marcação de Ag-NORs no braço curto de um par subtelocêntrico, correspondendo ao par 27. Em alguns casos constatou-se um heteromorfismo do tamanho das NORs entre os dois homólogos (CENTOFANTE, 2003). A presença de um par cromossômico submetacêntrico portador de cístrons ribossômicos, na extremidade do braço curto também foi observada (ANDRADE et al., 1998). Um terceiro cromossomo é ocasionalmente marcado na porção terminal do braço longo. Em *Rhamdia quelen*, Garcia (2010) verificou Ag-NORs simples localizadas no braço curto do par cromossômico submetacêntrico.

### **Marcações das regiões de Heterocromatina**

O empacotamento do DNA em cromatina não só é decisivo para a compactação física do genoma dentro do núcleo, mas desempenha um importante papel no acesso do DNA para regulação transcricional, replicação e reparo de eventuais danos. Diferentes graus de compactação são observados

no núcleo (GONZALEZ-SANDOVAL *et al.*, 2013). A heterocromatina pode ser constituída de DNA satélite, um DNA altamente repetitivo (HSU *et al.*, 1975), e é densamente corada, possui a característica de replicação tardia e silenciamento gênico (MEISTER *et al.*, 2013 *apud* GONZALEZ-SANDOVAL *et al.*, 2013). A heterocromatina pode ser dividida em facultativa e constitutiva. A heterocromatina facultativa é a cromatina que se condensa e obtém características de heterocromatina constitutiva, e pode apresentar-se descondensada como eucromatina. Já a constitutiva permanece condensada durante todo o ciclo celular e em todas as células. Ela aparece em blocos e em ambos os homólogos (GUERRA, 1988).

A heterocromatina possui um papel importante na análise da diversidade cariotípica dos peixes. A macroestrutura cariotípica é relativamente constante, mas existem variações ressaltadas nas diferentes espécies. A heterocromatina também serve como um importante detector de polimorfismos, caracterizando variações intra-populacionais em algumas espécies da ictiofauna (MANTOVANI, 2000).

Em espécies de Loricariidae dois padrões de heterocromatinas são observados. Um grupo apresenta menos heterocromatina localizada nas regiões do centrômero e/ou telômero, enquanto o outro grupo possui grande número de heterocromatina nessas regiões, assim como em segmentos intersticiais em vários cromossomos acrocêntricos (ARTONI; BERTOLLO, 1999 *apud* ARTONI; BERTOLLO, 2001). O primeiro grupo está associado com as espécies que possuem um menor número diploide, enquanto o segundo foi observado em espécies com maior número diploide. Artoni e Bertollo (2001) sugerem haver uma relação entre o número diploide e as heterocromatinas contidas nos centrômeros e telômeros. Isso pode demonstrar uma mudança interessante na heterocromatina paralela à fissão cêntrica, pois a quebra cromossômica gera instabilidade que proporciona o aumento de DNA repetitivo e a expansão da heterocromatina.

As heterocromatinas localizam-se predominantemente nas regiões teloméricas e centroméricas, existindo também marcações intersticiais que apresentam polimorfismos. Os pequenos cromossomos apresentados pelo grupo dos Siluriformes, assim como, a pouca quantidade de heterocromatina,

que tornam as bandas pálidas, dificultam a correta descrição de heterocromatina nesse grupo (GARCIA, 2005).

A ocorrência de regiões de heterocromatina ricas em GC adjacentes ou espalhadas no meio das NORs é descrita em muitos organismos. Outras regiões de heterocromatinas ricas em GC não associadas com as NORs foram vistas em *Neivamyrmex microps* e *Ursinus* sp. (KAVALCO *et al.*, 2004) e em *Hoplias* cf. *lacerdae* (MORELLI, 1998), representando fatos raros em peixes. Regiões ricas em A-T, também representam um fato raro nos peixes, foram descritos casos em espécies de *Hypostominae* (KAVALCO *et al.*, 2004).

No gênero *Pimelodus* a distribuição da heterocromatina constitutiva limita-se às regiões teloméricas e centroméricas, podendo ou não conter uma pequena banda intersticial. A heterocromatina está mais presente as partes terminais dos cromossomos de *Pimelodus* sp., enquanto em *P. ortmani* as áreas centroméricas são mais marcadas. Padrões de heterocromatina permitiram verificar, nesta espécie, uma marca espécie específica, no braço curto do par 16 (BORIN; MARTINS-SANTOS, 2004). Fenocchio e Bertollo (1992) detectaram heterocromatina intersticial no primeiro par de acrocêntricos de *P. tigrinum*, contrariando a característica dos cariótipos dessas espécies de mostrarem quase total ausência de bandas de heterocromatina intersticiais.

Desta forma estudos da distribuição das heterocromatinas permitem, muitas vezes, identificar padrões de evolução ocorridos no cariótipo da espécie.

### **Citogenética da família Heptapteridae**

O conhecimento citogenético dos peixes aumentou. Apesar disto, alguns grupos são pouco estudados ou só possuem dados superficiais. Um desses é o das espécies da ordem Siluriformes, em que aproximadamente 15% das espécies tem alguma análise citogenética. Os Siluriformes são uma ordem com várias famílias neotropicais, um grande número de espécies que possuem importância econômica (FENOCCHIO; BERTOLLO, 1992).

Estudos com os Pimelodidae mostram que muitas espécies apresentam 56 cromossomos, apesar do número diploide variar de 46 a 63. Estes dados predominam na maioria das espécies contidas nas subfamílias Sorubiminae e Pimelodinae (FENOCCHIO; BERTOLLO, 1990, 1992; VALCARCEL *et al.*,

1993; RAMIREZ-GIL *et al.*, 1998; ABUMARCA; MARTINS-SANTOS, 2001; SÁNCHEZ *et al.*, 2000; STIVARI; MARTINS-SANTOS, 2004; SWARÇA *et al.*, 2000, 2003; VASCONCELOS-MARTINS-SANTOS, 2000; MAISTRO *et al.*, 2002; SWARÇA *et al.*, 2006). A posição taxonômica da subfamília Pimelodidae é muito confusa e cheia de controvérsias. Estudos de sistemática filogenética modificaram a classificação dividindo a família Pimelodidae em três famílias: Pimelodidae, Heptapteridae e Pseudopimelodinae (PINNA, 1993 *apud* GARCIA, 2005). A nova família Heptapteridae possui aproximadamente 24 gêneros, 190 espécies e 52 prováveis novas espécies (<http://silurus.acnatsci.org/ACSI/taxa/Families.html>), sendo a terceira maior família em número de espécies da ordem dos Siluriformes. A evolução cariotípica entre as duas subfamílias é mais divergente que uniforme.

A antiga família Rhamdiidae possui uma grande diversidade cariotípica, enquanto os Pimelodidae são mais constantes, amparando a decisão de elevar à subfamília os membros do gênero *Rhamdia* (SWARÇA *et al.*, 2000). Alguns gêneros da antiga família Pimelodidae que incluem *Pimodella*, *Rhamdia*, *Imparfinis*, *Cetopsorhamdia* e *Rhamdella*, foram agrupados na nova família Heptapteridae (Rhamdiidae), baseadas em características morfológicas e genéticas (SWARÇA *et al.*, 2000).

Uma análise de dados de diferentes espécies das subfamílias Pimelodidae e Heptapteridae (Rhamdiidae) identifica que de um total de 300 espécies, apenas 33 foram caracterizadas citogeneticamente. Os cariótipos de espécies de alguns gêneros mostraram uma grande variabilidade quanto ao número cromossômico (SWARÇA *et al.* op cit.). Oliveira *et al.* (1988) propõem que a extensiva variabilidade cariotípica entre as duas subfamílias sugere um reajuste cromossômico responsável pela especiação deste grupo. O principal rearranjo cromossômico responsável pela redução do número diploide em *Pimelodella* parece ser a translocação robertsoniana (VASCONCELOS; MARTINS-SANTOS, 2000). Entretanto, surgem rearranjos através de deleções como observado durante a diferenciação do sistema sexual cromossômico em *Pimelodella* sp (DIAS; FORESTI, 1993).

O gênero *Pimelodella* apresenta um número diploide de 46 a 58 cromossomos (SILVA *et al.*, 1996; VASCONCELOS; MARTINS-SANTOS,

2000). Espécies como *Pimelodella meeki* (GARCIA *et al.*, 2010), *P. notomelas*, *P. avanhandavae* (VISSOTO *et al.*, 1999), *P. gracialis*, *P. boschmai* (GARCIA *et al.*, 2010) e *Pimelodella* sp1. (VASCONCELOS; MARTINS-SANTOS, 2000) possuem o menor número diploide ( $2n=46$ ) descrito para o gênero. Contudo, espécies próximas a essas, como *Pimodella* sp2. (VASCONCELOS; MARTINS-SANTOS, 2000), *Pimelodella* aff. *avanhandavae* (SWARÇA *et al.*, 2003) e *P. taenioptera* (SOUZA-SHIBATTA *et al.*, 2013) apresentam  $2n=52$ . *Pimelodella transitory*, *Pimelodella kronei* (ALMEIDA-TOLEDO *et al.*, 1992 *apud* VIDOTTO *et al.*, 2004) e *P. lateristriga* (GARCIA *et al.*, 2010) apresentam  $2n=58$ . A NOR basal desse grupo é nos braços curto de um cromossomo submetacêntrico. Estudos recentes observaram cromossomos sexuais, sistema XY, para *P. boschmai* e cromossomo B para *Pimelodella* sp. (GARCIA *et al.*, 2010).

*Cetopsorhamdia* possui apenas 8 espécies conhecidas, e três estudadas citogeneticamente, *Cetopsorhamdia iheringi* (VISSOTO *et al.*, 1999, FENOCCHIO *et al.*, 2003), e *Cetopsorhamdia* sp. (FENOCCHIO *et al.*, 2003), todas possuindo 58 cromossomos. A NOR é simples e intersticial, entretanto o cromossomo portador da NOR é determinante para cada população. *Cetopsorhamdia iheringi* do rio Capiva e Pardo (SP, Brasil) possui NOR em um cromossomo submetacêntrico, enquanto a população de do rio Marrecas (SP, Brasil) e do estado de Minas Gerais a NOR está em subtelocêntrico. (FENOCCHIO *et al.*, 2003).

O gênero *Imparfinis* é um dos poucos gêneros definidos sistematicamente da família Heptapteridae, com 20 espécies e uma espécie nova. Entretanto, apenas seis espécies possuem o número diploide descrito. A primeira descrição citogenética do gênero foi para  $2n=52$  em *Imparfinis piperatus* (EIGENMANN; NORRIS, 1900 *apud* KANTEK *et al.*, 2009) e a espécie próxima *Imparfinis* cf. *piperatus* com  $2n=56$  (VISSOTO *et al.*, 2001). O número máximo relatado é de 58 cromossomos para *Imparfinis mirini* (VISSOTO *et al.*, 1997 *apud* VISSOTTO *et al.*, 2001), *Imparfinis piperatus* (VISSOTO *et al.*, 2001) e *Imparfinis shubarti* (KANTEK *et al.*, 2009). O menor número diploide relatado é de  $2n=42$  em *Imparfinis hollandi* (MARGARIDO; MOREIRA-Filho, 2008). A diminuição do número de cromossomo dentro do

grupo e comparado com os demais gêneros da família, devido a sinapomorfia do grupo (FENOCCHIO *et al.* 2003). Essa hipótese é reforçada pela localização da NOR nas espécies desse gênero, do par 1 para outros pares nas espécies como menor número de cromossomos (KANTEK *et al.*, 2009).

*Rhamdella microcephala*, coletadas em Minas Gêrias (Brasil), é a única espécie estudada do gênero *Rhamdella*, a qual possui  $2n=56$  cromossomos, com 18 metacêntricos, 30 submetacêntricos e 8 subtelocêntrico/acrocêntrico. A região organizadora de Núcleo (NORs) foi identificada na posição intersticial do braço longo do par submetacêntrico (FONSECA *et al.*, 2003). Exemplos de *Heptapterus longicauda* exibiram 52 cromossomos (VISSOTO *et al.*, 1999) e NOR múltipla, tal qual, *Heptapterus mustelinus* que possui  $2n=54$ . Espécies pouco documentadas como *Phenacorhamdia tenebrosa* e *Taunaya bifaciata*, ameaçada de extinção, possuem o número basal de cromossomos para família, de 58 cromossomos.

Os estudos citogenéticos realizados nas espécies do gênero *Rhamdia* mostram a complexidade desse gênero. *Rhamdia hilarii* foi descrita tendo  $2n=58$  a  $2n=63$  (FENOCCHIO; BERTOLLO, 1990, FENOCCHIO *et al.*, 2000, FENOCCHIO *et al.*, 2003). As espécies *Rhamdia* sp. e *Rhamdia laticauda* possuem  $2n=58$  (LE GRANDE, 1981), *Rhamdia branneri* foi descrita com  $2n=58$  a 62. *Rhamdia quelen* apresenta de 56 a 65 cromossomos (GONZALES, 1994 *apud* JORGE; SÁNCHEZ, 2005; ABUCARMA; MARTINS-SANTOS, 1996; JORGE; SEBASTIÁN, 2005, GUILHERME, 2005, de CAMPO JUNIOR, 2011). A grande variação de  $2n=58$  a  $2n=65$  cromossomos foi descrita na população de *Rhamdia quelen* do rio Uberabinha em Uberlândia-MG (GUILHERME, 2005, De CAMPOS JUNIOR, 2011), sendo que sete cromossomos mostravam-se bastante heterocromáticos quando tratados com a técnica de banda C (GUILHERME, 2005). Os cromossomos dos peixes deste gênero são muito pequenos, sendo frequente a presença de dois braços, consequentemente o número fundamental é alto, mais de 100.

A variação no grupo é atribuída à presença de cromossomos supranumerários. No entanto o número diploide mais comum nesse gênero é de 58. A variação do número fundamental nestas espécies de 78 a 116. Algumas dessas variações podem ocorrer devido a diferentes graus de

condensação cromossômica, levando a diferentes classificações de acordo com o autor. Outras razões podem ser rearranjos sofridos, como inversões, acarretando polimorfismos (SWARÇA *et al.*, 2000).

Cromossomos sexuais foram observados somente em Heptaperidae, sendo que *Pimelodella* sp., os machos são heterogaméticos, com o sistema XX/XY (DIAS; FORESTI, 1993) e a nova espécie estudada *P. boschmai* GARCIA *et al.*, 2010) e em *Imparfinis mirini*, aonde as fêmeas são heterogaméticas, com o sistema ZZ/ZW (VISSOTTO *et al.*, 1997 *apud* SWARÇA *et al.*, 2003).

A NOR simples no braço curto é a característica basal da família Heptapteridae, porém há presença de NOR intersticial *Rhamdia* (SILVA, 2007), *Imparfinis*, *Taunaya* e *Phenacorhamdia tenebrosa* (BORBA *et al.*, 2012) e terminal do braço longo foi observado (BORBA *et al.*, 2012). A ocorrência de citótipos diferentes de NOR pode ser explicada por uma sucessão de eventos como deleção e inversão, o que possibilita a manutenção do número diploide. Os eventos deletérios forçaram o submetacêntrico para subtelocêntrico e um processo de inversão mudou para posição intersticial (SILVA, 2007), após mais um processo de inversão para posição final (BORBA *et al.*, 2012). A presença de NORs múltiplas é um evento isolado do gênero *Heptapterus*, no braço curto, e de *Rhamdia* sp. e *R. branneri*, sinônimo de *R. quelen*, no braço longo (ABUCARMA; MARTINS-SANTOS, 2001) (Figura 1).

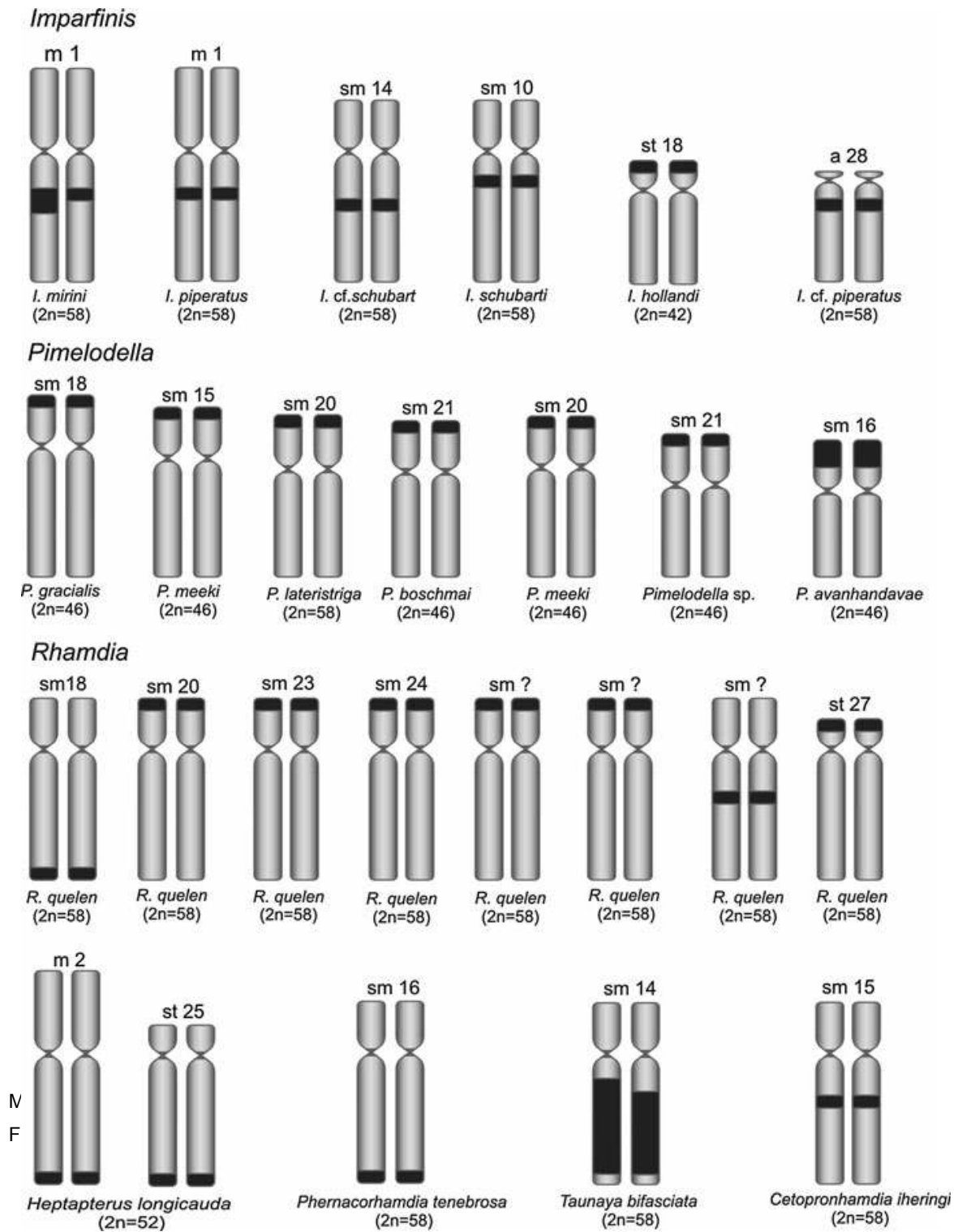


**Figura 1:** Ideograma representativo das variabilidades de NOR em Heptapteridae. Morfologia dos cromossomos: m metacêntrico; sm submetacêntrico; st sutelocêntrico, a acrocêntrico. Fonte: Borba et al., 2012.

## **Cromossomos B**

O genoma dos eucariotos é altamente redundante, as sequências não codificadoras são abundantes e suas funções permanecem um mistério. Pesquisas recentes mostram que esse DNA não codificante na verdade possui um importante papel na regulação gênica (HOUBEN *et al.*, 2013), para outros pesquisadores o DNA não codificador é responsável por acumular mutações no material genético (GEMAYEL *et al.*, 2012), esse tipo de DNA possui um papel evolutivo, pois pode funcionar como reservatório para criação de outras moléculas funcionais (PENNISI, 2012).

Entre os DNAs não codificantes, os cromossomos Bs são um dos representantes mais interessantes. Esse material genético é um cromossomo adicional, não pertencente ao lote normal da espécie, ou seja, o lote A, desse modo recebe o nome de cromossomo B. A ocorrência de cromossomos B foi descrito nos três reinos dos eucariotos: Fungi, Plantae e Animalia (HOUBEN *et al.*, 2013).

Os cromossomos B podem ser distinguidos do lote principal por não exibirem herança mendeliana (BEUKEBOOM, 1994, JONES, 1995). Durante a mitose, esses cromossomos possuem um comportamento diferente: Eles não se segregam normalmente, gerando uma variação inter e intra-individual (BEUKEBOOM, 1994). A frequência observada desses cromossomos em células meióticas é alta, entretanto não há pareamento durante a meiose.

Devido a sua composição por DNAs repetitivos e não codificantes (CAMACHO, 2005), a maioria dos cromossomos B é heterocromática (JONES; REES, 1982). A origem dos cromossomos B é um mistério. Uma das possíveis origens do cromossomo B é o próprio lote A. Quebras e fusões nos cromossomos A em algumas espécies ou em resposta a uma nova condição genômica após a hibridização interespecífica poderiam originar o cromossomo B. A comprovação da derivação do cromossomo B do lote principal, em análises moleculares, mostrariam uma sequência similar e repetitiva com os cromossomos do lote A. Porém, a técnica de microdissecação mostrou que as sequências visualizadas em cromossomo B de *Crepis capillaris* estavam presentes no lote A, mas não foi possível identificar de qual cromossomo esse elemento se originou (CAMACHO *et al.*, 2000). A falta de similaridade completa

com apenas um cromossomo, sugere que a origem do cromossomo B é multicromossomal ou/e após a separação do lote A esses cromossomos seguiram sua própria linha evolutiva (HOUBEN *et al.*, 2013).

Duplicações, segregações não balanceadas de pequenas translocações e inserções restringem a recombinação do cromossomo B com o seu cromossomo de origem do lote A, pois não há tantos parâmetros homólogos. A restrição da recombinação pode ser considerada o começo da independência evolutiva. Porém, devido aos seus múltiplos rearranjos, os cromossomos B podem realizar recombinação com diferentes cromossomos do lote A (Figura 2) (MARTIS *et al.*, 2012).

Pesquisas realizadas em grupos diferentes, como centeio (MARTIS *et al.*, 2012) e canídeos selvagem, mostraram as múltiplas origens dos cromossomos B. Além das cópias obtidas dos cromossomos A, o cromossomo B possuía sequências repetitivas e inserções oriundas do DNA mitocondrial (Figura 2) (BASHEVA *et al.*, 2010). Essa grande capacidade de incorporar e manter genes de diferentes origens torna o cromossomo B uma “esponja genômica” (MARTIS *et al.*, 2012).

Análises recentes em dois gêneros de centeio mostraram a presença de elementos móveis *Gypsy* e *Copia* nos cromossomos A e B, esses elementos são ancestrais do retrotransposon *Sabrina* (SHIRASU *et al.*, 2000), descrito em outros gêneros de gramíneas (LEIGH *et al.*, 2003, BENTO *et al.*, 2010), presentes em maior quantidade no lote A. O retroelemento *Revolver*, também é derivado do *Copia* e possui o seu maior número de sequências nos cromossomos B (TOMITA *et al.*, 2008). Sequências do peixe originário da Europa, *Alburnus alburnus*, mostraram uma grande homologia com retrotransposon do peixe-arroz (*Oryzias latipes*) oriundo do sudoeste asiático e também em *Drosophila* (ZIEGLER *et al.*, 2003).

Análises em heterocromatinas de cromossomo B com marcador de gene ribossomal, 18S rDNA e sequência de elementos repetitivos, mostraram semelhanças de *H. obliquidens* com outros ciclídeos, *Haplotaxodon microlepis* e *O. niloticus* (POLETTI *et al.*, 2010), cujo os elementos são originários de *Danio rerio*. A presença de retrotransposon foram descritas em diferentes grupos, plantas (MARTIS *et al.*, 2012), vespas (MCALLISTER, 1995,

MCALLISTER; WERREN, 1997) e Characiformes (MESTRINER *et al.*, 2000). Esse fato sugere que esses retrotransposons que auxiliam na constituição do cromossomo B não estão presentes em apenas em uma espécie ou táxon próximo, mas se encontram dispersos em cromossomos B de grupos distantes.

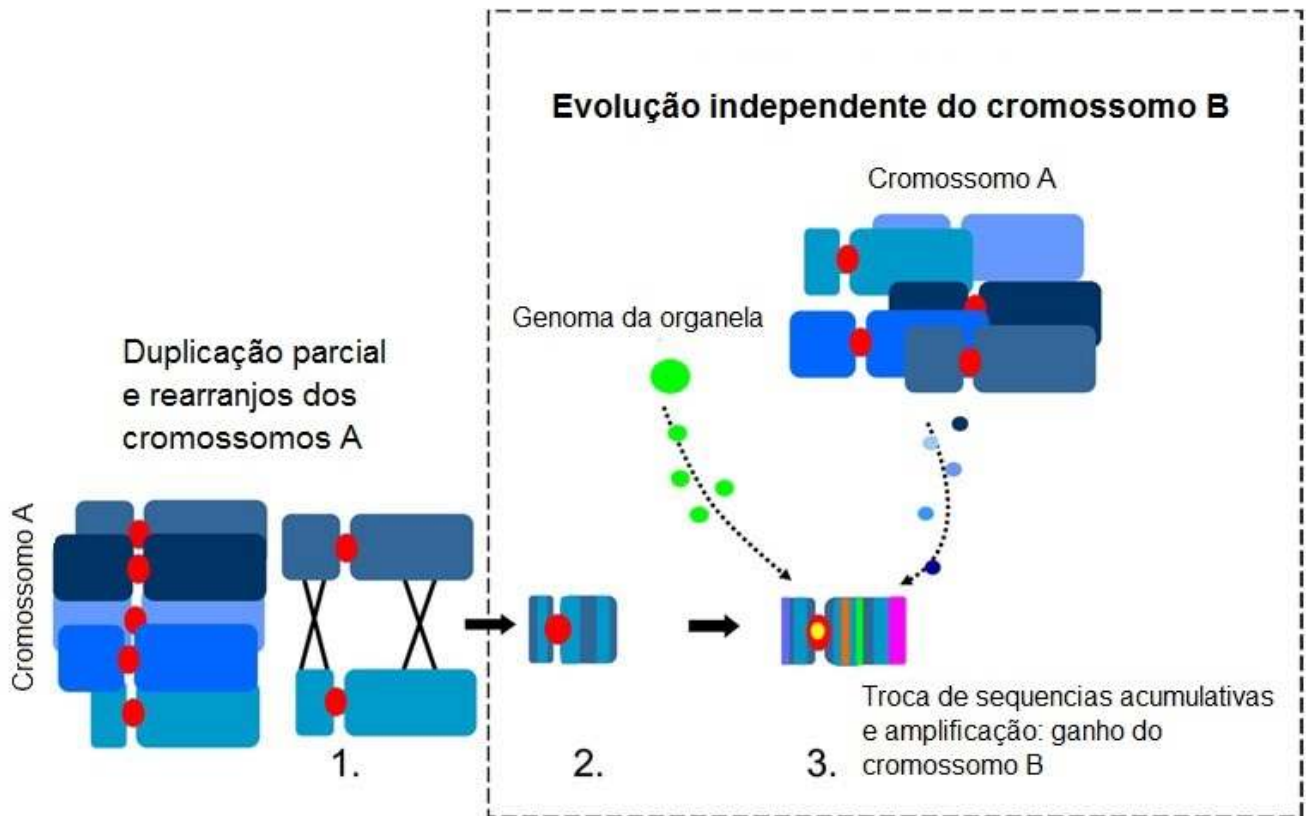


**Figura 2:** Modelo de ganho de sequências e evolução do cromossomo B. (1) Translocação entre cromossomo devido da duplicação de fragmentos resultando em (2) falha no pareamento meiótico A-B e formação do proto-B. (3) acumulação do DNA da organela e fragmentos de DNA derivados do cromossomo A, amplificação de sequências repetitivas específicas B, inativação dos genes derivados do A, formação do cromossomo B. Fonte: Houben *et al.*, 2013

Os cromossomos B possuem sequências dos transposon, e como esses, podem ser considerados DNA egoístas. No entanto, os cromossomos B possuem herança autônoma. Por essas características eles são chamados de cromossomos parasitas (MARTIS *et al.*, 2012). Para o cromossomo B permanecer na população ele necessita manter seus mecanismos de

acumulação de DNA repetitivo (MUÑOZ-PAJARES *et al.*, 2011). Essa adaptação ao longo do processo evolutivo garante a continuidade do cromossomo B, contudo o transforma em outro cromossomo. Camacho *et al.* (2000) classifica o cromossomo B em 9 categorias (Tabela 1). Os cromossomos B tendem a permanecer ou desaparecer da população de acordo com os possíveis efeitos no hospedeiro, grande rejeição, pequena rejeição ou efeitos imperceptíveis. Cromossomos com rápido desaparecimento são considerados neutros (Categoria 5), esse tipo de cromossomo não se encontra em equilíbrio, tendendo a desaparecer principalmente devido a deriva genética (ALMEIDA *et al.*, 2013). Entretanto, outra pesquisa mostra que cromossomo B que se encontra em estágio neutro possui uma maior taxa de transmissão quando comparado com os demais (BLANCO *et al.*, 2012).

Para algumas espécies, a origem estaria nos cromossomos sexuais (CAMACHO *et al.*, 2000, BURT; TRIVERS, 2006), pois os cromossomos sexuais possuem uma maior flexibilidade para suportar um estado de polimorfismo quando comparado com os cromossomos do lote principal (HEWITT, 1973, HOUBEN *et al.*, 2013).

**Tabela 1:** Possíveis resultados da rejeição no genoma fitness do hospedeiro e taxa de estabelecimento do cromossomo B.

| <b>Categoria</b> | <b>Adaptação<br/>ao<br/>hospedeiro</b> | <b>K<sub>B</sub> -0.5</b> | <b>Resultados</b>              | <b>Significância<br/>evolutiva</b> |
|------------------|----------------------------------------|---------------------------|--------------------------------|------------------------------------|
| <b>1</b>         | -                                      | +                         | Polimorfismo de B              | Parasitismo                        |
| <b>2</b>         | -                                      | 0                         | B desaparece                   | -                                  |
| <b>3</b>         | -                                      | -                         | B desaparece                   | -                                  |
| <b>4</b>         | 0                                      | +                         | Polimorfismo de B <sup>a</sup> | Parasitismo<br>atenuado            |
| <b>5</b>         | 0                                      | 0                         | B desaparece                   | Cromossomo B<br>neutro             |
| <b>6</b>         | 0                                      | -                         | B desaparece                   | -                                  |
| <b>7</b>         | +                                      | +                         | Polimorfismo de B <sup>a</sup> | Mutualismo                         |
| <b>8</b>         | +                                      | 0                         | Polimorfismo de B <sup>a</sup> | Mutualismo                         |
| <b>9</b>         | +                                      | -                         | Polimorfismo de B              | Mutualismo                         |

K<sub>B</sub> = Indica a diferença entre a taxa de herança do cromossomo B (K<sub>B</sub>) e da herança mendeliana (0,5)

+ indica acumulação do cromossomo b e - indica a eliminação do cromossomo B

<sup>a</sup> Acumulação infinita é impedida, pois indivíduos com números elevados de cromossomos B possuem fitness reduzido.

Fonte: CAMACHO *et al.*, 2000 com adaptações.

A primeira observação de cromossomos B ocorreu em insetos (WILSON, 1907 *apud* CAMACHO *et al.*, 2000), deste então foi descrito em besouros (OLIVEIRA *et al.*, 2012), gafanhotos (PERFECTTI *et al.*, 2004, MUÑOZ-PAJARES *et al.*, 2011), vespa (LÓPEZ-LEÓN *et al.*, 2008), drosófilas (ZHOU *et al.*, 2012), entre outros. Diversas plantas possuem cromossomos B, tais como pinheiro (HOUBEN *et al.*, 2013) e milho, nesse o número de cromossomos B chega a 34, além do seu número diploide 20 normal (CARLSON; ROSEMAN, 1992).

Nos mamíferos ocorrem em todos os grupos, em humanos está ligada a patologias como o câncer (PEDEUTOUR *et al.*, 1999), problemas cardíacos, intelectuais e obesidade (HOCHSTENBACH *et al.*, 2012). Sua detecção é utilizada para rejeitar embriões no processo da seleção para fecundação *in vitro* (BARTSCH *et al.*, 2005, HUANG *et al.*, 2012). Há relato de 4 cromossomos B em ratos (HOUBEN *et al.*, 2013). Raposas vermelhas chegam a ter até 8 cromossomos B (BASHEVA *et al.*, 2010).

Nos peixes, a presença de cromossomos B tem sido frequentemente observada. Cerca de 38 espécies neotropicais possuem esses cromossomos (OLIVEIRA *et al.* 2009). Em geral, peixes possuem uma variação de 1 a 8 cromossomos B (CAVALLARO *et al.*, 2000). O primeiro relato de cromossomos B em peixes neotropicais foi na espécie *Prochilodus lineatus* (PAULS, BERTOLLO 1983 *apud* VOLTOLIN *et al.*, 2010). Outros pesquisadores descreveram na mesma espécie a presença de cromossomos heterocromáticos e com variações intra-individual, o número de cromossomos B, nesta espécie, variam de acordo com a população estudada (CAVALLARO *et al.* 2000, ARTONI *et al.*, 2006; VOLTOLIN *et al.* 2009).

Há uma grande variação de tamanho dos cromossomos B nos peixes. Os macrocromossomos são descritos para os gêneros *Alburnus* (SCHMID *et al.*, 2006), *Haplochromis* (POLETTTO *et al.*, 2010) e *Astyanax* (MAISTRO *et al.*, 1992, SALVADOR; MOREIRA-FILHO, 1992, VICENTE *et al.*, 1996, MOREIRA-FILHO *et al.*, 2001, FERRO *et al.*, 2003, TORRES-MARIANO, MORELLI, 2008), porém também foram observadas a ocorrência de microcromossomos em *Astyanax* (SANTOS *et al.*, 2013) e em *Prochilodus* sp. (VOLTOLIN *et al.* , 2013). Já os cromossomos de tamanho médio são comuns em *Rhamdia* (Fenocchio *et al.* 2000, CENTOFANTE, 2003, GARCIA, 2005, GUILHERME, 2005).

A ocorrência de cromossomos B heterocromáticos nos peixes são descritas para *Moenkhausia sanctaefilomenae* (FORESTI *et al.* 1989), *Prochilodus* (VOLTOLIN *et al.*, 2010) e em *Rhamdia* (GUILHERME, 2005, MORAES *et al.*, 2009, GARCIA *et al.* 2010, MARTINEZ. *et al.*, 2011), contudo há relatos de cromossomos B eucromáticos no mesmo gênero (ABUCARMA; MARTINS-SANTOS, 2001, MORAES *et al.* 2007, GARCIA *et al.* 2010).

Estudos mostram que cromossomos B possuem replicação tardia em *Astyanax scabripinnis* (MAISTRO *et al.*, 1992). No paquíteno, os cromossomos B permanecem não pareados ou pareados com eles mesmos, como isocromossomos. Os cromossomos B de *R. hylarii* são sub/metacêntricos com distribuição de heterocromatina nas regiões dos telômeros, sua origem é da divisão transversal do centrômero do lote A (MAISTRO *et al.*, 2002). Os padrões encontrados por Stivari e Martins-Santos (2004) de heterocromatina e morfologia dos cromossomos B em 3 espécies de *Rhamdia* confirmaram a hipótese do cromossomo B ser um isocromossomo. A morfologia dos cromossomos B pode estar ligada a sua taxa de transmissão, os cromossomos metacêntricos e submetacêntricos os mais herdáveis quando comparados com os acrocêntricos (PENITENTE *et al.*, 2013). Já em *Poecilia formosa*, o mecanismo de herança é paterna (SCHARTL *et al.*, 1995 *apud* LAMPERT; SCHARTL, 2008). No entanto, as formas de heranças dos cromossomos B ainda são muito discutidas.

Em geral, os cromossomos B são considerados dispensáveis ao genoma, por isso estão presentes em apenas alguns indivíduos da espécie e sua presença não ocorre em todas as células. Entretanto, quando presentes em grande número, os cromossomos B possuem efeitos sobre o crescimento, aumento no número de quiasmas e redução de fertilidade. Esses efeitos são mais pronunciados quando os cromossomos B aparecem em números ímpares (BEUKEBOOM, 1994).

Recentes estudos mostram que, em algumas espécies, o cromossomo B possui um importante papel na determinação do sexo, resistência a antibióticos e patogenias (COLEMAN *et al.*, 2009, YOSHIDA *et al.*, 2011).

O recém-derivado cromossomo B de *Drosophila albomicans* afeta a fertilidade dos indivíduos portadores, onde exemplares com variação de 1 a 2 cromossomos B produzem mais prole que indivíduos com nenhum ou mais de dois cromossomos B. A ligação estreita entre fertilidade e cromossomo B deve-se ao fato desse cromossomo contribuir para a formação do cromossomo Y em *Drosophila* (CARVALHO *et al.*, 2005, ZHOU *et al.*, 2012). Em peixes, especialmente ciclídeos, os cromossomos B deram origem ao cromossomo sexual W (YOSHIDA *et al.*, 2011). A proximidade entre sexo e cromossomo B

em peixes foi inicialmente descrita para *Astyanax scabripinis* (VICENTE *et al.*, 1996). Entretanto, a verdadeira conexão ainda não foi descoberta, uma vez que essa espécie não possui cromossomos sexuais.

Em peixes neotropicais, após os primeiros relatos, a ocorrência de cromossomos B foi ligada à poluição ou à grande construção. Contudo, exceções foram encontradas em *Astyanax scabripinis* que viviam em locais preservados. Uma possibilidade para a presença de cromossomos B nesta população é do rio estar passando por mudanças de temperatura e volume, o que pode causar estresses para os peixes. De acordo com essa hipótese, os cromossomos B são uma resposta do organismo ao estresse (CAMACHO *et al.*, 2000).

### ***Biomonitoramento de ambientes aquáticos***

O biomonitoramento ambiental consiste na observação e comparação com parâmetros estabelecidos de um ou mais elementos químicos ou biológicos, de áreas em risco ou degradadas. A função do monitoramento ambiental é de detectar pequenas alterações que possam resultar em impacto para população, fauna e flora local. Por meio desse acompanhamento é possível prever e evitar impactos futuros e suas consequências (VAN DER OOST *et al.*, 2003).

A expansão urbana e industrial afeta os diferentes ecossistemas, em especial o aquático, devido à relação de dependência das atividades antropogênica pela água. Para o desenvolvimento das atividades econômicas, as vegetações originais são suprimidas para dar lugar às indústrias e à atividade agropecuária. O desmatamento causa elevada quantidade de sedimentos que são levados para o leito dos córregos, culminando no assoreamento e, reduzindo assim, a velocidade do fluxo e a qualidade da água dos mananciais (ANSA *et al.*, 2011). A diminuição do fluxo significa a queda da vazão o que auxilia a aumentar os efeitos da poluição, pois diminui a depuração natural dos efluentes das fontes contaminantes. Sendo assim, o desmatamento das áreas próximas ao ecossistema aquático tem aumentado a quantidade de poluentes acumulados, essa poluição residual deve ser monitorada e constantemente avaliada a fim de manter a qualidade do solo, da

água e evitar modificações na estrutura populacional da fauna dos rios (ESIN *et al.*, 2010).

A relação entre constante degradação de rios e córregos da área urbana e a distribuição de determinadas espécies foi observada em análises realizadas no estado de São Paulo (Brasil). Verificou-se a associação de *Trychomycterus* spp. e *Astyanax paranae* com o curso de água menos poluído, enquanto que *Astyanax fasciatus*, *Astyanax bockmanni*, *Cyphocharax modestus*, *Hoplias malabaricus* e *Hypostomus ancistroides* ocorrem em áreas próximas a regiões urbanas e conseqüentemente mais poluídas (FURLAN *et al.*, 2013).

Deste modo, embora os parâmetros físico-químicos realizados no monitoramento da água determinem a composição e quantidade de contaminantes, esses dados não podem ser usados diretamente para prever riscos os quais a biota nativa está sujeita. A inespecificidade ocorre, pois os organismos vivos reagem aos poluentes de maneira integrada a outros fatores ambientais, portanto, parâmetros biológicos devem complementar as análises químicas, estabelecendo programas de biomonitoramento de riscos de resíduos (BURDON *et al.*, 2013).

Bioindicadores são organismos que fornecem informações sobre a condição ambiental, pela sua presença, ausência, comportamento e papel ecológico. As alterações nos bioindicadores são feitas por meio dos biomarcadores. Os biomarcadores refletem uma resposta biológica frente às ações antrópicas e podem ser divididos em: (1) biomarcadores de exposição, visam detectar e medir substâncias exógenas; (2) biomarcadores de efeito, acompanham as alterações bioquímicas, fisiológicas ou outras alterações em células ou fluidos corporais e (3) biomarcadores de susceptibilidade, verificam a habilidade de o organismo responder a mudanças frente à exposição de substâncias tóxicas, incluindo fatores de alteração genética (OMS, 1993).

A escolha correta de espécies que serão utilizadas no biomonitoramento é essencial. A ampla distribuição, características alimentares, tolerância a ambientes poluídos e seu papel ecológico, devem ser observadas para escolha das espécies. Um dos bioindicadores mais usados são os invertebrados devido a sua resistência aos contaminantes e numerosas quantidades. A sensibilidade dos invertebrados a contaminação dos sedimentos foi demonstrada *in vivo* e *in*

*vitro* (ROMAN *et al.*, 2007, ARCHAIMBAULT *et al.*, 2010, JONES *et al.*, 2012, BURDON *et al.*, 2013; MAGBANUA *et al.*, 2013). Por desempenhar um papel intermediário na cadeia trófica e possuir um importante papel ecológico, os peixes são organismos bastante usados no monitoramento.

Os membros da família Cichlidae são extensamente utilizados para a detecção de contaminantes presentes na água, principalmente os com efeito mutagênico. A espécie *Oreochromis niloticus* é usada em vários países (KAN *et al.*, 2012, OSMAN *et al.*, 2012, FUZINATTO *et al.*, 2013), uma vez que possuem distribuição cosmopolita, grande resistência, e alimentação onívora, (OMAR *et al.*, 2012). A utilização de espécimes nativa como *Australoheros facetus* (CRUPKIN *et al.*, 2013) e outras famílias como Characidae e Poeciliidae, além de auxiliar a detectar efeitos nocivos da poluição, permitem estudar as alterações ecológicas acarretadas pelo acúmulo de biomassa e pela presença dos contaminantes, especialmente metais pesados (ALEXANDRE *et al.*, 2010).

### **Metais pesados**

Os metais pesados possuem elevado número atômico, são altamente reativos e tóxicos, mesmo em baixa concentração. Como não podem ser degradados, eles representam uma das principais ameaças para a saúde de humanos e animais. Em condições naturais a concentração de metais pesados é baixa, logo é possível medir o grau de degradação ambiental por ações antrópicas a partir dos níveis dos metais pesados encontrados na água e sedimentos (ZHANG *et al.*, 2013). As causas de contaminação ambiental por íon de metais pesados são os dejetos de indústrias, agropecuária e lixo urbano (LUO *et al.*, 2012, RAI, 2012, SINHA *et al.*, 2013). Os principais íons metálicos são: chumbo, cromo, zinco, manganês, mercúrio, cádmio, cobre, níquel e cobalto (HU *et al.*, 2012).

Alguns metais pesados possuem funções biológicas em pequenas quantidades, tais como, zinco, cobalto, manganês. Metais como mercúrio, chumbo, cádmio e cromo são perigosos ao meio ambiente e à saúde (AHMED *et al.*, 2012). Os ambientes aquáticos são ecossistemas especialmente frágeis, os metais pesados presentes nesse ecossistema são transportados

rapidamente para os sedimentos, que representam os maiores depositários de metais, retendo até 99% dos metais totais presentes no ambiente aquático (ODIETE, 1999). Ao mesmo tempo em que os sedimentos diminuem os contaminantes circulantes na água, eles podem liberar os metais em caso de mudanças ambientais, resultando em uma segunda fonte de contaminação para o ecossistema (LIU *et al.*, 2011). A acumulação de zinco está ligada com o ferro e manganês. Em sedimentos ricos em Fe/Mn há um aumento da concentração de zinco por meios antropogênicos (LIU *et al.*, 2011)

A contaminação nos sedimentos e da água representa um risco para as espécies de peixes. Os organismos aquáticos podem acumular metais diretamente da água ou indiretamente pela ingestão de alimentos contaminados (HUNG *et al.*, 2001). Nos peixes, o órgão com a máxima acumulação de metais são as brânquias, pois elas ficam diretamente em contato com a água e promovem a circulação da mesma, já os músculos apresentam as menores quantidades de metais no organismo (SHUKLA *et al.*, 2007). Os hábitos alimentares da ictiofauna influenciam no acúmulo de metais, espécimes com alimentação baseada em zooplankton e detritívoros acumulam mais metais quando comparadas com espécies onívoras e carnívoras, logo a bioacumulação diminui ao longo do nível trófico (WEBER *et al.*, 2013).

Os metais representam uma classe particular de agentes mutagênicos, pois possuem diferentes alvos na célula. Os efeitos genotóxicos dados aos metais são em consequência da relativa afinidade com sítios específicos celulares. A genotoxicidade pode ser definida como mudanças no material genético da biota pelo poluente indutor. A exposição do organismo a componentes genotóxicos induz a uma cascata de eventos (SHUGART *et al.*, 1992 *apud* VAN DER OOST *et al.*, 2003). As alterações podem causar mudanças na estrutura do DNA e, conseqüentemente, no processamento e expressão gênica. (SHUGART *et al.*, 1992 *apud* VAN DER OOST *et al.*, 2003). A mutação de DNA, direta ou indireta, inibição de reparos no DNA ou da formação do fuso mitótico e indução de morte celular dependem do perfil genotóxicos de cada metal (MATEUCA *et al.*, 2006).

O íon zinco em altas quantidades pode ser absorvido por plantas (SABALE *et al.*, 2012, USMAN *et al.*, 2013), animais (LUSHCHAK, 2011,

OMAR *et al.*, 2012) e humanos (PLUM *et al.*, 2010, ZHANG *et al.*, 2013), possuindo um efeito tóxico com a acumulação. O zinco possui a capacidade de interagir com o grupo –SH das proteínas do citoesqueleto, entre elas, a tubulina. Essa interação impede o correto funcionamento dos microtúbulos e, consequentemente, há perdas cromossômicas (KIRSCH-VOLDERS *et al.*, 2002).

O cromo possui uma forte ligação com as estruturas cristalinas de sedimentos (LIU *et al.*, 2011). A presença de cromo (III) no organismo diminui a permeabilidade da membrana plasmática e produz danos genéticos gerando instabilidade. Já o cromo (VI) dentro da célula leva a lesões no DNA que incluem quebras, mudanças nas ligações de proteínas com DNA, oxidação de bases e formação de sítios sem bases nitrogenadas. Esses danos podem acarretar em uma replicação e transcrição mal sucedida, o que leva aos erros no ciclo celular (THOMPSON *et al.*, 2011, ZHITKOVICH, 2011, LAY; LEVINA, 2012, CHENG *et al.*, 2013). Para detectar os vários riscos da poluição ambiental, testes de genotoxicidade devem ser realizados. Um excelente instrumento para determinar o efeito genotóxico é o teste de micronúcleo.

### ***Micronúcleo***

Os micronúcleos são pequenos corpos nucleares que correspondem à fragmentação de cromossomos, ou mesmo um cromossomo inteiro, que fora deixado para trás na anáfase durante a divisão celular (FENECH, 1985 *apud* MATEUCA *et al.*, 2006).

A fragmentação cromossômica é resultado da quebra da dupla fita de DNA. Rearranjos causados pela falta de reparo na quebra de dois cromossomos podem levar a formação de cromossomos dicêntricos e fragmentos acêntricos. Os cromossomos dicêntricos são puxados para pólos opostos das células na anáfase, resultando na formação de uma ponte nucleoplasmática entre os dois núcleos. Já o fragmento acêntrico dará origem ao micronúcleo (THOMAS *et al.*, 2003).

A formação de micronúcleos por meio de cromossomos inteiros ocorre devido a problemas na segregação por falhas nos microtúbulos, cinetocóros, rupturas de cromossomos, falhas na regulação do ciclo celular (ALBERTINI *et*

*al.*, 2000), ou até mesmo hipoacetilação de histonas do DNA centromérico. O destino do micronúcleo após sua formação ainda não é conhecido (FENECH *et al.*, 2005).

Uma das principais causas de formação de micronúcleos é a presença de metais pesados e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (FENG *et al.*, 2012, GJELTEMA *et al.*, 2012). Os danos que resultam em micronúcleos são irreversíveis e podem atingir as células germinativas, dessa forma, os danos são sentidos na geração seguinte. Os micronúcleos podem ser utilizados como biomarcadores (OBIAKOR *et al.*, 2012)..

O teste de micronúcleos em eritrócitos de peixes é uma importante ferramenta para indicar a ação de agentes genotóxicos presentes na água (KUMAR *et al.*, 2013), devido ao seu baixo custo e facilidade de execução. Os peixes respondem rapidamente a mudanças de concentrações de poluentes na água (EL- SHEHAWI *et al.*, 2007), além de possuir um metabolismo parecido com os outros vertebrados e de armazenar os poluentes presentes na água (KUMAR *et al.*, 2013). O monitoramento por meio do teste de micronúcleo pode ser realizado no campo ou no laboratório (OBIAKOR *et al.*, 2012).

Em peixes, o teste de micronúcleos pode ser realizado em eritrócitos de rins ou brânquias ou circulantes, as frequências de micronúcleos não se mostram diferentes de acordo com a origem do eritrócito (PALHARES; GRISOLIA, 2002). Contudo, alguns autores afirmam que sangue periférico é mais sensível aos contaminantes da água e apresentam maior frequência de micronúcleos (FAGR *et al.*, 2008). Uma possível explicação que o poluente faz o seu primeiro contato com o interior do organismo por meio das brânquias, só depois ocorre a deposição do poluente nos órgãos, deste modo, mesmo com a retirada dos poluentes do meio, os órgãos continuariam apresentando micronúcleos (SHUKLA *et al.*, 2007). Sendo assim, em um ambiente contaminado por um longo período não haveria diferença na frequência de micronúcleos de acordo com sua origem.

Em testes de micronúcleos do peixe *B. barbus* não foi possível reproduzir os resultados genotóxicos dos sedimentos obtidos *in vivo* no teste *in vitro* em diferentes pontos analisados (BOETTCHER *et al.*, 2010). Resultados com testes de Salmonela e micronúcleos com células de ovários de Hamster

(CHO-K1) não mostraram correspondência entre teores de metais contidos nos sedimentos e as atividades genotóxicas esperadas (RIGAUD *et al.*, 2012). Pesquisa realizada com linguado (*Solea senegalensis*) demonstrou que bioensaios em laboratório e experimentos no campo para a avaliação do risco de contaminação dos sedimentos podem produzir diferentes perfis de genotoxicidade. Embora ambos forneçam resultados que estejam de acordo com os níveis de contaminação de sedimentos, os ensaios de campo fornecem dados mais relevantes devido às múltiplas variabilidades ambientais (COSTA *et al.*, 2011).

A técnica de micronúcleo pode ser uma importante ferramenta para detectar a genotoxicidade do cromo. As ocorrências de elevados índices de cromo correspondem aos locais com alterações significativas de micronúcleo. Exemplares de peixes são usados para detectar os efeitos do cromo na natureza (MATSUMOTO *et al.*, 2006). Em análises de eritrócitos de *Pimephales promelas* expostos ao cromo, apenas após 14 dias de exposição, foi detectado micronúcleos (LEMOS *et al.*, 2007), mostrando a sensibilidade dessa técnica e sua importância no monitoramento ambiental.

Matsumoto *et al.*(2006) verificaram com auxílio da técnica de micronúcleo e Ensaio Cometa a genotoxicidade do cromo presente no Córrego do Bagre no município de Franca, Brasil, em espécimes de *Oreochromis niloticus*. Em análises de amostras de água dentro dos padrões aceitáveis de metais pesados é possível verificar o aumento de micronúcleos. Humanos expostos a componentes genotóxicos *in vitro* e *in vivo* mostram que mesmo doses mais baixas de contaminantes podem ser consideradas tóxicas (GRAILLOT *et al.*, 2012). A eficiência, baixo custo, facilidade de execução e análise são características que fazem do teste do micronúcleo uma importante ferramenta na determinação da qualidade de água.

## **Referências Bibliográficas**

ABBOTT, R., ALBACH, D., ANSELL, S., ARNTZEN, J.W., BAIRD, S.J.E., BIERNE, N. *et al.* Hybridization and speciation. *Journal of Evolutionary Biology*. v. 26, p. 229–246, 2013.

ABUCARMA, M.; MARTINS-SANTOS, I. C. Caracterização cromossômica de 3 duas espécies da família Pimelodidae (PISCES; SILURIFORMES). In: SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA EVOLUTIVA E APLICADA DE PEIXES NEOTROPICAIS, VI, 1996, São Carlos. *Anais VI Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicais*, São Carlos (SP), 1996, p.73.

ABUCARMA; M.; MARTINS- SANTOS, I. C. Karyotype and B Chromosome of *Rhamdia* Species (Pisces, Pimelodidae) Endemic in the River Iguaçu Basin. *Cytologia*, v. 66, p. 299-306, 2001.

AHMED, A. T. A.; MANDAL, S.; CHOWDHURY, D. A.; TAREQ, A. R. M.; RAHMAN, M. M. Bioaccumulation of some heavy metals in ayre fish (*sperata aor hamilton*, 1822), sediment and water of dhaleshwari river in dry season. *Bangladesh J. Zool.*, v. 40, p. 147-153, 2012.

ALBERTINI, R. J.; ANDERSON, D.; DOUGLAS, G. R.; HAGMAR, L.; HEMMINKI, K.; MERLO, F.; NATARAJAN, A. T.; NORPPA, H.; SHUKER, D. E.; TICE, R.; WATERS, M. D.; AITIO, A. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans, International Programme on Chemical Safety, *Mutat. Res.*, v. 463, p. 111-172, 2000.

ALEXANDRE, C. V.; ESTEVES, K. E.; MELLO, M. A. M. M. Analysis of fish communities along a rural–urban gradient in a neotropical stream (Piracicaba River Basin, São Paulo, Brazil) *Hydrobiologia*, v. 641, p. 97-114, 2010.

ALMEIDA, J. S.; AFFONSO, P. R. A. M.; DINIZ, D.; CARNEIRO, P. L.; DIAS A. L. Chromosomal Variation in the Tropical Armoured Catfish *Callichthys* *Callichthys* (Siluriformes, Callichthyidae): Implications for Conservation and

Taxonomy in a Species Complex from a Brazilian Hotspot. *ZEBRAFISH*, v. 00, n. 00, 2013.

ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; FORESTI, F.; TRAJANO, E.; TOLEDO FILHO, A. S. Cytogenetic analysis of the Brazilian blind catfish *Pimelodella kronei* and of its presumed ancestor *Pimelodella transitoria*. *Caryologia*, v. 45, p. 255–262. 1992.

ANDRADE, S. F.; MAISTRO, E. L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Caracterização cariotípica da espécie *Rhamdia* sp. (PISCES, PIMELODIDAE) proveniente do rio Sapucaí, Represa de Furnas, MG. In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 44°, 1998, Águas de Lindóia. *Anais 44° Congresso Nacional de Genética*, Águas de Lindóia (SP), p.66.

ANSA, E. J., UZUKWU, P. U., OKEZIE, S. O., ARANYO, A. A., APAPA, E. U. Silt Pollution of Tidal Fish Ponds in The Niger Delta, Nigeria. *Continental J. Environmental Sciences*, v. 5, p. 13 - 18, 2011.

ARCHAIMBAULT, V.; USSEGLIO-POLATERA, P.; GARRIC, J.; WASSON, J. G.; BABUT, M. Assessing pollution of toxic sediment in streams using bio-ecological traits of benthic macroinvertebrates. *Freshwater Biology*, v. 55, p. 1430-1446, 2010.

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

ARTONI, R. F.; VICARI, M. R.; BERTOLLEO, L. A. C. Citogenética de peixes neotropicais: Métodos, Resultados e perspectivas. *Biological and Health Sciences*, v. 6, n. 1, p. 43-60, 2000.

ARTONI, R. F.; VICARI, M. R.; ENDLER, A. L.; CAVALLARO, Z. I.; JESUS, C. M.; ALMEIDA, M. C.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. Evolution of B chromosomes in the Prochilodontidae fish, *Prochilodus lineatus*. *Genética*, v. 127, p. 277-284, 2006.

BALEN, R. E.; NOLETO, R. B.; VICARI, M. R.; ARTONI, R. F.; CESTARI, M. M. Comparative Cytogenetics among Populations of *Hollandichthys multifasciatus* (Teleostei: Characidae). *Zoological Science*, v. 30, n. 2, p. 105-109, 2013.

BARTON, N. H. Does hybridization influence speciation? *Journal of Evolutionary Biology*. v. 26 (2), p. 267–269, 2013.

BARTSCH, O.; LOITZSCH, A.; KOZLOWSKI, P.; MAZAUURIC, M. L.; HICKMANN, G. Forty-two supernumerary marker chromosomes (SMCs) in 43,273 prenatal samples: Chromosomal distribution, clinical findings, and UPD studies. *Eur J Hum Genet.*, v. 13, p. 1192–1204, 2005.

BASHEVA, E. A.; TORGASHEVA, A. A.; SAKAEVA, G. R.; BIDAU, C.; BORODIN, P. M. PAVEL, M. A- and B-chromosome pairing and recombination in male meiosis of the silver fox (*Vulpes vulpes* L., 1758, Carnivora, Canidae). *Chromosome Research*, v. 18, p., 689-696, 2010.

BENTO, M.; GUSTAFSON, P.; VIEGAS, W.; SILVA, M. Genome merger: from sequence rearrangements in triticale to their elimination in wheat–rye addition lines. *Theor Appl Genet*, v. 121, p., 489-497, 2010.

BEUKEBOOM, L. W. Bewildering Bs: na impression of the 1st B-Chromosome Conference. *Heredity*, v. 73, p. 328-336, 1994.

BLANCO, D. R.; VICARI, M. R.; ARTONI, R. F.; TRALDI, J. B.; MOREIRA-FILHO, O. Chromosomal characterization of armored catfish *Harttia longipinna* (Siluriformes, Loricariidae): first report of B chromosomes in the genus. *Zoolog Sci. Sep*; v. 29, n. 9, p. 604-9. 2012.

BOETTCHER, M.; GRUND, S.; KEITER, S.; TEFFEN, K. T.; REIFFERSCHIED, G.; SEIT, N.; ROCHA, P. S.; HOLLERT, H.; BRAUNBECK, T. Comparison of in

vitro and in situ genotoxicity in the Danube River by means of the comet assay and the micronucleus test. *Mutation Research*, v. 700, p. 11-17, 2010.

BORBA, R. S.; SILVA, E. L.; PACHECO, A. C. S.; PARISE-MALTEMPI, P. P.; ALVES, A. L. Trends in the karyotypic evolution of the Neotropical catfish family Heptapteridae Bockmann 1998 (Teleostei: Siluriformes). *Rev Fish Biol Fisheries*. V. 22, p. 509-518, 2012.

BROCHMANN, C.; BRYSTING, A. K.; ALSOS, I. G.; BORGES, L.; GRUNDT, H. H., SCHEEN, A. C. *et al.* Polyploidy in Arctic Plants. *Biol. J. Linn. Soc.*, v. 82, p. 521–536, 2004.

BURDON, F. J.; MCINTOSH, A. R.; HARDING, J. S. Habitat loss drives threshold response of benthic invertebrate communities to deposited sediment in agricultural streams. *Ecological Applications*, v, 23, n. 5, p. 1036-1047, 2013.

CAMACHO, J. P. M.; SHARBEL, T. F.; BEUKEBOOM, L. W. B-chromosome evolution. *Phil.Trans. R. Soc. Lond.* v. 355, p. 163-178, 2000.

CAMACHO, J. P. M. B chromosomes. In: Gregory TR (ed) *The evolution of the genome*. Ed. Elsevier, San Diego, p. 223–28, 2005.

CARLSON, W. R.; ROSEMAN, R.R. A new property of the maize B-chromosome. *Genetics*. v. 131, p. 211–223, 1992.

CARVALHO, A. B. Origin and evolution of the Drosophila Y chromosome. *Curr Cavallaro, Z. I.; Bertollo, L. A. C.; Perfectti, F.; Camacho, J. P. M.* Frequency increase and mitotic stabilization of a B chromosome in fish *Prochilodus lineatus*. *Chromosome Res*, v. 8, p., 627-634, 2000.

CENTOFANTE, L. *Citogenética comparativa entre ictiofaunas isoladas por um divisor de águas em regiões limítrofes de duas bacias hidrográficas na serra da*

*Mantiqueira*. São Carlos-SP, 2003, 151f. Tese (Doutorado em Genética e Evolução) - Universidade Federal de São Carlos.

CHENG, T.; CHOUDHURI, S.; MULDOON-JACOBS, K. Epigenetic targets of some toxicologically relevant metals: a review of the literature *Journal of Applied Toxicology*, v. 32, p. 643-653, 2012.

COLEMAN JJ, ROUNSLEY SD, RODRIGUEZ-CARRES M, KUO A, WASMANN CC, GRIMWOOD J, SCHMUTZ J, TAGA M, WHITE GJ, ZHOU S, *et al*: The genome of *Nectria haematococca*: contribution of supernumerary chromosomes to gene expansion. *PLoS Genet.*, v. 5, n., 8, 2009.

COSTA, P. M.; NEUPARTH, T. S.; CAEIRO, S.; LOBO, J.; MARTINS, M.; FERREIRA, A. M.; CAETANO, M.; VALE, C.; DELVALLS, T. A.; Costa, M. H. Assessment of the genotoxic potential of contaminated estuarine sediments in fish peripheral blood: Laboratory versus *in situ* studies. *Environmental Research*, v. 11, p. 25-36, 2011.

CRUPKIN, A. C.; CARRIQUIRIBORDE, P.; MENDIETA, J.; PANZERI, A. M.; BALLESTEROS, M. L.; MIGLIORANZA, K. S. B.; MENONE, M. L. Oxidative stress and genotoxicity in the South American cichlid, *Australoheros facetus*, after short-term sublethal exposure to endosulfan. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 105, p. 102-110, 2013.

De CAMPO JÚNIOR, E. O. *Biomonitoramento em áreas poluídas e não poluídas do Rio Uberabinha, região de Uberlândia- Minas gerais por meio de Análise Citogenética e Avaliação de Cromossomos B em bagre (Rhamdia quelen)*. Uberlândia-MG, 2011, 86f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Federal de Uberlândia.

DIAS, A. L.; FORESTI, F. Cytogenetic studies on fishies of the family Pimelodidae (Siluroidei). *Rev. Brasil. Genet.*, v. 16, n. 3, p. 585-600, 1993.

DIMITROVA, A. D., GECHEFF, K. I., ANANIEV, E. D. Methylation pattern of ribosomal RNA genes in NOR-deleted and NOR- reconstructed barley lines (*Hordeum vulgare* L.). Organization of igs in rDNA repeat unit. *Genetics and plant physiology*, v. 2, n., 2, p. 03-14, 2012.

Disponível em< <http://silurus.acnatsci.org/ACSI/taxa/Families.html>>. Acesso em 30/11/2013.

EL-SHEHAW, A. M., ALI, F.K., SEEHY, M. A. Estimation of water pollution by genetic biomarkers in tilapia and catfish species shows species-site interaction. *African Journal of Biotechnology*, v. 6, n. 7, 2007.

ESEN, E.; KUCUKSEZGIN, F.; ULUTURHAN. E Assessment of trace metal pollution in surface sediments of Nemrut Bay, Aegean Sea. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 160, p.257-266, 2010.

FAGR, A.; EL-SHEHAWI, A. M.; SEEHY, M. A.. Micronucleas Test in Fish Genome: A sensitive Monitor for Aquatic Pollution. *African Journal of Biotechnology*, v. 7, n. 5, p. 606-612, 2008.

FELDBERG, E. *Estudos citogenéticos em 12 espécies de peixes da família Curimatidae (Characiformes) da Amazônia Central*. Manaus- AM, 1990, 16f. Tese (Doutorado em Biologia de água Doce e Pesca Interior) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).

FELDBERG, E.; PORTO, J. I. R.; SANTOS, E. B. P.; VALENTIM, F. C. S. Cytogenetic studies of two freshwater sciaenids of the genus *Plagioscion* (Perciformes, Sciaenidae) from the central Amazon. *Genetics and Molecular Biology*, v. 22, n. 3, p. 351-356, 1999.

FENECH M. The Genome Health Clinic and Genome Health Nutrigenomics concepts: diagnosis and nutritional treatment of genome and epigenome damage on an individual basis, *Mutagenesis*, v. 20, p. 255-269, 2005.

FENG S.; MAI, B.; WEI, G.; WANG, X. Genotoxicity of the sediments collected from Pearl River in China and their polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and heavy metals. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 184, p. 5651-5661, 2012.

FENOCCHIO, A. S.; BERTOLLO, L. A. C. Karyotype similarities among Pimelodidae (Pisces, Siluriformes) from the Brazilian Amazon region. *Cytobios*, v. 69, p. 41-46, 1992.

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

FENOCCHIO, A. S.; BERTOLLO, L. A. C.; TAKAHASHI, C. S.; CAMACHO, P. M. B Chromosomes in Two Fish Species, Genus *Rhamdia* (Siluriformes, Pimelodidae). *Folia biologica (Kraków)*, v. 48, p. 3-4, 2000.

FENOCCHIO, A. S.; BERTOLLO, L. A. C.; TAKAHASHI, C. S.; DIAS, A. L.; SWARÇA, A. C. Cytogenetic Studies and Correlate Considerations on Rhamdiinae Relationships (Pisces, Siluroidei, Pimelodidae). *Cytologia*, v. 68, n. 4, p. 363-368, 2003.

FERRO, D. A. M.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C: B chromosome polymorphism in the fish, *Astyanax scabripinnis*. *Genetica*, v. 119, p. 147-153, 2003.

FONSECA, Y. M.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F.; MAISTRO, E. L. First Cytogenetic Description of the Species *Rhamdella microcephala* (Pisces, Hepapteridae). *Cytologia*, v. 68, p. 31-34, 2003.

FORESTI, F.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; OREIRA-FILHO, A. S. 1989. Supranumerary chromosome system, C-banding pattern characterization and

multiple nucleolus organizer regions in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Pisces, Characidae). *Genetica*, v. 79, n. 2, p. 107-114, 1989.

FRAGOULI, E.; ALFARAWATI, S.; SPATH, K.; WELLS, D. Morphological and cytogenetic assessment of cleavage and blastocyst stage embryos. *Mol. Hum. Reprod.*, 2013. doi: 10.1093/molehr/gat073.

FUKUSHIMA, H.; BAILONE, R. L.; WEISS, L. A.; MARTINS, M. L.; ZANIBONI-FILHO, E. Triploidy in the hematology of jundia juveniles (Siluriformes: Heptapteridae) *Braz. J. Biol.*, v. 72, n. 1, p. 147-151, 2012.

FURLAN, N.; ESTEVES, K. E.; QUINÁGLIA, G. A. Environmental factors associated with fish distribution in an urban neotropical river (Upper Tietê River Basin, São Paulo, Brazil). *Environmental Biology of Fishes*, v. 96, p. 77-92, 2013.

FUZINATTO, C. F.; FLOHR, L.; MELEGARI, S. P.; MATIAS, W. G. Induction of micronucleus of *Oreochromis niloticus* exposed to waters from the Cubatão do Sul River, southern Brazil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 98, p. 103-109, 2013.

GARCIA, C. *Contribuições aos estudos citogenéticos em algumas espécies de 5 famílias de Siluriformes do rio São Francisco*. São Carlos, SP, 2005, 88f. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) - Universidade Federal de São Carlos.

GARCIA, C.; OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. Karyotypic evolution trends in *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) with considerations about the origin and differentiation of its supernumerary chromosomes. *Genetic and Molecular Research*, v. 9, p. 365-384, 2010.

GEMAYEL, R.; CHO, J.; BOEYNAEMS, S.; VERSTREPEN, K. J. Junk-Variable Beyond Tandem Repeats as Facilitators of Rapid Evolution of Regulatory and Coding Sequences *Genes*, v. 3, p., 461-480, 2012.

GERSEN, S. L.; KEAGLE, M. B: *The principles of clinical cytogenetics* Totowa, NJ: Humana Press, 2 2005.

GJELTEMA, J.; STOSKOPF, M.;SHEA, D.; DE VOE, R. Assessment of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Contamination of Breeding Pools Utilized by the Puerto Rican Crested Toad, *Peltophryne lemur*. *Toxicology*, v. 2012, p. 1-7, 2012.

GONZALEZ-SANDOVAL, A.; TOWBIN, B. D.; GASSER, S. M. The formation and sequestration of heterochromatin during development. *FEBS*, v. 280, p. 3212–3219, 2013.

GRAILLOT, V.; TAKAKURA, N.; LE HEGARAT, L.; FESSARD, V.; AUDEBERT, M.; CRAVEDI, J. P. Genotoxicity of Pesticide Mixtures Present in the Diet of the French Population. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 53, p. 173-184, 2012.

GUERRA, M. *Introdução à Citogenética Geral*, Rio de Janeiro: Guanabara, p. 142, 1988.

GUILHERME, L. C. *Estudos reprodutivos e citogenéticos na população de Rhamdia quelen (PISCES, RHAMDIIDAE) do rio Uberabinha no município de Uberlândia-MG*. 2005, 81f. Tese (Doutorado em Genética e Bioquímica) - Universidade Federal de Uberlândia.

HEWITT, G. M.: The integration of supernumerary chromosomes into the orthopteran genome. *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.*, v. 38, p., 183-194, 1973.

HOCHSTENBACH, R.; VAN GIJN, M. E.; KRIJTENBURG, P. J.; RAEMAKERS, R.; VAN 'T SLOT, R.; RENKENS, I.; ELEVELD, M. J.; VAN DER SMAGT, J. J.; POOT, M. Gain of *FAM123B* and *ARHGEF9* in an Obese Man with Intellectual Disability, Congenital Heart Defects and Multiple Supernumerary Ring Chromosomes. *Mol Syndromol*, v., 3, p. 247-283, 2012.

HOUBEN, A., BANAEI-MOGHADDAM, A. M. KLEOMME, S., TIMMIS, J. N. Evolution and biology of supernumerary B chromosomes. *Cell. Mol. Life Sci.* 2013.

HSU, T. C.; SPIRITO, S. E.; PARDUE, M. L. Distribution of 18S+28S Ribosomal Genes in Mammalian Genomes. *Chromosoma*, v. 53, p. 25–36, 1975.

HU, X.; ZHANG, Y.; DING, Z.; WANG, T.; LIAN, H.; SUN, Y.; WU, J. Bioaccessibility and health risk of arsenic and heavy metals (Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn and Mn) in TSP and PM<sub>2.5</sub> in Nanjing, China. *Atmospheric Environment.*, v. 57, p. 146-152, 2012.

HUANG, B.; PEARLE, P.; RAUEN, K. A.; COTTER, P. D. Supernumerary Marker Chromosomes Derived From Chromosome 6: Cytogenetic, Molecular Cytogenetic, and Array CGH Characterization. *Am J Med Genet A.*, v. 158A,p. 1568-73, 2012.

HUNG, T. C.; MENG, P. J.; HAN, B. C.; CHUANG, A.; HUANG, C. C. Trace metals in different species of mollusca, water and sediments from Taiwan coastal area.2001. *Chemosphere*, v. 44, p. 833–841, 2001.

JONES, J. I.; MURPHY, J. F.; COLLINS, A. L.; SEAR, D. A.; NADEN, P. S.; ARMITAGE, P. D. The Impact of Fine Sediment on Macro-Invertebrates. *River Research and Applications*, v. 28, p. 1055-1071, 2012.

JONES, R. N. Tansley review no. 85: B chromosomes in plants. *New Phytol.*, v. 131, p., 411–434, 1995.

JONES, R. N.; REES, H. B. Chromosomes (Academic Press, New York 1982).  
JORGE, L. C.; SÁNCHEZ, S. Estudio citogenético preliminar en *Rhamdia quelen* (Pisces, Rhamdiidae) del río Paraná, provincia de Corrientes - Argentina. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas*. Universidad Nacional del Nordeste, 2005.

KAN, Y.; CENGİZ, E. I.; UĞURLU, P.; YANAR, M. The protective role of vitamin E on gill and liver tissue histopathology and micronucleus frequencies in peripheral erythrocytes of *Oreochromis niloticus* exposed to deltamethrin. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v.34, p.170-179, 2012.

KANTEK, D. L. Z.; PERES, W. A. M.; BUCKUP, P. A.; MOREIRA-FILHO, O. Cytogenetics of *Imparfinis schubarti* (Siluriformes: Heptapteridae) from the Piumhi drainage, a diverted river in Minas Gerais State, Brazil. *ZOOLOGIA*, v. 26, n. 4, p. 733–738, 2009.

KAVALCO, K. F.; PAZZA, R.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. Karyotypic diversity and evolution of Loricariidae (Pisces, Siluriformes). *Heredity*, v. 94, p. 180-186, 2005.

KAVALCO, K. F.; PAZZA, R.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. Heterchromatin characterization of four fish species of the family Loricariidae (Siluriformes). *Hereditas*, v. 141, p. 237-242, 2004.

KIRSCH-VOLDERS, M.; VANHAUWAERT, A.; DE BOECK, M.; DECORDIER, I. Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations. *Mutat. Res.*, v. 504, p. 137-148, 2002.

KUMAR, A.; KESARI, V. P.; KHAN, P. K. Fish micronucleus assay to assess genotoxic potential of arsenic at its guideline exposure in aquatic environment. *Biometals*, v. 26, p. 337-346, 2013.

LAMPERT, K. P.; SCHARTL, M. The origin and evolution of a unisexual hybrid: *Poecilia formosa*. *Philos Trans R Soc Lond B*, v. 363, p. 2901–2909, 2008.

LAY, P. A.; LEVINA, A. Chromium: Biological Relevance In Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry; Scott, R. A., ed.; John Wiley & Sons: Chichester, U.K., 2012; DOI: 10.1002/9781119951438.eibc0040.pub2.

LE GRANDE, W. H. Chromosomal evolution in North American catfish (Siluriformes: Ictaluridae) with particular emphasis on the madtoms, *Noturus*. *Copeia*, p. 33-52, 1981.

LEIGH, F.; KALENDAR, R.; LEA, V.; LEE, D.; DONINI, P.; SCHULMAN, A. H. Comparison of the utility of barley retrotransposon families for genetic analysis by molecular marker techniques *Molecular Genetics and Genomics*. V., 269, p., 464-474, 2003.

LEMOS, A. O.; OLIVEIRA, N. C. D.; LEMOS, C. T. *In vitro* micronuclei tests to evaluate the genotoxicity of surface water under the influence of tanneries. *Toxicology in Vitro*, v. 25, p. 761-766, 2011.

LIU, B.; HU, K.; JIANG, Z.; YANG, J.; LUO, X.; LIU, A. Distribution and enrichment of heavy metals in a sediment core from the Pearl River Estuary. *Environ Earth Sci*, v. 62, p. 265-275, 2011.

LÓPEZ-LEÓN M, CABRERO J, DZYUBENKO V, BUGROV A, KARAMYSHEVA T, et al: Differences in ribosomal DNA distribution on A and B chromosomes between eastern and western populations of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans plorans*. *Cytogenet Genome Res*. v. 121, p. 260–265, 2008.

LUO, X.; YU, S.; ZHU, Y.; LI, X. Trace metal contamination in urban soils of China. *Science of The Total Environment*, v. 421-422, p. 17-30, 2012.

LUSHCHAK, V. I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*, v. 101, p. 13-30, 2011.

MAGBANUA, F. S.; TOWNSEND, C. R.; HAGEMAN, K. J.; MATTHAEI, C. D. Individual and combined effects of fine sediment and the herbicide glyphosate on benthic macroinvertebrates and stream ecosystem function. *Freshwater Biology*, v. 58, p. 1729-1744, 2013.

MAISTRO, E. L. *Caracterização morfológica e estrutural de cromossomos supranumerários em peixes*. Botucatu, SP, 1996. 152f. Tese (Doutorado em Genética) - Universidade Estadual Paulista.

MAISTRO, E. L.; DIAS, A. L.; FORESTI, F.; MOREIRA-FILHO, O. Natural triploidy in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) and simultaneous occurrence of macroBchromosomes. *Caryologia*, v. 47, p. 233–239, 1995.

MAISTRO, E. L.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. Occurrence of macro B chromosome in *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characiformes, Characidae). *Genetica*, v.87, p., 101-106, 1992.

MAISTRO, E. L.; OLIVEIRA, C., FORESTI, F. Cytogenetic Analysis of A- and B-Chromosome of *Rhamdia hilarii* (Teleostei, Pimelodidae): C- Banding, Silver Nitrate and CMA3 Staining and Restriction Endonuclease Banding. *Cytologia*, v. 67, p. 25-31, 2002.

MAISTRO, E. L.; OLIVEIRA, C., FORESTI. Cytogenetic Analysis of A- and B-Chromosome of *Rhamdia hilarii* (Teleostei, Pimelodidae): C- Banding, Silver Nitrate and CMA3 Staining and Restriction Endonuclease Banding. *Cytologia*, v. 67, p. 25-31, 2002.

MANTOVANI, M. *Citogenética comparativa entre populações de Astyanax scabripinnis (PISCES, CHARACIDAE) da bacia do rio Paranapanema*. São

Carlos, SP, 2000, 97f. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) - Universidade Federal de São Carlos.

MARGARIDO, V. P. *Uma contribuição à citogenética dos Bryconinae (CHARACIFORMES, CHARACIDAE)*. São Carlos, SP, 1995, 107f. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) - Universidade Federal de São Carlos.

MARGARIDO, V. P.; MOREIRA-FILHO, O. 2008. Karyotypic differentiation through chromosome fusion and number reduction in *Imparfinis hollandi* (Ostariophysi, Heptapteridae). *Genetics and Molecular Biology*, v. 31, p. 235-238, 2008.

MARTINEZ, J. F.; ROBERTO, L. L.; BLANCO, D. R.; TRALDI, J. B.; SILVA, L. F.; VENERE, P. C.; SOUZA, I. L.; MOREIRA-FILHO, O. Comparative cytogenetics of three populations from the *Rhamdia quelen* species complex (Siluriformes, Heptapteridae) in two Brazilian hydrographic basins. *Caryologia*, v. 64, n. 1, p. 121-128, 2011.

MARTIS, M. M.; KLEMME, S.; BANAEI-MOGHADDAM, A. M.; BLATTNER, F. R.; MACAS, J.; SCHMUTZER, T.; SCHOLZ, U.; GUNDLACH, H.; WICKER, T.; SIMKOVA, H.; NOVAK, P.; NEUMANN, P.; KUBALAKOVA, M.; BAUER, E.; HASENEYER, G.; FUCHS, J.; DOLEZEL, J.; STEIN, N.; MAYER, K. F.; HOUBEN, A. Selfish supernumerary chromosome reveals its origin as a mosaic of host genome and organellar sequences. *Proc Natl Acad Sci*, v. 109, n. 33, p. 13343-13346, 2012.

MATEUCA, R.; LOMBAERT, N.; AKA, P. V.; I. DECORDER, M. KIRSCH-VOLDERS. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie*, v. 88, p. 1515-1531, 2006.

MATSUMOTO, S. T.; MANTOVANI, M. S.; MALAGUTTI, M. I. A.; DIAS, A. L.; FONSECA, I. C.; MARIN-MORALES, M. A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus

test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. *Genet Mol Biol*, v. 29, p. 148–158, 2006.

MCALLISTER, B. F. Isolation and characterization of a retroelement from a B chromosome (PSR) in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. *Insect Mol Biol*, v. 4, p., 253-262, 1995.

MCALLISTER, B.F. AND WERREN, J.H. Hybrid origin of a B chromosome (PSR) in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. *Chromosoma*, v. 106, p. 243–253, 1997.

MESTRINER, C. A. *Análise de regiões organizadoras de Nucléolos e investigação do sistema XX/XY decrito para Leporinus lacustris (Pisces, Anostomidae)*. São Carlos, SP, 1993, 58f. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) - Universidade Federal de São Carlos.

MESTRINER, C. A.; GALETTI J. R., P. M.; VALENTINS, S. R.; RUIZ, I. R. G.; ABEL, L. D. S.; MOREIRA-FILHO, O.; CAMACHO, J. P. M. Structural and functional evidence that a B chromosome in the characid fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome. *Heredity*, vol. 85, p. 1-9, 2000.

MILHOMEM, S. S. R.; SCACCHETTI, P. C.; PIECZARKA, J. C.; FERGUSON-SMITH, M. A.; PANSONATO-ALVES, J. C. *et al.* Are NORs Always Located on Homeologous Chromosomes? A FISH Investigation with rDNA and Whole Chromosome Probes in *Gymnotus* Fishes (Gymnotiformes). *PLoS ONE*, v. 8, n. 2, 2013.doi:10.1371/journal.pone.0055608. 2013.

MORAES, V. P. O.; CARNEIRO, J. S.; DIAS, A. L.; MORAES, V. P.O. B Chromosome in four different populations of *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae): a comparative study of frequency and distribution. *Folia Biol*, v. 57, n. 3, p. 165–169, 2009.

MORAES, V. P. O.; CEREALI, S. S.; FROEHLICH, O.; DIAS, A. L. Cytogenetic characterization of *Rhamdia quelen* (Siluriformes: Heptapteridae) from the Bodoquena Plateau, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Genet Mol Res*, v. 6, n. 3, p. 627–633. 2007.

MOREIRA-FILHO, O.; FENOCCHIO, A. S.; PASTORI, M. C.; BERTOLLO, L. A. C. Occurrence of a metacentric macrochromosome B in different species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae, Tetragonopterinae). *Cytologia*, v. 66, p. 59-64, 2001.

MORELLI, S. *Citogenética Evolutiva em Espécies do Gênero Hoplias, grupo lacerdae. Macroestrutura Cariotípica, Heterocromatina e Regiões Organizadoras de Nucléolo*. São Carlos, SP, 1998, 76f. Tese (Doutorado em Genética e Evolução) - Universidade Federal de São Carlos.

MORELLI, S.; BERTOLLO, L. A. C.; FORESTI, F. Cytogenetic considerations on the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). Karyotypic variability. *Caryologia*, v. 36, p. 235–244, 1983.

MUÑOZ-PAJARES, J. A.; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, L.; TERUEL, M.; CABRERO, J.; CAMACHO, P. J.; PERFECTTI, F. A Single, Recent Origin of the Accessory B Chromosome of the Grasshopper *Eyprepocnemis plorans* *Genetics*, v. 187, p. 853–863, 2011.

OBIAKOR, M. O.; OKONKWO, J. C.; NNABUDE, P. C.; EZEONYEJIKU, C. D. (2012). Eco-genotoxicology: Micronucleus Assay in Fish Erythrocytes as In situ Aquatic Pollution Biomarker: a Review. *J. Anim. Sci. Adv.*, v. 2, p. 123-133, 2012.

ODIETE, W. O. Environmental Physiology of animals and pollution. Lagos: Diversified Resources Ltd, 261. 1999.

OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; FORESTI, F.; BRITSKI, H. A.; TOLEDO-FILHO, S. A. Chromosome formulae of neotropical freshwater fishes. *Rev. Brasil. Genet.*, v. 11, n. 3, p. 577-624, 1988.

OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; MORI, L.; TOLEDO-FILHO, S. A. Extensive chromosomal rearrangements and nuclear DNA content changes in the evolution of the armoured catfishes genus *Corydoras* (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae). *Journal of Fish Biology*, v. 40, p., 419-431, 1992.

OLIVEIRA, C.; FORESTI F.; HILSDORF, A. W. S. Genetics of neotropical fish: from chromosomes to populations. *Fish Physiol Biochem*, v. 35, p. 81-100, 2009.

OLIVEIRA, S. G.; MOURA, R. C.; MARTINS, C. B chromosome in the beetle *Coprophanaeus cyanescens* (Scarabaeidae): emphasis in the organization of repetitive DNA sequences. *BMC Genetics*, v. 13, n. 96, 2012.

OMAR, W. A.; ZAGHLOUL, K. H.; ABDEL-KHALEK, A. A.; ABO-HEGAB, S. Genotoxic effects of metal pollution in two fish species, *Oreochromis niloticus* and *Mugil cephalus*, from highly degraded aquatic habitats. *Mutation Research*, v. 746, p. 7-14, 2012.

OSMAN, A. G. M.; ABUEL-FADL, K. D Y.; KLOAS, W. *In situ* evaluation of the genotoxic potential of the river Nile: II. Detection of DNA strand-breakage and apoptosis in *Oreochromis niloticus niloticus* (Linnaeus, 1758) and *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 747, p. 14-21, 2012.

PALHARES, D.; GRISOLIA, C. K. Comparison between the micronucleus frequencies of kidney and gill erythrocytes in tilapia fish, following mitomycin C treatment. *Genet Mol Biol*, v. 25, p. 281–284, 2002.

PAUN, O.; BATEMAN, R.; FAY, M.; LUNA, J.; MOAT, J.; HEDREN, M.; CHASE, M. W. Altered gene expression and ecological divergence in sibling allopolyploids of *Dactylorhiza* (Orchidaceae). *BMC Evol. Biol.*, v. 11, n. 113, 2011.

PEDEUTOUR, F.; FORUS, A.; COINDRE, J.; M. B.; JEANNE, M.; NICOLO, G.; MICHIELS, J. F.; TERRIER, P. V. D.; COLLIN, F.; MYKLEBOST, O.; TURC-CAREL, C. Structure of the supernumerary ring and giant rod chromosomes in adipose tissue tumors. *Genes, Chromosomes and Cancer*. v., 24, p. 30-41, 1999.

PENITENTE, M., VOLTOLIN, T. A., SENHORINI, J. A., BORTOLOZZI, J., FORESTI, F., PORTO-FORESTI, F. Transmission rate variation among three B chromosome variants in the fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 2013.

PENNISI, E. Genomics. ENCODE project writes eulogy for junk DNA. *Science*, v. 337, n. 6099, p. 1159–1161, 2012.

PERFECTTI, F.; CORRAL, J. M.; MESA, J. A.; CABRERO, J.; BAKKALI, M. *et al.*, Rapid suppression of drive for a parasitic B chromosome. *Cytogenet. Genome Res.*, v. 106, p. 338–343, 2004.

PISCOR, D.; RIBACINKO-PISCOR, D.; B.; FERNANDES, C.; A.; PARISE-MALTEMP, P.; P. Cytogenetic analysis in three Bryconamericus species (Characiformes, Characidae): first description of the 5S rDNA-bearing chromosome pairs in the genus. *Molecular Cytogenetics*, v. 6, n. 13, 2013.

PLUM, L. M.; RINK, L.; HAASE, H. The Essential Toxin: Impact of Zinc on Human Health *Int. J. Environ. Res. Public Health*, v. 7, p. 1342-1365, 2010.

POLETTI, A. B.; FERREIRA, I.; MARTINS, C. The B chromosomes of the African cichlid fish *Haplochromis obliquidens* harbour 18S rRNA gene copies *BMC Genetics*, v. 13, n. 3, 2012.

QUATTRO, J. M.; AVISE, J. C.; VRIJENHOEK, R. C. Mode of origin and sources of genotypic diversity in triploid gynogenetic fish clones (Poeciliopsis: Poeciliidae). *Genetics*, v. 130, p. 621–628, 1992.

RAI, PK K. An eco-sustainable green approach for heavy metals management: two case studies of developing industrial region. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 184, p. 421-448, 2012.

RAMIREZ-GIL, H.; FELDBERG, E.; ALMEIDA-VAL, V. M. F.; VAL, A. L. Karyological, biochemical, and physiological aspects of *Callophysus macropterus* (Siluriformes, Pimelodidae) from the Solimões and Negro Rivers (Central Amazon). *Braz. J. Med. Biol. Res.* v. 31, p. 1449-1458, 1998.

REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS, C: Check List of freshwater Fishes of South and Central America. Porto Alegre, Brasil: *Edipucrs*; 2003.

RIGAUD, S.; DI GIORGIO, C.; RADAKOVITCH, O.; GARNIER, J. M.; DE MÉO, M. Genotoxicity of sediment extracts of the Berre lagoon (France). *Chemosphere*, v. 88, p. 937-944, 2012.

ROBINSON, T. J.; YANG, F. Molecular cytogenetics: karyotype evolution, phylogenomics and future prospects *Heredity*, v. 108, n. 1, p. 1-3, 2012.

ROMAN, Y. E.; DE SCHAMPHELAERE, K. A. C.; NGUYEN, L. T. H.; JANSSEN, C. R. Chronic toxicity of copper to five benthic invertebrates in laboratory-formulated sediment: Sensitivity comparison and preliminary risk assessment. *Science of the Total Environment*, v. 387, p. 128-140, 2007.

SABALE, S. R.; TAMHANKAR, B. V.; DONGARE, M. M.; MOHITE, B. S. Extraction, Determination and Bioremediation of Heavy Metal Ions and Pesticide Residues from Lake Water. *Bioremed Biodegrad*, v. 3, n.4, 2012.

SALVADOR, L. B.; MOREIRA-FILHO, O: B chromosome in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Heredity*, v. 69, p. 50-56, 1992.

SÁNCHEZ, S.; FENOCCHIO, A. S.; JORGE, L. Estudios citogenéticos en peces de la familia Pimelodidae (Pises, Siluriformes) de la cuenca del río Paraná, Argentina. Análisis cromosómico de dos especies de *Luciopimelodinae*. Argentina. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas*. Universidad Nacional del Nordeste, 2000.

SANTOS, L. P.; CASTRO, J. P.; FRANCISCO, C. M.; VICARI, M. R.; ALMEIDA, M. C.; GOLL, L. G.; MORELLI, S.; ARTONI, R. F. Cytogenetic analysis in the neotropical fish *Astyanax goyacensis* Eigenmann, 1908 (Characidae, incertae sedis): karyotype description and occurrence of B microchromosomes. *Molecular Cytogenetics*, v. 6, n. 48, 2013.

SCHMID, M. The giant B chromosome of the cyprinid fish *Alburnus alburnus* harbours a retrotransposon-derived repetitive DNA sequence. *Chromosome Research*, v. 11, p. 23-35, 2003.

SHIRASU, K.; SCHULMAN, A.; LAHAYE, T.; LEFERT, P. S. A Contiguous 66-kb Barley DNA Sequence Provides Evidence for Reversible Genome Expansion. *Genome Res.*, v. 10, p. 908-915, 2000.

SHUKLA, V.; DHANKHAR, M.; PRAKASH, J.; SASTRY, K. V. Bioaccumulation of Zn, Cu and Cd in *Channa punctatus*. *Journal of Environmental Biology*, v. 228, n. 2, p. 395-397, 2007.

SILVA, C. T.; DIAS, A. L.; GIULIANO-CAETANO, L. Análise citogenética em *Iheringichthys labrosus* e *Pimelodella* sp. (Pisces, Pimelodidae) da bacia do rio

Tibagi/PR. In: SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA EVOLUTIVA E APLICADA DE PEIXES NEOTROPICAIS, VI, 1996, São Carlos. *Anais VI Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicais*, São Carlos (SP), 1996, p.76.

SILVA, M.; MATOSO, D. A.; LUDWIG, L. A. M.; GOMES, E.; ALMEIDA, M.; C.; VICARI, M. R.; ARTONI, R. F Natural triploidy in *Rhamdia quelen* identified by cytogenetic monitoring in Iguaçu basin, southern Brazil. *Environ Biol Fish*, v. 91, p. 361-366, 2011.

SILVA, S.V.S. Estudos Citogenéticos de quatro populações de *Rhamdia quelen* da região do Triângulo Mineiro. Uberlândia, 2007, 44f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Federal de Uberlândia.

SINHA, S.; MISHRA, R. K.; SINAM, G.; MALLICK, S.; GUPTA, A. K. Comparative Evaluation of Metal Phytoremediation Potential of Trees, Grasses, and Flowering Plants from Tannery-Wastewater-Contaminated Soil in Relation with Physicochemical Properties. *Soil and Sediment Contamination*, v 22, 2013.

SOLA, L.; ROSSI, A. R.; BRESSANELLO, S.; RASCH, E. M.; MONACO, P. J. Cytogenetics of bisexual/unisexual species of Poecilia. V. unisexual poeciliids with anomalous karyotypes from northeastern Mexico. *Cytogenet Cell Genet* 63:189–191. *Genetica*, v. 66, p. 85-88, 1993.

SOUZA-SHIBATA, L. S.; PEZENTI, L. F.; FERREIRA, D. G.; ALMEIDA, F. S.; SOFIA, S. H.; SHIBATA, O.; A. Cryptic species of the genus *Pimelodella* (Siluriformes: Heptapteridae) from the Miranda River, Paraguay River basin, Pantanal of Mato Grosso do Sul, Central Brazil. *Neotrop. Ichthyol*, v. 11, n. 1, 2013.

STIVARI, M. K.; MARTINS-SANTOS, I. C. Karyotype Diversity in Two Population of *Rhamdia quelen* (PISCES, HEPTAPTERIDAE). *Cytologia*, v. 69, n. 1, p. 25-34, 2004.

SWARÇA, A. C.; FENOCCHIO, A. S.; CESTARI, M. M.; BETOLLO, L. A. C.; DIAS, A. L. Heteromorphic sex chromosome system with an exceptionally large Y chromosome in a catfish *Steindachneridion* sp. (Pimelodidae). *Cytogenetic Genome Res.*, v. 112, p. 325- 328, 2006.

SWARÇA, A. C.; FENOCCHIO, A. S.; CESTARI, M. M.; DIAS, A. L. Analysis of heterochromatin by combination of C-banding and CMA3 and DAPI staining in two fish species (Pimelodidae, Siluriformes). *Genetica*, v. 119, p. 87-92, 2003.

SWARÇA, A. C.; GIULIANO-CAETANO, L.; DIAS, A. L. Cytogenetics of species of the families Pimelodidae and Rhamdiidae (Siluriformes). *Genetics and Molecular Biology*, v. 23, n. 3, p. 589-593, 2000.

SWARÇA, A. C.; SANCHEZ, S.; DIAS, A. L.; FENOCCHIO, A. S. Cytogenetics of the Porthole Shovelnose Catfish, *Hemisorubim platyrhynchos* (Valenciennes, 1840) (Siluriformes, Pimelodidae), a widespread species in South American rivers. *Comp Cytogen*, v. 7, n. 2, p. 103–110, 2013.

THOMAS, P.; UMEGAKI, K.; FENECH, M.; Nucleoplasmic bridges are a sensitive measure of chromosome rearrangement in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutagenesis*, v. 18, p. 187-194, 2003.

THOMPSON, C. M.; HAWS, L. C.; HARRIS, M. A.; GATTO, N. M.; PROCTOR, D. M. Application of the U.S. EPA Mode of Action Framework for Purposes of Guiding Future Research: A Case Study Involving the Oral Carcinogenicity of Hexavalent Chromium. *Toxicological Sciences*, v. 119, n. 1, p. 20–40, 2011.

TOMITA, M.; SHINOHARA, K.; MORIMOTO, M. Revolver is a new class of transposon-like gene composing the triticeae genome. *DNA Res.*, v. 15, n. 1, p. 49–62, 2008.

TORRES-MARIANO, A. R.; MORELLI S. B chromosomes in a population of *Astyanax eigenmanniorum* (Characiformes, Characidae) from the Araguari River Basin (Uberlândia, MG, Brazil). *Genet. Mol. Biol.*, v. 31, p. 246-249, 2008.

TORRES-MARIANO, A. R. *Descrição citogenética de espécies do gênero Astyanax (PISCES, CHARACIDAE) da bacia do rio Araguari-Uberlândia (MG)*. Uberlândia, MG, 2001, 51f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) - Universidade Federal de Uberlândia.

TSUDA, J. R.; MORAES, V. P. O.; GIULIANO-CAETANO, L.; DIAS, A. L. Occurrence of natural triploidy in *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) *Genet. Mol. Res.*, v. 9, n. 3, p. 1929-1935, 2010.

VALCAREL, A.; BRUNNER, P.; MAGGESE, C. B-chromosome polymorphism in the South American catfish, *Rhamdia sapo*. *Aquaculture*, v. 110, p. 111-118, 1993.

VALENTIM, F. C. S.; PORTO, J. I. R.; BERTOLLO, L. A. C.; GROSS, M. C.; FELDBERG, E. XX/XO, a rare sex chromosome system in *Potamotrygon* freshwater stingray from the Amazon Basin, Brazil *Genetica*, v. 141, p. 381-387, 2013.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E.. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 13, p. 57-149, 2003.

VASCONCELOS, C.; MARTINS-SANTOS, I. C. Chromosome polymorphism in species of Pimelodidae family (Pisces, Siluriformes). *Hereditas*, v. 132, p. 103-109, 2000.

VICENTE, V. E.; MOREIRA-FILHO, O.; CAMACHO, J. P. Sex-ratio distortion associated with the presence of a B chromosome in *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae). *Cytogenet Cell Genet.*, v. 74, p. 70–75, 1996.

VIDOTTO, A. P.; SWARCA, A. C.; FENOCCHIO, A. S.; DIAS, A. L. Cytogenetic Studies in Three *Pimelodella meeki* Populations (Pisces, Pimelodidae) from Tibagi River Basin (Brazil). *Heredity*, v. 95, n. 6, p. 517-520, 2004.

VISSOTTO, P. C.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Karyotype description of five species of Pimelodidae (Teleostei, Siluriformes). *Chromosom Sci*, v. 3, p. 1–7, 1999.

VISSOTTO, P. C.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Karyotypic characterization of two species of the genus *Imparfinis* (Teleostei, Siluriformes, Heptapteridae). *Chromosom Sci*, v. 5, p. 97–103, 2001.

VOLTOLIN, T. A.; PANSONATO, A. J. C.; SENHORINI, J. A.; FORESTI, F.; CAMACHO, J. P. M.; PORTO-FORESTI, F. Common Descent of B Chromosomes in Two Species of the Fish Genus *Prochilodus* (Characiformes, Prochilodontidae). *Cytogenet Genome Res*, v. 141, p. 206-211, 2013.

VOLTOLIN, T. A.; SENHORINI, J. A.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F.; BORTOLOZZI, J.; PORTO-FORESTI, F. 2010. B-chromosome frequency stability in *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetica*, v. 138, p. 281–284, 2010.

VOLTOLIN, TA; SENHORINI, JA; OLIVEIRA, O; FORESTI, F; BORTOLOZZI, J; PORTO-FORESTI, F. Cytogenetic Markers in Wild Population of Curimatá (*Prochilodus lineatus*) from Mogi-Guaçu River. *Cytologia*, v. 74, p. 281–287, 2009.

WEBER, P.; BEHR, E. R.; KNORR, C. L.; VENDRUSCOLO, D. S.; FLORES, E. M. M.; DRESSLER, V. L.; Baldisserotto, B. Metals in the water, sediment, and

tissues of two fish species from different trophic levels in a subtropical Brazilian river. *Microchemical*, v. 106, p. 61-66, 2013.

WHO, Organização Mundial de Saúde. "Biomarkers and risk assessment: concepts and principles / published under the joint sponsorship of the United Nations environment Programme, the International Labour Organisation, and the WorldHealth." 1993.

YOSHIDA, K.; TERA, Y.; MIZOIRI, S.; AIBARA, M.; NISHIHARA, H.; WATANABE, M.; KUROIWA, A.; HIRAI, H.; HIRAI, Y.; MATSUDA, Y.; OKADA, N. B Chromosomes Have a Functional Effect on Female Sex Determination in Lake Victoria Cichlid Fishes. *PLoS Genetics*, v. 7, l. 8, 2011.

ZHANG, C.; APPEL, E.; QIAO, Q. Heavy metal pollution in farmland irrigated with river water near a steel plant—magnetic and geochemical signature *Geophys. J. Int.*, v. 192, p. 963-974, 2013.

ZHITKOVICH, A. Chromium in Drinking Water: Sources, Metabolism, and Cancer Risks. *Chem. Res. Toxicol.*, v. 24, p. 1617-1629, 2011.

ZHOU, Q. I.; ZHU, H. M.; HUANG, Q. F.; ZHAO, L.; ZHANG, G.J.; ROY, S. W. *et al.*, Deciphering neo-sex and B chromosome evolution by the draft genome of *Drosophila albomicans*. *BMC Genomics*, v. 13, n. 109, 2012.

ZIEGLER, C. G.; LAMATSCH, D. K.; STEINLEIN, C.; ENGEL, W.; SCHARTL, M.; SCHMID, M. The giant B chromosome of the cyprinid fish *Alburnus alburnus* harbours a retrotransposon-derived repetitive DNA sequence. *Chromosome Research.*, v. 11, p. 23-35, 2003.

## **Capítulo II**

### **Comparação citogenética de cinco populações de *Rhamdia quelen* da Microrregião do Triângulo Mineiro**

O presente trabalho foi escrito de acordo com as normas da revista Journal of  
Fish Biology

## Capítulo II

### Resumo

O *Rhamdia quelen*, popularmente conhecido como bagre ou jundiá, tem ampla distribuição do México até a Argentina. *R. quelen* possui um importante papel na aquicultura brasileira, sendo um dos peixes mais cultivados devido à aceitação do mercado consumidor. O presente trabalho teve como objetivos analisar as frequências de cromossomos Bs e caracterizar as regiões organizadoras de Nucléolos (NORs) de *R. quelen* de cinco populações da região do Triângulo Mineiro (MG), Brasil. Nas análises citogenéticas foram observados cromossomos Bs em ambos os sexos. As populações do córrego do Bebedouro, rios das Pedras e Tejuco apresentaram de 0-2 cromossomos Bs. Na população do rio Araguari foi observada a ocorrência 0-4. Já no rio Uberabinha, todas as metáfases analisadas apresentaram cromossomos Bs, sendo a variação total encontrada foi de 1-3 cromossomos Bs. A população do Uberabinha apresentou NOR múltiplas, no braço longo de um cromossomo submetacêntrico, ao contrário das demais que tiveram marcação em apenas um par. A população do rio Tejuco teve marcação de NOR intersticial. As metáfases do rio Uberabinha submetidas ao tratamento de banda C mostraram pequenos blocos heterocromáticos nas regiões teloméricas e periteloméricas. Os resultados obtidos são diferentes dos descritos para a espécie em outras regiões do país, este resultado mostra a necessidade de uma revisão taxonômica.

Palavras-chaves: *Rhamdia*, cromossomo B, NOR, citogenética, Siluriformes.

### Abstract

*Rhamdia quelen*, commonly known as catfish, has a broad distribution from south Mexico to Argentina. *R. quelen* has an important role in Brazilian aquaculture, been one of the most farmed species, mainly because of the great acceptance of the consumer market. This present study focused to analyze the frequency of B chromosomes and characterize nucleolus organizer region (NOR) in five populations of *Rhamdia quelen* from Triângulo Mineiro, Brazil. In cytogenetic analysis, B chromosomes were found in both genders. The

populations from Bebedouro, Pedras and Tejuco river presented 0-2 B chromosomes; the specimens from Araguari river 0-4 B chromosomes; however, in Uberabinha river, all metaphase analyzed had B chromosome, with variation of 1-3. The Uberabinha population showed multiple Ag-NORs in the long arms of the sub metacentric chromosomes, whilst in Tijuco's population, the NOR is located on the interstitial region of the sub metacentric pair. The C band pattern showed small heterochromatic blocks in the centromeric and telomeric regions in Uberabinha. Our data demonstrate new crucial results that suggest taxonomic revision.

Keywords: *Rhamdia*, cytogenetic, B chromosome, Heptapteridae, NOR.

## **Introdução**

Os cromossomos B são moléculas de DNA inertes que não exibem um padrão de herança mendeliana e não pertencem ao lote normal de cromossomos (cromossomos A) (Huouben *et al.* 2013). Esses cromossomos ocorrem com uma variação numérica inter e intra-individual e não pareiam durante a meiose. Apesar de não possuírem efeito morfológico evidente no fenótipo (Zhang & Arai 2003), alguns autores afirmam que os cromossomos B atuam sobre a fertilidade, crescimento do animal e aumento dos quiasmas, principalmente quando esses aparecem em números ímpares (Beukeboom, 1994).

A ocorrência de cromossomos Bs é comum em vários grupos de seres vivos (Fenocchio & Bertollo 1990). Tais cromossomos foram descritos em fungos, plantas e em mais de 500 animais (Camacho 2005). O cromossomo B pode ser um traço individual variando na população. Caso isso ocorra sua presença é esporádica. Em alguns casos, esses cromossomos tornaram-se comuns em algumas espécies, se fixaram no genoma e foram passados através das gerações (Venere *et al.* 1999).

Nos peixes neotropicais, os cromossomos B foram descritos em 38 espécies (Oliveira *et al.* 2009). A primeira descrição desses cromossomos em peixes teleósteos ocorreu em *Prochilodus lineatus*, citado como *Prochilodus scrofa*, onde foram descritos cinco pequenos cromossomos fortemente heterocromáticos (Pauls & Bertollo 1983 *apud* Fenocchio & Bertollo 1990), com

variações numéricas inter e intra-individual. Outros casos foram relatados em peixes neotropicais tais como *Prochilodus lineatus* (Artoni *et al.* 2006, Voltolin *et al.* 2013), *Iheringichthys labrosus* (Carvalho & Dias 2005), *Astyanax eigenmanniorum* (Torres-Mariano & Morelli 2008) e no gênero *Rhamdia* (Fenocchio & Bertollo 1990, Garcia 2003, Garcia 2005, Guilherme 2005, Garcia *et al.* 2010).

Apesar da maioria dos cromossomos B não afetarem os organismos a quem pertencem, nem todos permanecem totalmente inertes, alguns talvez apresentem atividade transcricional. Em peixes há registros em que os cromossomos B podem possuir papel na determinação sexual nas fêmeas em algumas espécies de ciclídeos (Yoshida *et al.* 2011).

Na ordem dos Siluriformes, o cromossomo B foi descrito em dois gêneros: *Bergiaria* (Dias & Foresti 1993) e *Iheringichthys* (Silva *et al.* 1996, Swarça *et al.* 2000, Ribeiro *et al.* 2008), ambos pertencentes à família Pimelodidae. Na subfamília Rhamdiidae, o cromossomo B foi observado em espécies de *Pimelodella* (Almeida-Toledo *et al.* 1992 *apud* Swarça *et al.* 2000, Garcia & Almeida-Toledo 2010) e em quase todas as espécies estudadas do gênero *Rhamdia* (Swarça, *et al.* 2000, Abucarma & Martins-Santos 2001, Vissoto *et al.* 2001, Maistro *et al.* 2002, Fenocchio 2003, Borba *et al.* 2012).

Dentro do gênero *Rhamdia*, a espécie *Rhamdia quelen* possui uma distribuição do sul do México à Argentina (Gomes *et al.* 2000). No Brasil, os exemplares podem ser encontrados nas bacias do Paraná, Paraguai, além do São Francisco e Amazonas (Agostinho *et al.* 2007). Essa espécie é considerada bentônica, sendo a terceira maior produzida por aquicultura e a segunda maior criada de forma artesanal (Gomes *et al.* 2000). Apesar da sua importância na aquicultura brasileira, ainda há contradição quanto ao número de cromossomos B presentes.

O presente trabalho teve como objetivo analisar a ocorrência de cromossomos B em cinco populações de *Rhamdia quelen* presentes no Triângulo Mineiro, contribuintes da formação da Bacia do Paraná, observar sua frequência em ambos os sexos e estabelecer as diferenças populacionais baseadas na incidência do cromossomo B.

## **Material e Métodos**

Os animais foram coletados em 5 diferentes locais (Figura 1) segundo a distribuição: 5 fêmeas, 4 machos e 2 com sexo indefinido de *Rhamdia quelen* provenientes do Córrego Bebedouro (18°45'44"S, 048°17'24"W), 7 indivíduos, 2 machos, 3 fêmeas e 4 com sexo indefinido, no rio Uberabinha (18°55'55"S, 048°17'28"W), 6 exemplares do sexo feminino, 5 machos do rio Araguari (18°46'17"S, 048°14'40"W), 7 fêmeas, 12 machos e 5 com sexo indefinido do rio das Pedras (18°53'31"S, 048°26'09"), da microrregião do Triângulo Mineiro e 20 espécimes, 11 macho, 5 fêmeas e 4 com sexo indefinido, do rio Tejuco (19°03'26"S, 048°35'37"W) município de Prata-MG.

As metáfases foram estimuladas com cloreto de cobalto segundo técnica descrita por Cucchi e Baruffaldi (1990), 18 horas antes da preparação do animal. Os cromossomos mitóticos foram obtidos a partir de células do rim anterior e posterior, por preparação direta (Bertollo *et al.* 1978). As Regiões Organizadoras de Nucléolos foram marcadas através da técnica de impregnação com nitrato de Prata descrita por Howell e Black (1980) com modificações. As regiões de heterocromatinas foram detectadas conforme Summer (1972). O presente trabalho foi aprovado pelo comitê de ética de uso de animais da UFU (CEUA-UFU). Os animais foram sacrificados de acordo com a norma estabelecida (Resolução N° 1000, de maio de 2012).

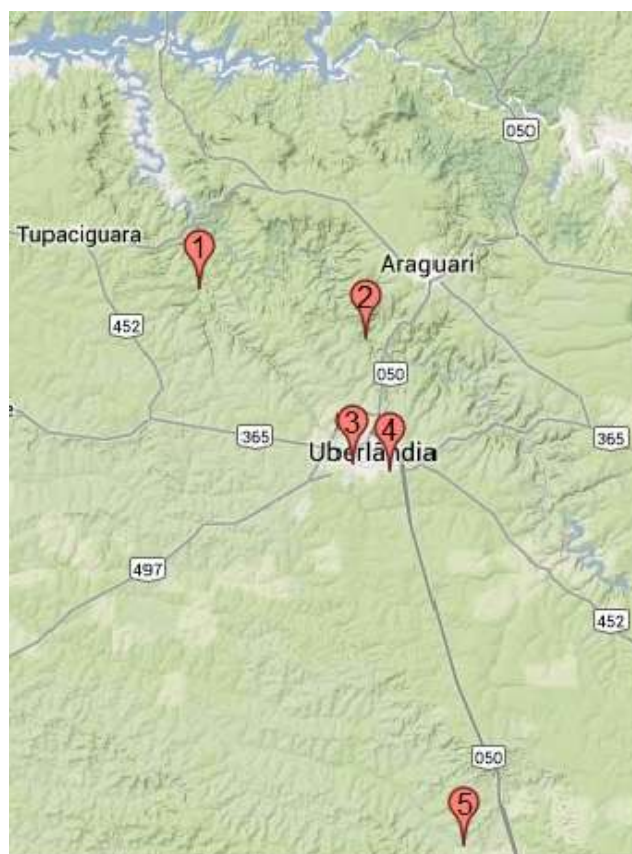


**Figura 1:** Mapa da hidrografia do Triângulo Mineiro. 1) rio das Pedras; 2) rio Araguari; 3) rio Uberabinha; 4) córrego do Bebedouro e 5) rio Tejuco. Fonte: Google Mapas.

## **Resultados**

Os estudos citogenéticos de *Rhamdia quelen* demonstraram um número diploide de 58 cromossomos para todos os pontos estudados, com diferenças na formula cariotípica devido a condensação cromossômica. Os cromossomos B foram observados em ambos os sexos (Tabela 1). Foram visualizados de 0-2 cromossomos B em três pontos (córrego do Bebedouro, rio das Pedras e Tejuco). No rio Tejuco apenas um animal, dentre os 14 analisados, apresentou células com a e 2 cromossomos B. No rio Araguari, os espécimes apresentaram uma variação de 0-5 cromossomos B e apenas os espécimes coletados no rio Uberabinha apresentaram de 1-3 cromossomos B (Tabela 2). Os cromossomos B encontrados em nas populações do Tejuco, Araguari, Bebedouro e das Pedras possuíam um tamanho pequeno em relação aos

outros cromossomos do complemento. Entretanto, os cromossomos B da população do Uberabinha possui tamanho variável.

A maioria dos exemplares de todos os locais coletados apresentaram Ag-NOR simples com heteromorfismo de tamanho. No entanto, apenas dois exemplares coletados na população do rio Uberabinha apresentaram Ag-NOR múltiplas. Todos os espécimes coletados no rio Uberabinha que apresentaram o mesmo padrão de Ag-NOR simples apresentaram marcações localizadas em um par de cromossomos subtelocêntrico/acrocêntrico, na região terminal do braço curto. Já os espécimes portadores de NORs múltiplas tiveram as marcações localizadas nos braços longos de cromossomos submetacêntricos (Figura 2 e 3).

As metáfases, de todas as populações estudadas, submetidas ao tratamento de banda C mostraram pequenos blocos heterocromáticos nas regiões pericentroméricas e teloméricas de alguns cromossomos (Figura 2 e 3).

**Tabela 1:** Frequência Absoluta e Frequência Relativa de indivíduos com presença de Cromossomos B, em relação ao sexo.

| Bs           | Macho |          | Fêmea |          |
|--------------|-------|----------|-------|----------|
|              | $f_i$ | $f_{ri}$ | $f_i$ | $f_{ri}$ |
| 0            | 10    | 0.294118 | 4     | 0.153846 |
| 1            | 10    | 0.294118 | 8     | 0.307692 |
| 2            | 13    | 0.382353 | 11    | 0.423077 |
| 3            | 1     | 0.029412 | 1     | 0.038462 |
| 4            | 0     | 0        | 1     | 0.038462 |
| 5            | 0     | 0        | 1     | 0.038462 |
| <b>Total</b> | 34    |          | 26    |          |

**Nota:**  $f_i$ : Frequência absoluta;  $f_{ri}$ : Frequência relativa.

**Tabela 2:** Frequência Absoluta e Frequência Relativa de células com a presença de Cromossomos B, em relação aos 5 pontos de coleta das amostras de *Rhamdia quelen*.

| Bs    | Córrego do Bebedouro |          | Rio das Pedras |          | Rio Araguari |          | Rio Uberabinha |          | Rio Tejuco |          |
|-------|----------------------|----------|----------------|----------|--------------|----------|----------------|----------|------------|----------|
|       | $f_i$                | $f_{ri}$ | $f_i$          | $f_{ri}$ | $f_i$        | $f_{ri}$ | $f_i$          | $f_{ri}$ | $f_i$      | $f_{ri}$ |
| 0     | 127                  | 61,35%   | 126            | 60,86%   | 6            | 31,57%   | 0              | 0        | 195        | 94,20%   |
| 1     | 30                   | 14,49%   | 48             | 23,18%   | 7            | 36,84%   | 15             | 15,79%   | 10         | 4,83%    |
| 2     | 50                   | 24,15%   | 33             | 15,94%   | 4            | 21,05%   | 51             | 53,68%   | 2          | 0,97%    |
| 3     | 0                    | 0        | 0              | 0        | 0            | 0        | 29             | 30,53%   | 0          | 0        |
| 4     | 0                    | 0        | 0              | 0        | 1            | 5,26%    | 0              | 0        | 0          | 0        |
| 5     | 0                    | 0        | 0              | 0        | 1            | 5,26%    | 0              | 0        | 0          | 0        |
| Total | 207                  |          | 207            |          | 19           |          | 95             |          | 207        |          |

**Nota:**  $f_i$ : Frequência absoluta de células com B;  $f_{ri}$ : Frequência relativa de células com B.

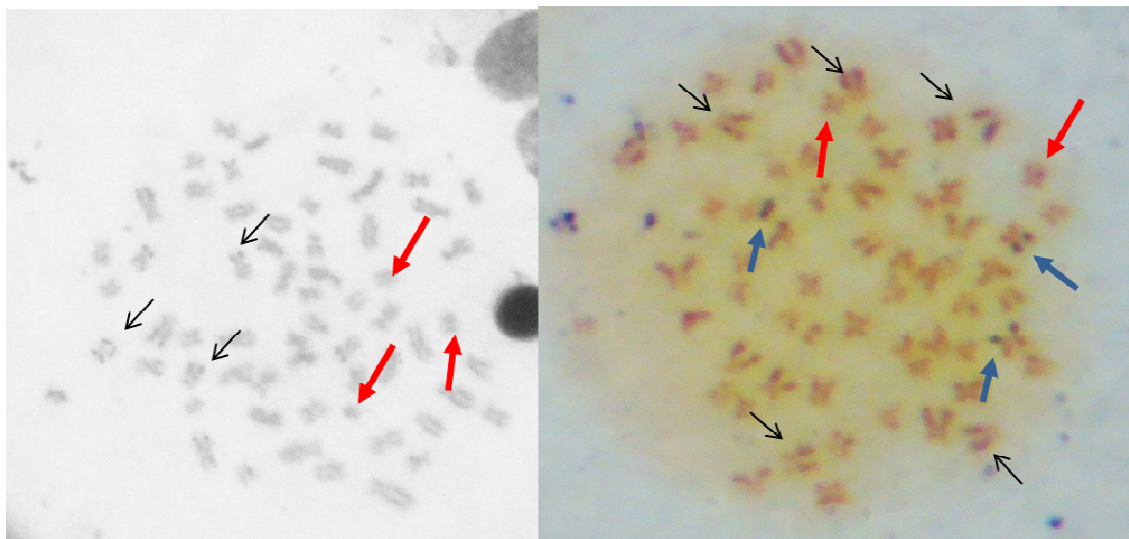


**Figura 2:** Metáfases da população do rio Uberabinha. a) Metáfase submetida ao tratamento de Banda C, com setas evidenciando as regiões de heterocromatina constitutiva. b) Metáfase submetida ao tratamento de nitrato de Prata, com setas evidenciando as regiões de heterocromatina com afinidade com a Prata. Setas vermelhas indicam o cromossomo B. Setas azuis indicam as NORs.

| Córrego do Bebedouro | Rio das Pedras | Rio Araguari | Rio Uberabinha |  | Rio Tejuco |
|----------------------|----------------|--------------|----------------|--|------------|
|                      |                |              |                |  |            |

**Figura 3:** Diferentes padrões observados de regiões organizadoras de Nucléolos (NOR) nos espécimes avaliados nos diferentes pontos de coleta.

## Discussão

O número diploide de 58 foi relatado em todas as espécies do gênero *Rhamdia*, bem como, a presença de cromossomos condensados e de pequeno tamanho, característico dessa espécie (Maistro *et al.* 2002, Fenocchio *et al.* 2003). Essa característica também foi observada nos cromossomos B, os quais se mostraram pequenos e extremamente condensados (Figura 2). Os cromossomos B dos espécimes do rio Uberabinha são eucromáticos quando tratados com a técnica de banda C. A ocorrência de cromossomos B eucromáticos em *R. quelen* foi descrita por Moraes (2007) e Garcia *et al.* (2010).

Em estudos de populações de *R. quelen* encontradas em Londrina (PR) e São Paulo (SP), foram encontrados cromossomos B totalmente heterocromáticos, sendo que apenas a população de Santa Catarina apresentou cromossomos B parcialmente heterocromáticos (Moraes *et al.* 2009). Estudos realizados com populações do Rio de Janeiro, São Paulo e Paraná demonstraram uma ligação entre o tamanho do cromossomo B e o tipo de heterocromatina. Quando possuíam tamanho mediano, esses cromossomos apresentaram-se parcialmente heterocromáticos, com heterocromatina nas regiões terminais e esse padrão também pode ser compartilhado com alguns cromossomos B pequenos. No entanto, os cromossomos B totalmente heterocromáticos ou eucromáticos sempre são cromossomos pequenos (Garcia *et al.* 2010), conforme observado no presente estudo.

As espécies de *Rhamdia quelen* apresentam uma variação interpopulacional de cromossomos B metacêntricos médios (Valcarcel *et al.* 1998, Abucarma & Martins-Santos 2001, Maistro *et al.* 2002) e pequenos (Moraes *et al.* 2009). Os cromossomos B visualizados no presente trabalho são metacêntricos pequenos (Figura 2). A ocorrência de cromossomos B pequenos foi descrita em outras espécies de Siluriformes, tais como, *Parauchenipterus galeatus* (Lui *et al.* 2009), *Bergiaria westermanni* (Dias & Foresti 1993). A ocorrência de cromossomos B grandes é mais rara em Siluriformes e foi descrita em *Microlepidogaster leucofrenatus* (Andreta *et al.* 1993), *Callichthys callichthys* (Almdeida *et al.* 2013) e em *R. quelen* apenas

uma população de São Paulo apresentou uma variação de médio a grande (Stivari & Martins-Santos 2004). Nos siluriformes, a presença de microcromossomos B é mais comum, há relatos em *Iheringichthy labrosus* (Dias & Foresti 1990, Garcia 1990, Vissoto 1995, Silva 1996), *Pimodella kronei* (Almeida-Toledo *et al.* 1992), *Harttia longipinna* (Blanco *et al.* 2012), *Rineloricaria pentamaculata* (Porto *et al.* 2010), alguns exemplares de *Parauchenipterus galeatus* (Lui *et al.* 2009).

No presente estudo, apesar dos exemplares machos apresentarem uma porcentagem maior de indivíduos sem a presença de cromossomos B (29,41%) quando comparados com as fêmeas (15,38%), não houve relação significativa entre o sexo dos indivíduos e a frequência de cromossomos B (Tabela 1). Este fato exclui a possibilidade dos cromossomos B estarem ligados ao sexo na espécie de *R. quelen*, corroborando com dados observados em outras populações desta espécie (Silva 2007, Garcia *et al.* 2010). As diferenças nas frequências de cromossomos B foram observadas em outras espécies, como em *Chilomycterus spinosus*, na qual apenas os machos da espécie possuem esse tipo de cromossomo, e em *Sphoeroides spengleri*, na qual a ocorrência é mais frequente em fêmeas (Notelo *et al.* 2012). Já na espécie *Harttia longipinna* os machos apresentam uma maior frequência de cromossomos B em comparação com as fêmeas (Blanco *et al.* 2012).

A presença de cromossomos B em todas as populações de *R. quelen* analisadas no presente trabalho é compatível com os dados da literatura, pois a maioria das espécies estudadas do gênero *Rhamdia* apresentaram cromossomos B (Swarça *et al.* 2000, Abucarma & Martins-Santos 2001, Maistro *et al.* 2002, Tsuda *et al.* 2010, Martinez *et al.* 2011). A baixa ocorrência de cromossomos B, como observado na população do rio Tejuco (5,80%) é rara em *Rhamdia quelen*. Em uma análise realizada em animais do estado de Santa Catarina, metade dos espécimes coletados não apresentou cromossomo B. Entretanto, no rio Taquari, um dos afluentes da Bacia do Paraguai, apenas 1 indivíduo não apresentou cromossomos B. Estudos realizados na Argentina mostraram amplas variações quanto ao número de cromossomos B, como a observada no presente trabalho. Nos espécimes analisados na cidade de Corrientes nenhum cromossomo B foi encontrado por Fenocchio *et al.* (2003),

entretanto, na análise de espécimes de outros pontos da Argentina, foram detectados uma variação de 0 a 2 cromossomos B (Valcarel *et al.* 1993). No Brasil a completa ausência de cromossomos B em *R. quelen* foi detectada na população do Paraná (Stivari & Martins- Santos, 2004).

A frequência de um cromossomo B foi de 25.73% e a de dois cromossomos B foi de 13.45% para populações da Bacia do Paraguai. Esse resultado é similar ao encontrado em população isolada, onde a frequência observada de 1 cromossomo B é de 23.8% e 2 B de 11.11% (Moraes *et al.* 2009). Tais dados são similares ao da população do rio das Pedras no presente estudo. Nas populações analisadas, a ocorrência de 1 cromossomo B foi maior do que 2 B nos rios Araguari, Tejuco, das Pedras (Tabela 2), corroborando com trabalhos realizados no estado do Paraná e São Paulo (Moraes *et al.* 2009). Esses resultados, porém, são diferentes dos obtidos para as populações mais próximas, do córrego do Bebedouro e Uberabinha, onde houve uma maior frequência de 2 B em relação a 1B.

Na população do rio Uberabinha analisada no presente estudo todos os animais analisados possuíam cromossomos B. A ocorrência de B em 100% dos indivíduos foi descrita em *Pimelodus ortmani* e esta alta incidência pode ser uma prova que esse cromossomo B é altamente conservado e deve possuir uma importância na característica evolutiva cariotípica (Swarça *et al.* 2000). Entretanto, em análises realizadas por outro autor em pontos diferentes do mesmo rio foi encontrada maior incidência de nenhum cromossomo B e a ausência de 2 cromossomos B para *R. quelen* (De Campos Junior 2011). Esse resultado diverge do observado por Guilherme (2005) que descreveu a ocorrência de 2 e 4Bs e dos dados da população do rio Uberabinha descrita no presente trabalho, onde a incidência de 2 cromossomos B foi maior que 1B e nenhum animal apresentou ausência de cromossomos B.

Em outros estudos no rio Uberabinha, observou-se em uma das populações coletadas a ocorrência de 65% dos espécimes com cromossomos B (De Campos Junior 2011). No mesmo trabalho, exemplares oriundos há aproximadamente 5 Km do local do presente estudo, apresentaram uma incidência de 26,09% de 3B e esse resultado aproxima-se do encontrado no presente trabalho para o mesmo rio. A ocorrência de 0-3 cromossomos B é

relatada em populações de Mato Grosso (Moraes *et al.* 2007) e São Paulo (Vissoto *et al.* 2001).

Os espécimes do rio Uberabinha apresentaram uma grande ocorrência de cromossomos B e é o único local do mundo onde há relatos de 0 a 7 cromossomos B na espécie de *R. quelen* (De Campos Junior 2011, Guilherme 2007). Esta divergência encontrada, no presente trabalho, em relação aos dados publicados anteriormente (Stivari & Martins- Santos, 2004, Moraes *et al.* 2009, Garcia *et al.*, 2010, Borba *et al.*, 2012), quanto ao número de cromossomos B, pode ser explicada pela difícil classificação da espécie, uma vez que a ocorrência de 5 cromossomos B só havia sido descrita no estado de São Paulo-Brasil em coletas realizadas de espécies sinônima, *R. hilarii*.

Os exemplares com maior número de cromossomos B eram encontrados nas espécies hoje “inexistentes”, *R. hilarii* e *R. branneri* (Tabela 3). Após o agrupamento de *R. hilarii*, *R. sapo* e *R. branneri* com o *R. quelen* houve o aumento de relatos de cromossomos B nessa espécie. Foram descritos 4 B para populações do sudoeste e sul do país (Stivari & Martins-Santos 2004, presente trabalho) e 5 B em populações de Minas e da parte sul dos rios Mogi-Guaçu e Pardo (SP) (Garcia *et al.* 2010, De Campo Junior, 2011). Estudos com *Rhamdia* sp. também revelaram a presença de 0-4 B (Garcia *et al.*, 2003), como o encontrado em um espécime analisado no rio Araguari, no qual apresentou 0-5 cromossomos B. O aumento de descrição de cromossomos B após a reclassificação das espécies pode ser uma prova que *R. quelen* é na verdade um conjunto de espécies.

Essa hipótese é reforçada pelos diferentes padrões Regiões Organizadora de Nucléolos (NOR) encontrados no presente trabalho. As análises de NOR na população do rio Uberabinha revelaram Ag-NOR simples em pares cromossômicos subtelocêntrico/acrocêntricos, na região terminal do braço curto e essa posição de NOR é semelhantes às demais populações. Entretanto, determinados exemplares do rio Uberabinha apresentaram NORs múltiplas com marcações no braço longo (Figura 3). A NOR no braço curto de um par de cromossomos subtelocêntrico/acrocêntricos é conservada no gênero *Rhamdia* e foi descrita para *Rhamdia voulezi* (Margarido, Roman 2000) e *Rhamdia branneri* (Roman *et al.* 2002), ambas espécies sinônimas de

*Rhamdia quelen*. A presença da NOR em braços curtos de cromossomos acrocêntricos também foi relatada na população de Corrientes da Argentina (Fenocchio *et al.* 2002). Trabalhos realizados com *R. quelen* descreveram a NOR localizada no par cromossômico subtelocêntrico, no braço curto (Fenocchio *et al.* 2000, Fenocchio 2003, Centofante 2003, Garcia 2005). As diferenças encontradas nos tipos cromossômicos portadores de NOR, subtelocêntrico ou acrocêntrico, podem ser decorrentes de variações na condensação dos cromossomos. No entanto, marcações no braço curto de um par cromossômico provavelmente submetacêntrico foram descritas por Carvalho *et al.* (1999), Mattanó (2004) e Moraes *et al.* (2006).

A presença de NOR múltipla nos braços longos, tal qual encontrado na população do rio Uberabinha, foi descrita para *Rhamdia* sp. e *R. branneri* em populações do Paraná, Brasil. No mesmo estudo apenas a espécie *R. voulezi* apresentou NOR simples no braço curto e a presença de 0-2 cromossomos B. Os espécimes de *R. voulezi* e *Rhamdia* sp. apresentaram de 0-2 cromossomos B, contudo *R. voulezi* possui cromossomos B metacêntricos e médios, os quais seriam espécie específico, enquanto os espécimes de *Rhamdia* possuem cromossomos B acrocêntricos e pequenos, como os observados na população do Tejuco. A frequência observada de células sem cromossomo B foi maior para essas duas espécies, os exemplares de *R. branneri* são os únicos que possuem 0-4 cromossomos B (Abucarma, Martins-Santos 2001). A população do rio Tejuco apresentou a marcação da NOR na região intersticial do braço longo de um par submetacêntrico (presente trabalho) e o isolamento dessa população pode ser a causa da diferença na localização de NOR (Figura 3).

A maior existência de cromossomos B nas populações do rio Uberabinha e rio Araguari (Tabela 1) pode ser explicada pela hidrografia dos pontos de coleta. O rio Uberabinha era afluente esquerdo do Araguari (Oliveira *et al.* 2012), deste modo espécimes contendo grande variação de cromossomos B encontrado no Araguari pode ter origem no Uberabinha. O córrego do Bebedouro também é afluente da margem esquerda do Araguari. O rio Tejuco é o segundo maior afluente do rio Paranaíba e o seu principal afluente é o rio da Prata, deste modo sua população encontra-se isolada dos

demais rios estudados, o que pode explicar a baixa ocorrência de cromossomos B (Tabela 2).

Diferenças morfológicas em *Rhamdia quelen* são relatadas em espécimes coletados em diferentes regiões geográficas, entretanto, as diferenças morfológicas são consideradas insuficientes para a fragmentação das espécies, pois os animais coletados nos diferentes locais possuem mais similaridades que diferenças (Silfvergrip 1996 *apud* Garcia *et al.* 2010). Porém para alguns autores (Perdices *et al.* 2002, Weber *et al.* 2003) as diferenças físicas, a impossibilidade em classificar o grupo monofilético e a drástica redução de 100 espécies para apenas 11 com distribuição geográfica do México até a Argentina, demonstram a falha na sistemática estabelecida.

Estudos com cromossomos B metacêntricos e submetacêntricos mostraram que esses possuem maior possibilidade de se fixarem no genoma, pois se encontram em estágio neutro e possivelmente possuem uma maior taxa de transmissão quando comparado com cromossomos acrocêntricos como demonstrado em *Prochilodus lineatus* (Penitente *et al.* 2013). Para Almeida *et al.* (2013) os cromossomos B, que não possuem relacionamento com o sexo são considerados neutros. Apesar de neutros, esses cromossomos estão em decréscimo nas pequenas populações, devido eventos relacionados à deriva genética. Esse fato, juntamente com a possibilidade de *Rhamdia quelen* representar um complexo de espécies pode explicar a baixa ocorrência de B nas populações do Tejuco. Entretanto, segundo Blanco *et al.* (2012) populações altamente adaptadas ao seu micro-habitat, possuem um pequeno fluxo gênico entre elas o que favorece o estabelecimento de rearranjos estruturais do cariótipo e, conseqüentemente, a ocorrência de cromossomos B como o visualizado na população do rio Uberabinha. O acompanhamento da evolução cariotípica dessas populações possibilitará verificar se há o aumento da frequência de polimorfismos no genoma, bem como, a pressão de seleção exercida no cromossomo B.

## **Referências Bibliográficas**

ABUCARMA; M.; MARTINS- SANTOS, I. C. Karyotype and B Chromosome of *Rhamdia* Species (Pisces, Pimelodidae) Endemic in the River Iguaçu Basin. *Cytologia*, v. 66, p. 299-306, 2001.

ALMEIDA, J. S.; AFFONSO, P. R. A. M.; DINIZ, D.; CARNEIRO, P. L.; DIAS A. L. Chromosomal Variation in the Tropical Armoured Catfish *Callichthys* *Callichthys* (Siluriformes, Callichthyidae): Implications for Conservation and Taxonomy in a Species Complex from a Brazilian Hotspot. *ZEBRAFISH*, v. 00, n. 00, 2013.

ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; FORESTI, F.; TRAJANO, E.; TOLEDO FILHO, A. S. Cytogenetic analysis of the Brazilian blind catfish *Pimelodella kronei* and of its presumed ancestor *Pimelodella transitoria*. *Caryologia*, v. 45, p. 255–262. 1992.

ANDREATA, A. A.; ALMEIDA-TOLEDO, L.; OLIVEIRA, C.; TOLEDO FILHO, S. A. Chromosome studies in hypoptopomatinae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). II. ZZ/ZW sex-chromosome system, B chromosomes, and constitutive heterochromatin differentiation in *Microlepidogaster leucofrenatus*. *Cytogenet Cell Genet.* v. 63, n. 4, p.215-20, 1993.

ARTONI, R. F.; VICARI, M. R.; ENDLER, A. L.; CAVALLARO, Z. I.; JESUS, C. M.; ALMEIDA, M. C.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. Evolution of B chromosomes in the Prochilodontidae fish, *Prochilodus lineatus*. *Genética*, v. 127, p. 277-284, 2006.

BERTOLLO, L. A. C.; TAKAHASHI, C. S.; MOREIRA FILHO, O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Brazilian Journal of Genetics*, v.1, p.103-120, 1978.

BEUKEBOOM, L. W. Bewildering Bs: na impression of the 1st B-Chromosome Conference. *Heredity*, v. 73, p. 328-336, 1994.

BLANCO, D. R.; VICARI, M. R.; ARTONI, R. F.; TRALDI, J. B.; MOREIRA-FILHO, O. Chromosomal characterization of armored catfish *Harttia longipinna*

(Siluriformes, Loricariidae): first report of B chromosomes in the genus. *Zoolog Sci. Sep*; v. 29, n. 9, p. 604-9. 2012.

BORBA, R. S.; SILVA, E. L.; PACHECO, A. C. S.; PARISE-MALTEMPI, P. P.; ALVES, A. L. Trends in the karyotypic evolution of the Neotropical catfish family Heptapteridae Bockmann 1998 (Teleostei: Siluriformes) *Rev Fish Biol Fisheries*. V. 22, p. 509-518, 2012.

CAMACHO, J. P. M.; SHARBEL, T. F.; BEUKEBOOM, L. W. B-chromosome evolution. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* v. 355, p. 163-178, 2000.

CAMACHO, J. P. M. B chromosomes. In: Gregory TR (ed) *The evolution of the genome*. Ed. Elsevier, San Diego, p. 223–28, 2005.

CARVALHO, R. A.; DIAS, A. L. Caracterização citogenética de *Rhamdia quelen* (Pisces, Rhamdiidae) proveniente da bacia do rio Tibagi-PR. In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 45°, 1999, Gramado. *Anais 45° Congresso Nacional de Genética*, Gramado (RS), 1999, p.73.

CARVALHO; R. A.; DIAS, A. L. Karyotypic characterization of *Iheringichthys labrosus* (Pisces, Pimelodidae): C-, G- and restriction endonuclease banding. *Genet. Mol. Res.*, v. 4, p. 663-667, 2005.

CENTOFANTE, L. *Citogenética comparativa entre ictiofaunas isoladas por um divisor de águas em regiões limítrofes de duas bacias hidrográficas na serra da Mantiqueira*. São Carlos-SP, 2003, 151f, Tese (Doutorado em Genética e Evolução) - Universidade Federal de São Carlos.

CUCCHI; C.; BARUFFALDI, A. A new method for karyological studies in teleost fishes. *Journal of Fish Biology*, v. 37, p. 71-75, 1990.

De CAMPO JÚNIOR, E. O. *Biomonitoramento em áreas poluídas e não poluídas do Rio Uberabinha, região de Uberlândia- Minas gerais por meio de Análise Citogenética e Avaliação de Cromossomos B em bagre (Rhamdia quelen)*. Uberlândia-MG, 2011, 86f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Federal de Uberlândia.

DIAS, A. L.; FORESTI, F. Algumas considerações a respeito do cariótipo de *Iheringichthys labrosus* (Siluriformes, Pimelodidae) do rio Mogi-Guaçu. In: *III Simpósio de Citogenética Evolutiva Aplicada em Peixes Neotropicais*, Botucatu, (SP), 1990, p. 32.

DIAS, A. L.; FORESTI, F. Cytogenetic studies on fishies of the family Pimelodidae (Siluroidei). *Rev. Brasil. Genet*, v. 16, n. 3, p. 585-600, 1993.

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

FENOCCHIO, A. S.; BERTOLLO, L. A. C.; TAKAHASHI, C. S.; CAMACHO, P. M. B Chromosomes in Two Fish Species, Genus *Rhamdia* (Siluriformes, Pimelodidae). *Folia biologica (Kraków)*, v. 48, p. 3-4, 2000.

FENOCCHIO, A. S.; BERTOLLO, L. A. C.; TAKAHASHI, C. S.; DIAS, A. L.; SWARÇA, A. C. Cytogenetic Studies and Correlate Considerations on Rhamdiinae Relationships (Pisces, Siluroidei, Pimelodidae). *Cytologia*, v. 68, n. 4, p. 363-368, 2003a.

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

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

GARCIA, RMG., SACHETE, R. and MARTINS-SANTOS, IC., 1990. Aspectos citogenéticos de *Iheringichthys labrosus* (Pisces, Pimelodidae) do Rio Paraná, região de Porto Rico, PR. In *Abstract do III Simpósio de Citogenética Evolutiva Aplicada a Peixes Neotropicais*. Botucatu (SP). p. 33.

GARCIA, C.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C.; CENTOFANTE, L. B. chromosomes and natural triploidy in *Rhamdia* sp. (Pisces, Siluriformes, Heptapteridae). *Cytologia*, v. 68, p. 403–411, 2003.

GARCIA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. Comparative chromosomal analyses in species of the genus *Pimelodella* (Siluriformes, Heptapteridae): occurrence of structural and numerical polymorphisms. *Caryologia*, v. 63, p. 32-40, 2010.

GARCIA, C.; OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. Karyotypic evolution trends in *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) with considerations about the origin and differentiation of its supernumerary chromosomes. *Genetic and Molecular Research*, v. 9, p. 365-384, 2010.

GOMES, L. C.; GOLOMBIESKI, J. I.; GOMES, A. R. C.; BALDISSEROTTO, B. Biology of *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). *Cienc. Rural*, v. 30, n. 1, 2000.

GUILHERME, L. C. *Estudos reprodutivos, citogenéticos na população de Rhamdia quelen (Pisces, Rhamdiidae), do rio Uberabinha no município de Uberlândia – MG e desenvolvimento de sistema artesanal de recirculação d'água para criação de peixes*. Uberlândia, 2005, 81f. Tese (Doutorado em Genética) – Universidade Federal de Uberlândia.

HOUBEN, A., BANAEI-MOGHADDAM, A. M. KLEOMME, S., TIMMIS, J. N. Evolution and biology of supernumerary B chromosomes. *Cell. Mol. Life Sci.* 2013.

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

HSU, T. C.; SPIRITO, S. E.; PARDUE, M. L. Distribution of 18S+28S Ribosomal Genes in Mammalian Genomes. *Chromosoma*, v. 53, p. 25–36, 1975.

LE GRANDE, W. H. Chromosomal evolution in North American catfish (Siluriformes: Ictaluridae) with particular emphasis on the madtoms, *Noturus*. *Copeia*, p. 33-52, 1981.

LUI, R. L., BLANCO, D. R., MARGARIDO, V. P. & MOREIRA-FILHO, O. (2009). First description of B chromosomes in the family Auchenipteridae, *Parauchenipterus galeatus* (Siluriformes) of the São Francisco River basin (MG, Brazil). *Mícron* **40**, 552–559.

MAISTRO, E. L.; OLIVEIRA, C., FORESTI. Cytogenetic Analysis of A- and B-Chromosome of *Rhamdia hilarii* (Teleostei, Pimelodidae): C- Banding, Silver Nitrate and CMA3 Staining and Restriction Endonuclease Banding. *Cytologia*, v. 67, p. 25-31, 2002.

MARGARIDO, V. P.; ROMAN, M. P. Estudos citogenéticos em *Glanidium ribeiroi*, *Pariolius* sp. *Rhamdia voulezi* (Pisces, Siluriformes) coletados no rio Iguaçu-Paraná. In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 46°, 2000, Gramado. *Anais* 46° Congresso Nacional de Genética, Águas de Lindóia (SP), 2000, p. 53.

MARTINEZ, J. F.; ROBERTO, L. L.; BLANCO, D. R.; TRALDI, J. B.; SILVA, L. F.; VENERE, P. C.; SOUZA, I. L.; MOREIRA-FILHO, O. Comparative cytogenetics of three populations from the *Rhamdia quelen* species complex (Siluriformes, Heptapteridae) in two Brazilian hydrographic basins. *Caryologia*, v. 64, n. 1, p. 121-128, 2011.

MATTANÓ, H.; DIAS, A. L. Dados cromossômicos preliminares em *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Pimelodidae) da bacia do rio Tibagi- PR. In: SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA E GENÉTICA DE PEIXES, X, 2004, Natal. *Anais* X Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes, Natal (RN), 2004, p.131.

MESTRINER, C. A. *Análise de regiões organizadoras de Nucléolos e investigação do sistema XX/XY decrito para Leporinus lacustris* (Pisces, Anostomidae). São Carlos, SP, 1993, 58f. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) - Universidade Federal de São Carlos.

MILHOMEN, S. S. R.; PIECZARKA, J. C.; CRAMPTON, W. G. R.; SOUZA, A. C. P.; CARVALHO JR, J. R.; NAGAMACHI, C. Y. Differences in karyotype between two sympatric species of *Gymnotus* (Gymnotiformes: Gymnotidae) from the eastern Amazon of Brazil. *Zootaxa*, v. 1397, p. 55–62, 2007.

MORAES, V. P. O.; CARNEIRO, J. S.; DIAS, A. L.; MORAES, V. P.O. B Chromosome in four different populations of *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae): a comparative study of frequency and distribution. *Folia Biol*, v. 57, n. 3, p. 165–169, 2009.

MORAES, V. P.O.; CARNEIRO, J. S.; DIAS, A. L.; MORAES, V. P. O.; CARNEIRO, J. S.; CARNEIRO, J. S.; DIAS, A. L. Intraspecific chromosome analysis in *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae). *Cybium*, v. 34, n. 4, p. 397–398, 2010.

MORAES, V. P. O.; CEREALI, S. S.; FROEHLICH, O.; DIAS, A. L. Cytogenetic characterization of *Rhamdia quelen* (Siluriformes: Heptapteridae) from the Bodoquena Plateau, Mato Grosso do Sul, *Brazil*. *Genet Mol Res*, v. 6, n. 3, p. 627–633. 2007.

NOLETO, R. B.; VICARI, M. R.; CESTARI, M. M.; ARTONI, R. F. Variable B chromosomes frequencies between males and females of two species of pufferfishes (Tetraodontiformes). *Rev Fish Biol Fisheries*, v. 22, p. 343-349, 2012.

PENITENTE, M., VOLTOLIN, T. A., SENHORINI, J. A., BORTOLOZZI, J., FORESTI, F., PORTO-FORESTI, F. Transmission rate variation among three B chromosome variants in the fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* (2013)

PERDICES, A.; BERMINGHAM, E.; MONTILLA, A.; DOADRIO, I., Evolutionary history of the genus *Rhamdia* (Teleostei, Pimelodidae) in Central America. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 25, p. 172-189, 2002.

PORTO, F. E.; PORTELA-CASTRO, A. L.; MARTINS-SANTOS, I. C. Possible origins of B chromosomes in *Rineloricaria pentamaculata* (Loricariidae, Siluriformes) from the Paraná River basin. *Genet Mol Res.*, v. 24, n. 9, p. 1654-9, 2010.

RIBEIRO, L. B.; MATOSO, D. A.; ALMEIDA, M. C.; VICARI, M.R.; MORAES NETO, A.; SVIDNICKI, M. C.; ARTONI, R. F. Karyotypic variability in

*Iheringichthys labrosus* (Teleostei, Pimelodidae) from the Tibagi River basin (Paraná State, Brazil). *Genetics and Molecular Research*, v. 7, n. 3, p. 718-724, 2008.

ROMAN, M. P.; MOREIRA-FILHJO, O.; MARGARIDO, V. P. O cariótipo de *Rhamdia branneri* (Pisces, SILURIFORMES, PIMELODIDAE) do rio Iguaçu e um caso de triploidia natural. In: SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA E GENÉTICA DE PEIXES, IX, 2002, Maringá. *Anais IX Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes*, Maringá (PR), 2002, p.76.

SILVA, C. T.; DIAS, A. L.; GIULIANO-CAETANO, L. (1996). Análise citogenética em *Iheringichthys labrosus* e *Pimelodella* sp. (Pisces, Pimelodidae) da Bacia do rio Tibagi. In: *VI Simpósio de Citogenética Evolutiva Aplicada a Peixes Neotropicais*, São Carlos (SP), p. 76.

SILVA, S. V. S. Estudos Citogenéticos de quatro populações de *Rhamdia quelen* da região do Triângulo Mineiro. Uberlândia, 2007, 44f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Federal de Uberlândia.

STIVARI, M. K.; MARTINS-SANTOS, I. C. Karyotype Diversity in Two Population of *Rhamdia quelen* (PISCES, HEPTAPTERIDAE). *Cytologia*, v. 69, n. 1, p. 25-34, 2004.

SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Explorer Cellular Research*, n. 74, p. 304-306, 1972.

SUMNER, A. T. *Chromosome Banding*. Cambridge: Unwin Hyman. 1990.

SWARÇA, A. C.; CAETANO, L.; DIAS, A. L. Cytogenetics of species of the families Pimelodidae and Rhamdiaidae (Siluriformes). *Genetics and Molecular Biology*, v. 23, n. 3, p. 589-593, 2000.

TORRES-MARIANO, A. R.; MORELLI, S. B chromosomes in a population of *Astyanax eigenmanniorum* (Characiformes, Characidae) from the Araguari River Basin (Uberlândia, MG, Brazil). *Genetics and Molecular Biology*, v. 31, p. 246-249, 2008.

TSUDA, J. R.; MORAES, V. P. O.; GIULIANO-CAETANO, L.; DIAS, A. L. Occurrence of natural triploidy in *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae). *Genet. Mol. Res.*, v. 9, n. 3, p. 1929-1935, 2010.

VALCAREL, A.; BRUNNER, P.; MAGGESE, C. B-chromosome polymorphism in the South American catfish, *Rhamdia sapo*. *Aquaculture*, v. 110, p. 111-118, 1993.

VISSOTTO, P. C.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Karyotype description of five species of Pimelodidae (Teleostei, Siluriformes). *Chromosom Sci*, v. 3, p. 1–7, 1999.

VISSOTTO, P. C.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Karyotypic characterization of two species of the genus *Imparfinis* (Teleostei, Siluriformes, Heptapteridae). *Chromosom Sci*, v. 5, p. 97–103, 2001.

VOLTOLIN, T. A.; PANSONATO, A. J. C.; SENHORINI, J. A.; FORESTI, F.; CAMACHO, J. P. M.; PORTO-FORESTI, F. Common Descent of B Chromosomes in Two Species of the Fish Genus *Prochilodus* (Characiformes, Prochilodontidae). *Cytogenet Genome Res*, v. 141, p. 206-211, 2013.

YOSHIDA, K.; TERAII, Y.; MIZOIRI, S.; AIBARA, M.; NISHIHARA, H.; WATANABE, M.; KUROIWA, A.; HIRAI, H.; HIRAI, Y.; MATSUDA, Y.; OKADA, N. B Chromosomes Have a Functional Effect on Female Sex Determination in Lake Victoria Cichlid Fishes. *PLoS Genetics*, v. 7, l. 8, 2011.

WEBER, C. 2003. Subfamily Hypostominae (Armored catfishes). Pp. 351-372. In: *Check List of the freshwater fishes of South America*. Reis, R. E.; Kullander, S. O.; Ferraris Jr., C. J. (Eds.). Porto Alegre, Edipucrs, 729p;

ZHANG, Q.; ARAI, K. Extensive karyotype variation in somatic and meiotic cells of the loach *Misgurnus anguillicaudatus* (Pisces:Cobitidae). *Folia Zool.*, v. 52, n. 4, p. 423-429, 2003.

### **Capítulo III**

## **Emprego do teste de micronúcleo em peixes para avaliação de contaminação ambiental na microrregião de Catalão-GO**

O presente trabalho foi escrito de acordo com as normas da Environmental  
Science and Pollution Research

## Capítulo III

### Resumo

Os rios da microrregião de Catalão, Goiás, Brasil são expostos às ações antropogênicas intensas por atividades agropecuárias, industriais e lixo urbano. O potencial genotóxicos dos três pontos da microrregião foi analisado s por meio do teste de Micronúcleo (MN). Os resultados mostraram respostas genotóxicas diferentes para os pontos monitorados, sendo que as frequências de micronúcleos observadas nos pontos 1, 2 e 3 são significativamente maiores que as encontradas no local de referência, ponto 4 ( $p < 0.01$ ). As maiores frequências de micronúcleos em *Astyanax fasciatus* e *Astyanax altiparanae* foram observadas nos pontos 1 e 2. No ponto 3, *Characidium fasciatum* apresentou os maiores índices de células micronucleadas. Correlações indicaram que o MN realizado com as espécies *A. altiparanae* e *A. fasciatus* foi sensível às elevações de concentração de zinco nos sedimentos e água. Já os espécimes de *C. fasciatum* apresentam uma significativa correlação entre a ocorrência de eventos genotóxicos e concentração de cromo no sedimento. Sugerindo que espécies bentônicas e nectônicas possuem sensibilidades diferentes em relação aos íons de metais pesados.

Palavras-chave: genotoxicidade, poluição da água, cromo, ecossistema aquático, *Astyanax*

### Abstract

The rivers from the micro region of Catalão, Goiás State, Brazil are exposed to intense anthropogenic influences, such as agricultural activities, industry and urban waste. The genotoxicity of three points of the micro region were analyzed with the Micronucleus test. Accordingly to the results of the study, the species in sites 1, 2 and 3 exhibited an increase in their frequency of MN compared to specimens from site 4 ( $p > 0.01$ ). Significant increases in the frequency of micronuclei (MN) occurred in erythrocytes of *A. fasciatus* and *A. altiparanae* at sites 1 and 2. At site 3 is possible to observe higher frequencies of MN in *C. fasciatum*. The MN induction in *C. fasciatum* was correlated to chromium in

water and sediment, whilst *A. fasciatum* and *A. altiparanae* showed small correlation with zinc in water and sediment. This data suggest that benthic and nektonic species have different sensitivities in relation to heavy metal ions.

Keywords: genotoxicity, water pollution, chromium, aquatic ecosystem, *Astyanax*

## **Introdução**

A poluição de rios é uma das principais preocupações, pois além de ser uma ameaça a esse frágil ecossistema, é também um problema de saúde pública. A fragilidade do ecossistema aquático é devido ao fato dele receber grande parte dos contaminantes oriundos das áreas urbanas, indústrias e também das atividades agropecuárias (Van der Oost et al. 2003). Um dos principais poluentes são os íons de metais pesados, pois se acumulam no organismo rapidamente e possuem metabolismo e excreção lentos nos animais. A principal fonte de contaminação por íon de metais pesados da água é oriundo de indústrias, sendo chumbo, cromo, zinco e mercúrio os principais metais pesados poluidores (Outridge e Noller 1991; Sabale et al. 2012).

Os sedimentos são de extrema importância para detectar a qualidade de água em córregos e rios em relação aos metais pesados. Existem duas camadas de sedimentos, uma mais profunda e a superficial, que fica em contato com a água. Essa camada superficial é importante, pois é rica em matéria orgânica e em poluentes. Devido a esse contato constante e servirem como armazenadores e lançadores de metais pesados para a água, os sedimentos podem ser utilizados para detectar a presença de contaminantes lançados no leito aquífero que não permanecem solúveis. (Sampaio 2003).

A contaminação de sedimentos contribui para acumulação de metais pesados em invertebrados bentônicos devido ao seu contato íntimo e alta tolerância a esses metais. Essa tolerância apresentada por esses animais pode acarretar na contaminação de outros níveis tróficos. Animais carnívoros tendem a acumular menos metais pesados que animais herbívoros e detritívoros (Weber et al. 2013). A concentração de metais pesados na água tende a ser menor que a encontrada nos sedimentos e órgãos da ictiofauna, pois esses

possuem alta capacidade de acúmulo de zinco (Zn) e cromo (Cr) (Gurcu et al. 2010).

O teste de micronúcleo é um dos principais métodos para avaliação genotóxica de poluentes ambientais. Esse tipo de ensaio tem sido utilizado para monitoramento da qualidade do ar de áreas urbanas (Pereira et al. 2013; Misik et al. 2011) e de águas (Van der Oost et al. 2003; Lemos et al. 2011; Kushwaha et al. 2012; Paul et al. 2013). Nos ambientes aquáticos, essa técnica adquire uma maior importância, pois é o principal meio para análise de ações genotóxicas de componentes químicos (Ergene et al. 2007). Micronúcleos (MN) são causados pela ação de componentes clastogênicos, agentes que induzem as quebras no DNA e/ou aneugênicos, que induzem a perda ou migração tardia das cromátides (Albertini et al. 2000).

Teste de micronúcleo também é uma alternativa para a detecção de efeitos de componentes genotóxicos em sedimento. Bioensaios realizados em laboratório *in vivo* e *in vitro* já foram utilizados para verificar a genotoxicidade dos poluentes contidos nos sedimentos (Boettcher et al. 2010; Costa et al. 2011; Benedetti et al. 2012). Entretanto, as análises de animais oriundos do campo são mais precisas, além de fornecerem uma visão integrada dos impactos sofridos pelo ecossistema e do real risco genotóxico ao qual estão expostos (Chapman et al. 2006).

Os peixes são modelos ideais para detectar a presença de contaminantes genotóxicos nos ecossistemas aquáticos (Souza et al. 2013), pois são organismos sensíveis aos baixos níveis de metais na água (El- Shehawi 2007), abundantes e de hábitos diversos. O teste de micronúcleos em eritrócitos de peixes é utilizado para monitoramento da qualidade de águas, principalmente, nos países em desenvolvimento (Sikder et al. 2013).

A bacia do córrego Santo Antônio localiza-se no sudeste do estado de Goiás, (Brasil), a leste da cidade de Catalão, Goiás (GO) e tem como principal afluente o córrego Mandaguari. O córrego Santo Antônio, por sua vez, é afluente da margem direita do Ribeirão Ouvidor, e este, afluente da margem direita do Rio Paranaíba, um dos grandes rios formadores da bacia hidrográfica do Paraná. As nascentes dos córregos Santo Antônio e Mandaguari encontram-se adjacentes a BR 050, dentro da área urbana de Catalão (GO). A

porção da nascente do córrego Mandaguari abrange parte dos bairros localizados no setor leste de Catalão, a BR 050 e, ainda, a área onde se localiza uma indústria de fertilizantes (Figura 01). As nascentes do córrego Santo Antônio apresentam características morfológicas semelhantes aos do córrego Mandaguari: um anfiteatro circundado pelos bairros do setor leste da cidade de Catalão e pela BR 050.

O córrego da Lagoa é o manancial responsável pelo abastecimento de água do município de Ouvidor e é, juntamente com o córrego Santo Antônio e Mandaguari, uma sub-bacia do Riberão do Ouvidor, que abastece os municípios de Catalão, Ouvidor, Três Ranchos e Cumari.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar as condições ambientais de três pontos localizados nos córregos Santo Antônio, Mandaguari e o córrego da Lagoa, relacionadas à qualidade de suas águas, que são fonte de abastecimento de municípios em desenvolvimento em Goiás; dos sedimentos, verificar a sensibilidade do teste de micronúcleo em três espécies diferentes de peixes frente à contaminação por cromo, produto liberado no ambiente por diversas atividades antropogênicas e dentro dos parâmetros estabelecidos na legislação vigente.

## ***Material e Métodos***

### **Amostras de Água**

Catalão é uma cidade localizada no estado de Goiás, a 260 km da Capital Goiânia. As coletas foram realizadas no ano de 2008 e 2009, nos períodos da seca e cheia. Assim os locais escolhidos foram baseados nos níveis aparentes de poluição mais críticos (Tabela 1). A figura 1 mostra a localização dos pontos de coletas em relação à cidade de Catalão e Ouvidor – GO. As amostras de água foram coletadas em 4 pontos amostrais. O córrego do Mandaguari próximo a uma indústria de fertilizantes, foi definido como ponto 1 (18° 10' 58.69" S 47° 54' 28.46" O). O córrego do Santo Antônio, ponto 2, está localizado no perímetro urbano (18° 11' 24.18" S 47° 55' 17.45" O), enquanto o ponto 3, córrego da Lagoa está localizado no município de Ouvidor, a 270 Km de Goiânia e 15 Km de Catalão (18° 14' 04.46" S 47° 49' 18.78"). O córrego da Lagoa é cercado por propriedades rurais e indústria de mineração. O local de

referência foi definido como o ponto 4 (18° 11' 37.63" S 47° 53' 52.18" O) devido a qualidade da água.

Para esse trabalho, utilizaram-se frascos de vidro na cor âmbar com capacidade de 1.000 mL, previamente identificados com os números dos pontos correspondentes, data, hora da coleta e nome do responsável pela coleta. As análises foram realizadas nos laboratórios do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia, segundo normas da ABNT(2007) ou da *Standard Methods for Examination Water and Wastewater* (1998)

### **Amostras de Sedimentos**

Sedimentos de fundo foram coletados em todos os pontos amostrais, imediatamente após a coleta da água, com massa aproximada de 200 gramas por ponto. Sedimentos coletados foram acondicionados em recipientes plásticos dotados de tampa e devidamente identificados com as seguintes informações: número do ponto de coleta; data e hora da coleta e nome do responsável pela coleta. Todas as amostras coletadas foram acondicionadas em uma caixa isotérmica refrigerada, mantendo-se assim até o início das análises químicas no Laboratório de Análises Químicas da Universidade Federal de Uberlândia.

### **Captura de Espécies da Ictiofauna**

Da espécie *Astyanax fasciatus* (lambari), foram coletados 50 animais nos quatros pontos de análise. A espécie *Astyanax altiparanae* (lambari de rabo amarelo), foram coletados 43 animais. Da espécie *Characidium fasciatum* foram coletados 38 espécimes dos pontos 1, 3 e 4. Apesar da escolha das espécies para análise de micronúcleo ser pautada na ampla ocorrência das mesmas na bacia do Paraná e seus afluentes, exemplares de *Characidium fasciatum* não foram capturados no ponto 2 durante o período do estudo.

Espécies da ictiofauna foram capturadas com uso de redes de malha fina, uma tarrafa de malha fina, uma peneira com malha de 4mm de abertura e 70 cm de diâmetro e um caniço com linha e anzol. As redes foram colocadas nos pontos indicados geralmente no final da tarde e mantidas até 10 horas do dia seguinte, quando se iniciava o processo de coleta. O emprego desses procedimentos de captura deve-se a necessidade de manter vivo certo número de exemplares de cada espécie para posterior análise de micronúcleo.

### **Teste de Micronúcleo**

Após a coleta dos espécimes foi retirado sangue periférico na artéria branquial, por meio de seringas de 1,0mL estéreis, sendo uma para cada animal, previamente heparinizada com liquemine (heparina sódica - 25000 U.I./ 5 mL). Imediatamente foram realizados os esfregaços (deslizamento da gota de sangue sobre as lâminas de microscópio), que foram secas ao ar por 24 horas (Grisolia e Starling, 2001). A seguir, as células foram fixadas com metanol absoluto, por dez minutos. As lâminas foram submetidas ao processo de coloração com Giemsa e tampão fosfato (pH - 6,8) na proporção de 1 : 20, durante 10 minutos, e após enxaguadas com água destilada e secadas ao ar. Foram preparadas 4 lâminas para cada animal

Foram analisados 4.000 eritrócitos por animal em microscópio de luz (aumento de X 1000 magnificação - uso de óleo de imersão), analisadas, conforme Schmid (1975). Os critérios para identificação de eritrócitos de peixe micronucleados foram as partículas nucleares, que deveriam ser menores e completamente separadas do núcleo principal; não-refratária; com mesma forma, coloração e intensidade do núcleo da célula e, dentro do citoplasma celular.

### **Análise estatística**

Análise de Variância (ANOVA) para dois fatores foi utilizada para avaliar a existência de diferença entre os pontos avaliados (perímetro urbano, agricultura, indústria de fertilizante e controle) e as espécies monitoradas (*A.fasciatus*, *A. altiparanae* e *C. fasciatum*). A sensibilidade do teste de micronúcleo para cada espécie em relação à presença e concentração de cromo e zinco foi testada pela correlação de Pearson.

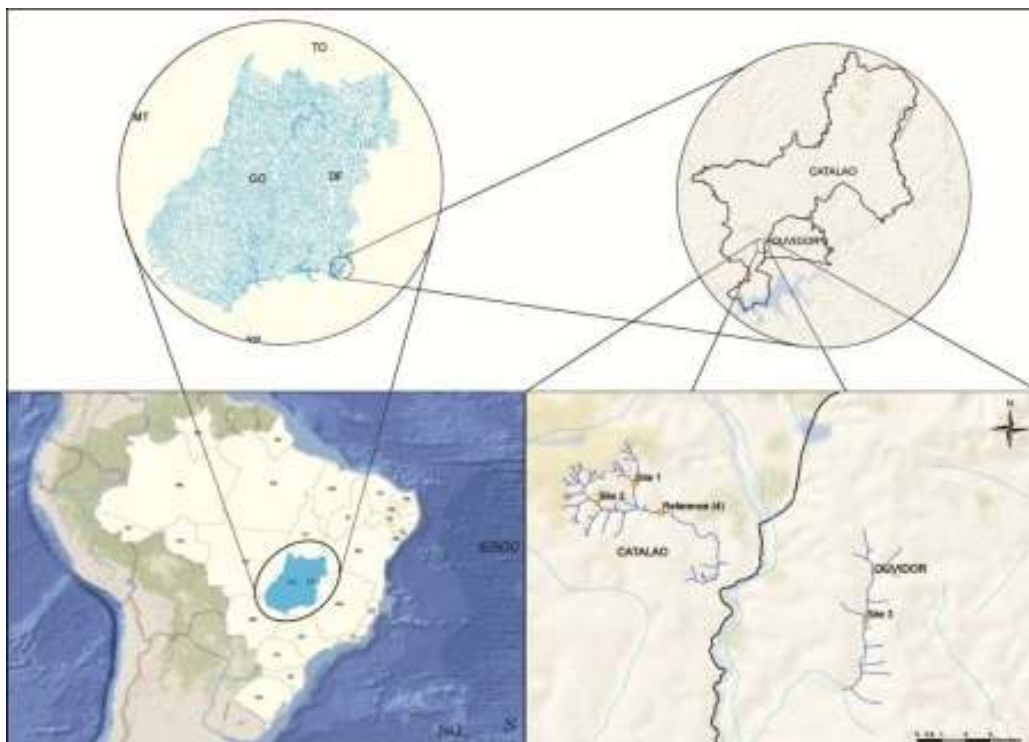


**Figura 1:** Mapa do estado de Goiás mostrando os locais de monitoramento e ponto de referência.

## **Resultados e Discussão**

ANOVA para dois fatores foi utilizada para avaliar a existência de diferença entre as respostas obtidas nos pontos avaliados e nas espécies monitoradas. De acordo com os resultados indicados na tabela 3, os ensaios de biomonitoramento, empregando o Teste de Micronúcleos, mostraram respostas genotóxicas diferentes para os pontos monitorados, sendo que as frequências de micronúcleos observadas nos pontos 1, 2 e 3 são significativamente maiores que as encontradas no local de controle, ponto 4 ( $F= 5.18$ ,  $p=0.01$ ).

O incremento na frequência de eritrócitos micronucleados foi observado em *A. fasciatus*, *A. altiparanae* e *C. fasciatum*. Contudo, a ANOVA indica que não houve diferença significativa entre as três espécies empregadas ( $F= 1.44$ ,  $p=0.26$ ).

Dentre os pontos monitorados, as maiores frequências de micronúcleos em células de *A. fasciatus* e *A. altiparanae* foram observadas nos pontos 1 e 2.

No ponto 3, *C. fasciatum* apresentou os maiores índices de células micronucleadas.

Ainda que os locais monitorados durante a estação chuvosa tenham sido associados à ocorrência de eventos genotóxicos, as maiores frequências de micronúcleos foram observados nos ensaios realizados com animais coletados na estação seca ( $p < 0.01$ ).

As análises físico-químicas realizadas em todos os pontos monitorados, sumarizadas nas tabelas 1 e 2, indicam contaminação por zinco e cromo, além de evidenciarem condições de baixa qualidade pelo aumento de nitrogênio amoniacal e fosfato nos locais analisados.

O fosfato e nitrogênio amoniacal (Tabela 1) estão aumentados, segundo os critérios estabelecidos pelo conselho nacional do meio ambiente brasileiro (CONAMA 357/05) e Organização Mundial da Saúde (OMS 2004), respectivamente. Os elementos cromo e zinco na análise da água estiveram abaixo dos limites estabelecidos pelas legislações comparadas, entretanto, o ponto 3, no período da cheia, apresentou um índices de contaminação por esses metais que está acima dos limites estabelecidos pela legislação brasileira, OMS e Conselho Canadense de Ministérios do Meio Ambiente. É pertinente ressaltar que a legislação canadense apresenta os limites mais rigorosos para avaliação de águas e sedimentos. Na análise de sedimentos, conforme indicado na tabela 2, os metais pesados zinco e cromo não estão acima dos limites indicados pelos parâmetros nacionais (CONAMA 454/12) e internacionais (OMS/CCME), mas o ponto 3 encontra-se próximo ao limite estabelecido pelo CCME. Segundo os parâmetros nacionais estabelecidos, o fósforo também apresentou aumento nos três pontos analisados.

As análises químicas nos sedimentos revelam que os níveis de cromo estiveram próximos ao nível máximo permitido para a classe 1 e 2 de água para consumo humano após tratamento e a proteção das comunidades aquáticas segundo o CONAMA (357/05). O sulfato encontra-se abaixo dos limites estabelecidos pela legislação brasileira.

Esses dados, provenientes das análises físico-químicas e biológicas, combinados, indicam a presença de genotoxinas na água, como os metais pesados que, ao afetarem os organismos bioindicadores, permitem inferir sobre

o potencial risco às populações humanas e animais que consomem água e organismos aquáticos.

Para acessar a sensibilidade das diferentes espécies ao ambiente avaliado, foram realizadas correlações entre as taxas de micronúcleos observados nas três espécies de bioindicadores e as concentrações dos metais cromo e zinco na água e no sedimento.

Os resultados dessas correlações indicam que o Teste de Micronúcleos realizado com as espécies *A. altiparanae* e *A. fasciatus* foi moderadamente sensível às elevações de concentração de zinco nos sedimentos e água, já os espécimes de *C. fasciatum* apresentam uma significativa correlação entre a ocorrência de eventos genotóxicos e incrementos na concentração de cromo no sedimento (Tabela 4).

As espécies do gênero *Astyanax* possuem, em geral, grande resistência a ambientes poluídos e ampla distribuição no país. A concentração desses espécimes é maior na proximidade das áreas urbanas do que em áreas de intensa agricultura, devido ao acúmulo de biomassa nesses locais (Alexandre et al. 2010). O *A. altiparanae* era conhecido com *A. bimaculatus*, a nova denominação foi dada por Garutti e Britski (2000). Os indivíduos adultos localizam-se mais ao fundo enquanto os juvenis se concentram mais na zona limérica (Suzuki e Orsi 2008), mesma zona de ocorrência dos *A. fasciatus* que possui um maior tamanho que o *A. altiparanae* (Langeani et al. 2007). Ambas as espécies são de alimentação nectônicas e consideradas onívoras, mas *A. fasciatus* tem uma alimentação mais diversificada ingerindo mais plantas e sedimentos que do *A. altiparanae*. (Gomiero e Braga 2008). Entretanto o *A. altiparanae* possui uma grande capacidade de mudar sua dieta de acordo com as mudanças ambientais e disponibilidade de alimentos (Lobón-Cerviá e Bennemann 2000). Os espécimes de *Characidium fasciatum* reinhardt são animais de hábito alimentar bentônicos e predadores (Brejão et al. 2013). Os resultados obtidos com o presente trabalho demonstram que essa espécie possui características de um bioindicador eficaz e sensível, principalmente para contaminação de sedimentos.

A utilização de mais de uma espécie para realizar o biomonitoramento é importante estratégia que permite determinar a verdadeira ação genotóxica dos

poluentes ambientais, uma vez que as diferentes espécies possuem diferentes sensibilidades (Van der Oost et al. 2003) e taxa de micronúcleo frente ao agente ecotóxico (Palhares e Grisolia 2002; Rodriguez-Cea et al. 2003; Kumar et al. 2013) ou frequências basais de micronúcleo (Gustavino et al. 2001). No presente trabalho verificou-se uma incidência de micronúcleos semelhantes nos pontos 1 e 2 nos espécimes de *A. altiparanae* e *A. fasciatus*, locais com contaminação por zinco, quando comparados com *Characidium fasciatum*. Nas análises de micronúcleos de *A. bimaculatus* e *H. malabaricus* observou-se uma maior ocorrência de micronúcleos em *A. bimaculatus* (Pantaleão et al. 2006). Em estudo realizado com contaminação de metais pesados como zinco, chumbo e manganês, observou-se uma maior sensibilidade à ocorrência de micronúcleo em *Oreochromis niloticus*, espécie nectônica, quando comparado com a espécie bentônica *Mugil cephalus* (Omar et al. 2012).

Observou-se a presença de cromo, nos sedimentos, em todos os pontos de coleta, inclusive no controle. Entretanto, na análise de água, apenas o ponto 3, durante o período de cheia apresentou quantidades de cromo maior que os parâmetros recomendados pelos órgãos nacionais e internacionais de análise de água (Tabela 2). A maior presença de cromo nos sedimentos é devido à impossibilidade de encontrar cromo livre na natureza, deste modo a maioria do cromo é depositada em sedimentos dos córregos e rios. Exposição a altas concentrações de cromo por períodos prolongados possuem efeito genotóxicos e carcinogênico (Çavas e Ergene-Go“Zu“Kara 2005). Em estudo realizado por Krumschnabel e Nawaz (2004) verificou-se uma queda da viabilidade de hepatócitos em *Carassius auratus* expostos a 250 µM Cr (VI) por curtos períodos, a toxicidade desse composto deve-se a estimulação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Nos mamíferos a exposição ao Cr (VI) está ligada a formação de tumores intestinais (Thompson et al. 2012).

Os exemplares analisados de *Characidium fasciatum* mostraram-se mais sensíveis às alterações de cromo nos sedimentos quando comparados com as outras espécies analisadas. A ocorrência de micronúcleos em *C. fasciatum* apresentou uma forte correlação com a presença de cromo nos sedimentos. Em estudos realizados em *Pimelodus maculatus* e *Leporinus friderici* observou-se uma maior frequência de micronúcleos em *P. maculatus*, demonstrando que,

essa espécie com alimentação bentônica e carnívora, apresenta uma maior sensibilidade às alterações de cromo e sulfetos na água (Pimenta et al. 2013).

A principal fonte de sulfeto em águas naturais é o lançamento de esgotos sanitários e de efluentes industriais, que contenham uma maior quantidade de sulfato como observado nos pontos 1 e 2 (Tabela 1), em condições anaeróbias. Apesar da presença abaixo do critério observado pelos órgãos legisladores, devido à ação biológica pode ocorrer redução do sulfato em sulfeto. A presença de fosfato também está ligada a proximidade do perímetro urbano e indústrias, sua principal fonte são detergentes e resíduos não tratados de indústrias de fertilizantes (Ghose et al. 2009).

O alto índice de fosfato encontrado é ligado ao processo de eutrofização (Jarvie et al. 2013), crescimento de algas nos locais, a proliferação de algas leva a queda do oxigênio dissolvido acarretando na mortalidade da ictiofauna (Zha et al. 2010). O fosfato é considerado um dos maiores problemas ambientais, sendo sua presença não tolerada em alguns países, como por exemplo, a Suíça (Jyothi et al. 2012) e seu uso controlado nos outros países da Europa e no EUA (Lewis et al. 2011). Contudo, nos países em desenvolvimento, há uma maior flexibilização dos parâmetros e menor controle da qualidade da água. Desse modo é observada uma maior contaminação de rios e córregos quando comparados com os países desenvolvidos (UNFPA 2001; Sikder et al. 2013).

No presente trabalho, apesar das análises de metais pesados não excederem os limites estabelecidos pelo órgão nacional e internacionais, as espécies estudadas apresentam uma grande sensibilidade à presença do poluente. Em estudos realizados em rios de áreas em desenvolvimento, Brito *et al.* (2012) não encontrou alterações nas análises de água segundo o critério da legislação brasileira de água (the Brazilian for Water Quality Legislation). Entretanto em análises bioquímicas de peixes foi possível detectar distúrbios na osmorregulação e regulação do processo ácido-base, além de necrose no fígado, processos neoplásicos e micronúcleo em um dos sítios analisados, mostrando o quanto é sensível a ictiofauna às ações antrópicas. O teste de micronúcleos em eritrócitos de peixes é uma importante ferramenta para indicar a ação de agentes genotóxicos presentes na água (Kumar et al. 2013), devido

ao seu baixo custo e facilidade de execução. As características e sensibilidades às alterações de água e sedimentos na ictiofauna, como demonstrado neste estudo, tornam a utilização das espécies excelentes para auxiliar a detectar os efeitos dos impactos urbanos, agrícolas e industriais em rios.

Os resultados do presente estudo conclui que os exemplares de *A. fasciatus* e *A. altiparanae* são sensíveis à contaminação por zinco, entretanto *C. fasciatum* reinhardt é extremamente susceptível a presença de cromo nos sedimentos. Sugerindo que espécies bentônicas e nectônicas possuem sensibilidades diferentes em relação aos íons de metais pesados e por isso devem ser utilizadas juntas para o biomonitoramento de águas. Os resultados também fornecem subsídios para concluir que não há diferença na frequência de micronúcleos provenientes de diferentes fontes de contaminação, indústria, área urbana e agricultura. Deste modo, é necessário um replanejamento do uso do solo e inclusão de análises de outras matrizes, como micronúcleo, na concepção de leis mais rígidas para uso das águas. Visto que, os contaminantes, mesmo em baixas concentrações, provocam efeitos genotóxicos na ictiofauna nativa.

**Tabela 1:** Características gerais dos 4 pontos de amostragem, durante o período da seca e cheia.

| Características físico-químicas da água ( <i>in situ</i> ) | Ponto 1           |                   | Ponto 2           |                   | Ponto 3           |                     | Ponto 4           |                   | CONAMA 357/05 | OMS     | CCME    |
|------------------------------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|---------------------|-------------------|-------------------|---------------|---------|---------|
|                                                            | Seca              | Cheia             | Seca              | Cheia             | Seca              | Cheia               | Seca              | Cheia             |               |         |         |
| Temperatura                                                | 22,75             | 25,50             | 22                | 23,50             | 20                | 22,50               | 20,5              | 23,50             | NE            | NE      |         |
| pH                                                         | 6,82              | 6,80              | 6,55              | 6,67              | 6,63              | 6,57                | 6,81              | 6,85              | 6,0 - 9,0     | 6,0-8,5 | 6,5-8,5 |
| Oxigênio dissolvido (mg/L)                                 | 6,85              | 6,65              | 7,13              | 6,96              | 12,35             | 12,30               | 7,00              | 6,85              | < 5           | < 5     |         |
| Condutividade IS/cm)                                       | 166,63            | 170,88            | 89,00             | 85,50             | 14,5              | 15,50               | 82,25             | 75,50             | NE            | NE      | NE      |
| Turbidez (NTU)                                             | 21,25             | 22,00             | 56,00             | 21,00             | 20,60             | 19,10               | 24,25             | 21,75             | 100           | 29      | ≤ 1,0   |
| Ferro (mg/L)                                               | 0,24              | 0,23              | 0,22              | 0,21              | 0,18              | 0,13                | 0,23              | 0,22              | 0,3           | 0,3     | ≤ 0,30  |
| Fosfato (mg/L)                                             | 1,61 <sup>a</sup> | 1,82 <sup>a</sup> | 0,73 <sup>a</sup> | 0,70 <sup>a</sup> | 0,19 <sup>a</sup> | 0,14 <sup>a</sup>   | 0,41 <sup>a</sup> | 0,35 <sup>a</sup> | 0,030         | NE      | NE      |
| Nitrogênio amoniacal (mg/L)                                | 0,55 <sup>b</sup> | 0,64 <sup>b</sup> | 0,22 <sup>b</sup> | 0,25 <sup>b</sup> | 0,17 <sup>b</sup> | 0,19 <sup>b</sup>   | 0,19 <sup>b</sup> | 0,19 <sup>b</sup> | 3,7           | ≤ 0,02  | 10      |
| Sulfato (mg/L)                                             | 18,4              | 11,60             | 4,26              | 4,26              | 0,2               | 0,20                | 3,1               | 3,10              | 250           | 200     | ≤ 500   |
| Potássio (mg/L)                                            | 4,67              | 5,03              | 3,18              | 3,11              | 1,37              | 2,89                | 2,89              | 3,69              | NE            | NE      | NE      |
| Zinco (mg/L)                                               | 0,11              | 0,11              | 0,04              | 0,08              | 0                 | 0,01                | 0,02              | 0,05              | 0,18          | 3,0     | <5,0    |
| Cromo (mg/L)                                               | 0,01              | 0,01              | 0,00              | 0,02              | 0,04              | 0,07 <sup>abc</sup> | 0,05              | 0,02              | 0,05          | 0,05    | 0,05    |

<sup>a</sup> alterações segundo o Conselho Nacional de Meio Ambiente - Resolução No 357/2005 (CONAMA)

<sup>b</sup> alterações segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS)

<sup>c</sup> alterações de acordo com Conselho Canadense de Ministérios do Meio Ambiente (CCME)

Não especificado (NE)

**Tabela 2:** Análises físico-químicas dos sedimentos durante a estação seca e de cheia.

| Análise química dos sedimentos | Ponto 1 |       | Ponto 2 |       | Ponto 3 |       | Ponto 4 |       | CONAMA 454/12 | CCME |
|--------------------------------|---------|-------|---------|-------|---------|-------|---------|-------|---------------|------|
|                                | Seca    | Cheia | Seca    | Cheia | Seca    | Cheia | Seca    | Cheia |               |      |
| Sulfato (ppm)                  | 0,2     | 0,2   | 0,2     | 0,2   | 0,16    | 0,2   | 0,18    | 0,18  |               |      |
| Fósforo total (ppm)            | 5,5     | 18,62 | 6,25    | 5,50  | 0,15    | 0,45  | 3,3     | 2,30  | < 2000        | NE   |
| Sólidos totais voláteis (%)    | 3,80    | 4,61  | 2,97    | 3,73  | 2,60    | 3,56  | 3,14    | 3,26  |               |      |
| Sólidos totais fixos (%)       | 96,19   | 95,38 | 95,52   | 96,26 | 97,60   | 95,44 | 96,84   | 96,73 |               |      |
| Potássio (ppm)                 | 510     | 231   | 296     | 1016  | 785     | 761   | 698     | 1507  |               |      |
| Zinco (ppm)                    | 15,85   | 9,18  | 10,01   | 10,96 | 10,5    | 3,00  | 5,98    | 9,34  | 123           | 80   |
| Cromo (ppm)                    | 10,88   | 5,82  | 9,75    | 8,77  | 21,5    | 18,83 | 6,58    | 7,56  | 37,3          | 25   |
| Ferro (ppm)                    | 30438   | 17713 | 16527   | 468   | 3322    | 1347  | 13133   | 2822  |               |      |

Conselho Nacional de Meio Ambiente - Resolução No 454/2012 (CONAMA-454/2012)

Conselho Canadense de Ministérios do Meio Ambiente (CCME)

Não especificado (NE)

**Tabela 3:** Frequência de Micronúcleos (MN) para *A. fasciatus*, *A. altiparanae* e *C. fasciatum* obtidos nos pontos 1-4 durante o biomonitoramento nas estações indicadas.

| PONTO   | ESPÉCIE                | SECA MCN Frequência<br>(Média±SD) | CHEIA MCN Frequência<br>(Média±SD) |
|---------|------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| Ponto 1 | <i>A. fasciatus</i>    | 0.10 ± 0.03*                      | 0.08 ± 0.02*                       |
|         | <i>A. altiparanae</i>  | 0.13 ± 0.04**                     | 0.08 ± 0.03*                       |
|         | <i>C. fasciatum</i>    | 0.06 ± 0.02*                      | 0.04 ± 0.01*                       |
| Ponto 2 | <i>A. fasciatus</i>    | 0.09 ± 0.02*                      | 0.08 ± 0.03*                       |
|         | <i>A. altiparanae.</i> | 0.14 ± 0.04**                     | 0.12 ± 0.03*                       |
|         | <i>C. fasciatum</i>    | ND                                | ND                                 |
| Ponto 3 | <i>A. fasciatus</i>    | 0.04 ± 0.02*                      | 0.03 ± 0.01                        |
|         | <i>A. altiparanae</i>  | 0.08 ± 0.03*                      | 0.07 ± 0.02*                       |
|         | <i>C. fasciatum</i>    | 0.13 ± 0.05**                     | 0.07 ± 0.02*                       |
| Ponto 4 | <i>A. fasciatus</i>    | 0.01 ± 0.01                       | 0.01 ± 0.01                        |
|         | <i>A. altiparanae.</i> | 0.01 ± 0.02                       | 0.01 ± 0.01                        |
|         | <i>C. fasciatum.</i>   | 0.01 ± 0.01                       | 0.01 ± 0.01                        |

Resposta positiva de acordo com o teste de Dunnett's.

ND: não determinado.

\*p>0.01.

\*\*p>0.005.

**Tabela 4:** Coeficiente de correlação de Pearson entre as concentrações de metais pesados e o teste de Micronúcleos nas células de peixes.

| ESPÉCIE               | METAIS PESADOS |       |       |      |           |      |       |      |
|-----------------------|----------------|-------|-------|------|-----------|------|-------|------|
|                       | Cromo          |       |       |      | Zinco     |      |       |      |
|                       | Sedimento      |       | Água  |      | Sedimento |      | Água  |      |
|                       | $r^2$          | $p$   | $r^2$ | $p$  | $r^2$     | $p$  | $r^2$ | $P$  |
| <i>A. fasciatus</i>   | 0.17           | 0.31  | 0,16  | 0,06 | 0.31      | 0.14 | 0,56  | 0,25 |
| <i>A. altiparanae</i> | 0.03           | 0.63  | 0,03  | 0,10 | 0.37      | 0.11 | 0,31  | 0,15 |
| <i>C. fasciatum</i>   | 0.86           | 0.01* | 0,65  | 0,29 | 0.14      | 0.45 | 0,28  | 0,14 |

\* $p > 0.01$ .

## ***Referências Bibliográficas***

Albertini RJ., Anderson, D, Douglas, GR, Hagmar L, Hemminki K, Merlo F, Natarajan AT, Norppa H., Shuker DEG, Tice R, Water MD, Aitio A (2000) IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutation Research* 463:111–172.

Alexandre CV, Esteves KE, Mello MAMM (2010) Analysis of fish communities along a rural–urban gradient in a neotropical stream (Piracicaba River Basin, São Paulo, Brazil) *Hydrobiologia* 641:97-114.

Benedetti M, Ciapriani F, Piva F, Onorati F, Fattorini D, Notti A, Ausili, A, Regoli, F (2012) A multidisciplinary weight of evidence approach for classifying polluted sediments: Integrating sediment chemistry, bioavailability, biomarkers responses and bioassays. *Environment International* 38:17–28.

Boettcher M, Grund S, Keiter S, Kosmehl T, Reifferscheid G, Seit N, Rocha, PS, Hollert H, Braunbeck T (2010) Comparison of in vitro and in situ genotoxicity in the Danube River by means of the comet assay and the micronucleus test. *Mutation Research* 700:11–17.

Brejão GL, Gerhard P, Zuanon J (2013) Functional trophic composition of the ichthyofauna of forest streams in eastern Brazilian Amazon. *Neotropical Ichthyology* 11:361-373.

Brito IA, Freire CA, Yamamoto FY, Assis HCS, Souza-Bastos LR, Cestari MM, Ghisi NC, Prodocimo V, Neto FF, Ribeiro CA (2012) Monitoring water quality in reservoirs for human supply through multi-biomarker evaluation in tropical fish. *J. Environ. Monit.* 14:615-625.

Çavas T, Ergene-Go“zu“kara S (2005) Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. *Aquat Toxicol* 74:264–271.

CCME *Canadian Environmental Quality Guidelines and Summary Table*. (2003) IOP Publishing PhysicsWeb. [http://www.ccme.ca/publications/ceqg\\_rcqe.html](http://www.ccme.ca/publications/ceqg_rcqe.html). Acessado 24 Nov 2013.

Chapman, PM, Hollert H (2006) Should the sediment quality triad become a tetrad, a pentad, or possibly even a hexad? *J. Soils Sediments* 6:4–8.

CONAMA (2005) Conselho Nacional do Meio Ambiente (2005) Ministério do Meio Ambiente. Resolução CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre o estabelecimento de padrões nacionais de qualidade de água determinando as concentrações de poluentes atmosféricos. In: MMA. Livro das Resoluções do CONAMA. Brasília, 2005. . IOP Publishing PhysicsWeb <http://www.mma.gov.br/port/conama>. Acessado em 24 Nov 2013.

CONAMA (2012) Conselho Nacional do Meio Ambiente (2012) Ministério do Meio Ambiente. Resolução CONAMA nº 454, de 01 de novembro de 2012. Dispõe sobre *estabelece as diretrizes gerais e os procedimentos referenciais para o gerenciamento do material a ser dragado em águas* sob jurisdição nacional. In: MMA. Livro das Resoluções do CONAMA. Brasília, 2012. . IOP Publishing PhysicsWeb <http://www.mma.gov.br/port/conama>. Acessado em 24 Nov 2013.

Costa PM, Neuparth TS, Caeiro S, Lobo J, Martins M, Ferreira AM, Caetano M, Vale C, DelValls TA, Costa MH (2011) Assessment of the genotoxic potential of contaminated estuarine sediments in fish peripheral blood: Laboratory versus *in situ* studies. *Environmental Research*. 111:25–36.

El-Shehawi, FA, Seehy MA (2008) Micronucleas Test in Fish Genome: A sensitive Monitor for Aquatic Pollution African. *Journal of Biotechnology* 7: 606-612.

Ergene S, Cavaş T, Celik A, Köleli N, Aymak C (2007) Evaluation of River Water Genotoxicity Using the Piscine Micronucleus Test Environmental and Molecular. *Mutagenesis* 48:421-429.

Garutti V, Britski HÁ (2000) Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. *Comum. Mus. Ciênc. Tecnol* 13:65-88.

Ghose NC, Saha D, Gupta A (2009) Synthetic Detergents (Surfactants) and Organochlorine Pesticide Signatures in Surface Water and Groundwater of Greater Kolkata, India. *J. Water Resource and Protection* 4:290-298 DOI: 10.4236/jwarp.2009.14036.

Gomiero LM, Braga FMS (2008) Feeding habits of the ichthyofauna in a protected area in the state of São Paulo, southeastern Brazil. *Biota Neotrop.* 8:41-47.

Gurcu B, Yildiz S, Koca YBG, Koca S (2010) Investigation of Histopathological and Cytogenetic Effects of Heavy Metals Pollution on *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758) in the Gölmarmara Lake, Turkey. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 9:798-808.

Gustavino B, Scornajenghi KA, Minissi S, Ciccotti E (2001) Micronuclei induced in erythrocytes of *Cyprinus carpio* (teleostei, pisces) by X-rays and colchicine. *Mutat Res* 494:151–159.

Heddle JA, Cimino MC, Hayashi M, Romagna F, Shelby MD, Tucker JD, Vanprays Ph, MacGregor JT (1991) Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present, and future. *Environ. Mol. Mutagen.* 18:277–291.

Jarvie HP, Sharpley AN, Spears B, Buda AR, May L, Kleinman, P. J. A (2013) Water Quality Remediation Faces Unprecedented Challenges from “Legacy Phosphorus”. *Environ. Sci. Technol.* 47:8997–8998.

Jyothi MD, Kiran KR, Ravindhranath K (2012) Phosphate pollution control in waste waters using new bio-sorbents. *International Journal of Water Resources and Environmental Engineering* 4:73-85.

Krumschnabel G, Nawaz M (2004) Acute toxicity of hexavalent chromium in isolated teleost hepatocytes. *Aquat Toxicol* 70:159–167.

Kumar A, Kesari VP, Khan PK (2013) Fish micronucleus assay to assess genotoxic potential of arsenic at its guideline exposure in aquatic environment. *Biometals* 26:337-346.

Kushwaha, B, Pandey S, Sharma S, Srivastava R, Kumar R, Nagpure NS, Dabas A, Srivastava SK (2012) *In situ* assessment of genotoxic and mutagenic potential of polluted river water in *Channa punctatus* and *Mystus vittatus*. *International Aquatic Research* 4:16 doi:10.1186/2008-6970-4-16

Langeani F, Castro RM, Oyakawa OT, Shibatta OA, Pavanelli CS, Casatti L (2007) Diversidade da ictiofauna do Alto Rio Paraná: composição atual e perspectivas futuras. *Biota Neotropica* 7:181-197.

Lemos AO, Oliveira NCD, Lemos CT (2011) *In vitro* micronuclei tests to evaluate the genotoxicity of surface water under the influence of tanneries. *Toxicology in Vitro* 25:761-766.

Lewis Jr WML, Wurtsbaugh WA, Paerl HW (2011) Rationale for Control of Anthropogenic Nitrogen and Phosphorus to Reduce Eutrophication of Inland Waters. *Environ. Sci. Technol.* 45 (24):10300–10305.

Lobón-Cerviá J, Bennemann S (2000) Temporal trophic shifts and feeding diversity in two sympatric, neotropical, omnivorous fishes: *Astyanax bimaculatus* and *Pimelodus maculatus* in rio Tibagi (Paraná, Southern Brazil). *Arch. Hydrobiol.* 149(2):285-306.

Mišík M, Ma TH, Nersesyan A, Monarca S, Kim JK, Knasmueller S (2011) Micronucleus assays with *Tradescantia* pollen tetrads: an update. *Mutagenesis* 26 (1): 215-221 doi:10.1093/mutage/geq080

Omar WA, Zaghloul KH, Abdel-Khalek AA, Abo-Hegab S (2012) Genotoxic effects of metal pollution in two fish species, *Oreochromis niloticus* and *Mugil cephalus*, from highly degraded aquatic habitats. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 746:7-14.

OMS Organização Mundial de Saúde (2004) Guidelines for Drinking Water Quality-1, Recommendations, 4th Ed., World Health Organization, Geneva IOP Publishing PhysicsWeb. Acessado 24Nov 2013.

Outridge PM, Noller BN (1991) Accumulation of toxic trace elements by freshwater vascular plants. *Rev Environ Contam Toxicol* 121: 1-63.

Palhares D, Grisolia CK (2002) Comparison between the micronucleus frequencies of kidney and gill erythrocytes in tilapia fish, following mitomycin C treatment. *Genet Mol Biol* 25:281–284.

Pantaleão SM, Alcântara AV, Alves JPH, Spanó M.A (2006) The piscine micronucleus test to assess the impact of pollution on the Japaratuba River in Brazil. *Environ. Mol. Mut.* 47:219-224. . doi: 10.1002/em.20188

Paul S, Bhattacharjee P, Mishra, PK, Chatterjee, D, Biswas, A, Deb D, Ghosh A, Mazumder, DNG, Giri, AK (2013) Human urothelial micronucleus assay to assess genotoxic recovery by reduction of arsenic in drinking water: a cohort study in West Bengal, India. *BioMetals* 26(5):855-862.

Pereira, BB, de Campo Junior EO, Morelli S (2013) In situ biomonitoring of the genotoxic effects of vehicular pollution in Uberlândia, Brazil, using a *Tradescantia* micronucleus assay. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 87:17–22.

Pimenta VMDS, Nepomuceno JC, Pavanin LA (2008) Genotoxicity of Water From the Paraguay River Near Cáceres-MT, Brazil in the *Drosophila* Wing-Spot Test. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 49:458-466.

Rodriguez-Cea A, Ayllon F, Garcia-Vazquez E (2003) Micronucleus test in freshwater fish species: an evaluation of its sensitivity for application in field surveys. *Ecotoxicol Environ Saf* 56:442–448.

Sabale SR, Tamhankar BV, Dongare MM, Mohite BS (2012) Extraction, Determination and Bioremediation of Heavy Metal Ions and Pesticide Residues from Lake Water. *Bioremed Biodegrad* 3:4.

Sampaio ACS (2003) Metais Pesados na Água e Sedimentos dos Rios da Bacia do Alto Paraguai. Dissertação, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Schmid W (1975) Micronucleus Test for Cytogenetic Analysis in: Hollanender A. Chemical Mutagens. Principles and Methods For Their Detection. Plenum Press 4(36): 31-53.

Sikder MT, Kihara Y, Yasuda M, Yustiawati MY, Tanaka S, Odgerel D, Mijiddorj B, Syawal SM, Hosokawa T, Saito T, Kurasaki M (2013) River Water Pollution in Developed and Developing Countries: Judge and Assessment of Physicochemical Characteristics and Selected Dissolved Metal Concentration. Clean journal 41(1):60–68.

Souza IC, Duarte ID, Pimentel NQ, Rocha LD, Morozesk M, Bonomo MM, Azevedo VC, Pereira CDS, Monferrán MV, Milanez CRD, Matsumoto ST, Wunderlin DA, Fernandes MN (2013) Matching metal pollution with bioavailability, bioaccumulation and biomarkers response in fish (*Centropomus parallelus*) resident in neotropical estuaries. Environmental Pollution 180:136-144.

Suzuki FM., Orsi ML (2008) Schooling behavior of *Astyanax altiparanae* (Teleostei: Characidae) in the Congonhas River, Paraná, Brazil. Rev. Bras. Zool. 25(3):566-569.

Thompson CM, Fedorov Y, Brown DD, Suh M, Proctor DM, Kuriakose L, Haws LC, Harris MA (2012) Assessment of Cr(VI)-Induced Cytotoxicity and Genotoxicity Using High Content Analysis. Plos one 7(8):1-11 DOI: 10.1371/journal.pone.0042720

UNFPA United Nations Population Fund UNFPA (2000) IOP Publishing PhysicsWeb. <http://unfpa.org/public/home/publications/pid/2582> Acesso em: 24 nov. 2013.

Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NP (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13:57-149.

Weber P, Behr ER, Knorr CL, Vendruscolo DS, Flores, EMM, Dressler VL, Baldisserotto B (2013) Metals in the water, sediment, and tissues of two fish species from different trophic levels in a subtropical Brazilian river. *Microchemical Journal* 16:61-66.

Americal Public Health Association (APHA): Standard Methods for the Examination of Water and Waste water, 19th ed. American Water works Association and Water Pollution Control Federation Publication, Washington, D.C. 1998.

Zhang C, Appel E, Qiao Q (2013) Heavy metal pollution in farmland irrigated with river water near a steel plant—magnetic and geochemical signature. *J. Int. Geomagnetism, rock magnetism and palaeomagnetism*.192:963–974. doi: 10.1093/gji/ggs079

## **Anexos**

### **Anexo 1: Métodos**

#### **Preparação dos cromossomos mitóticos.**

Foi usada a técnica descrita por Bertollo et al. (1978), para estudos de cromossomos de peixes, com modificações.

1. Injetar, intraperitonealmente, colchicina a 0,025% na proporção de 1 ml/100g de peso do animal;
2. Deixar o animal em aquário aerado por aproximadamente uma hora, sacrificando-o em seguida. Retirar os tecidos desejados;
3. Lavar o material retirado em uma solução hipotônica de cloreto de potássio (KCl) a 0,075M;
4. Transferir o material para uma pequena cuba de vidro contendo 8 a 10 mL de solução hipotônica;
5. Fragmentar o material, com pinças de dissecação, completando este processo com auxílio de uma seringa hipodérmica desprovida de agulha;
6. Colocar a suspensão obtida em estufa a 36° C por 20 minutos;
7. Suspende cuidadosamente o material sedimentado com auxílio de pipeta Pasteur, transferindo-o para um tubo de centrifuga. Nesta transferência, os pedaços de tecido não desfeitos devem ser descartados. Acrescentar 5 a 6 gotas de fixador (álcool metílico e ácido acético 3:1) recém preparado e suspender novamente o material sedimentado;
8. Centrifugar durante 10 minutos, entre 500 e 900 rpm, descartando o sobrenadante com auxílio de pipeta Pasteur;
9. Adicionar 5 a 6 mL de fixador;
10. Suspende o sedimento com auxílio de pipeta Pasteur;
11. Repetir os itens 8 a 10 por duas vezes. Após a última centrifugação e eliminação do sobrenadante, adicionar 1 a 2 mL de fixador, dependendo da quantidade de material e suspender bem o sedimento;
12. Pingar 3 a 4 gotas de suspensão celular, com uma pipeta Pasteur, sobre diferentes regiões de uma lâmina limpa mantida em água destilada na geladeira, ou sobre uma lâmina seca, aquecida suavemente (25° a 30° C) em chapa aquecedora, ou ainda sobre uma lâmina mantida em água

destilada entre 65° e 70°C;

13. Escorrer o excesso de material, inclinando um pouco a lâmina sobre papel de filtro;

14. Secar diretamente ao ar.

#### **Deteccão das NORs pela impregnação com nitrato de Prata (Ag-NORs).**

Foi usada a técnica descrita por Howell e Black (1980).

1. Colocar uma gota de solução de gelatina a 2% acrescida de ácido fórmico, na proporção de uma parte para 100 de solução e 2 gotas de solução aquosa de nitrato de Prata a 50%, sobre lâmina preparada para cromossomos mitóticos;
2. Misturar as duas soluções e cobrir com lamínula;
3. Transferir para estufa a 70° C. Decorridos alguns minutos (5 a 6), a lâmina adquire uma coloração amarelada, passando para marrom dourada;
4. Remover a lamínula com água e lavar bem a lâmina em água deionizada;
5. Secar e examinar ao microscópio.

#### **Deteccão de heterocromatina constitutiva (Bandas C).**

Foi usada a técnica descrita por Sumner (1972), com pequenas modificações.

1. Tratar o material preparado segundo a técnica descrita para cromossomos mitóticos, com HCl 0,2N em temperatura ambiente, por 10 a 15 minutos;
2. Lavar em água deionizada, à temperatura ambiente e secar ao ar;
3. Incubar, de 4 a 8 minutos, em solução filtrada recém-preparada de  $\text{Ba(OH)}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ , a 5%, a 60° C;
4. Lavar rapidamente em HCl 0,2N e em água deionizada e secar ao ar;
5. Incubar em solução de 2xSSC, a 60° C, por um período de 30 a 60 minutos;
6. Lavar em água deionizada e secar ao ar;
7. Corar com Giemsa, diluído a 2% em tampão fosfato, pH 6, 8, por 15 a 20 minutos;
8. Lavar em água deionizada e secar ao ar.

**Anexo 2: Tabela:** Dados citogenéticos do gênero *Rhamdia*

| Espécie reportada        | Local           | 2n    | Cromossomo B | Forma-Tamanho do B                              | NOR                          | Heterocromatina constitutiva | Heterocromatina Cromossomos Bs | Referência |
|--------------------------|-----------------|-------|--------------|-------------------------------------------------|------------------------------|------------------------------|--------------------------------|------------|
| <i>Rhamdia laticauda</i> | América Central | 58    | 0            | -                                               | -                            | -                            | -                              | 1          |
| <i>Rhamdia branneri</i>  | Brasil (PR)     | 58    | 0-4          | Meta/Submetacêntrico-Médio (espécie específica) | Múltipla/ braço longo        | Telomérica/intersticial      | Parcial-meta/ subterminal      | 2          |
| <i>Rhamdia hilarii</i>   | -               | 58    | 0-5          | -                                               | -                            | -                            | -                              | 3          |
| <i>Rhamdia hilarii</i>   | Brasil (SP)     | 62    | -            | -                                               | -                            | -                            | -                              | 4          |
| <i>Rhamdia hilarii</i>   | Brasil (SP)     | 58    | 0-2          | Metacêntrico - Médio                            | Simples/Braço curto          | Telomérica                   | Parcial/ Telomérica            | 5          |
| <i>Rhamdia hilarii</i>   | Brasil (SP)     | 58-63 | 0-5          | Metacêntrico-Tamanho variável                   | Simples/Braço curto/Terminal | -                            | Parcial/ Telomérica            | 6          |
| <i>Rhamdia hilarii</i>   | Argentina       | 58    | 0            | Metacêntrico - Médio                            | Simples/Braço curto/Terminal | Telomérica                   | Parcial/ Telomérica            | 7          |
| <i>Rhamdia hilarii</i>   | Brasil (MG)     | 58    | 0-2          | Metacêntrico - Médio                            | Simples/Braço curto/Terminal | Telomérica                   | Parcial/ Telomérica            | 7          |
| <i>Rhamdia hilarii</i>   | Brasil (SP)     | 58    | 0-5          | Metacêntrico - Médio                            | Simples/Braço curto/Terminal | Telomérica                   | Parcial/ Telomérica            | 7          |
| <i>Rhamdia hilarii</i>   | Brasil (SP)     | 58    | 0-3          |                                                 | Simples/Braço curto/Terminal | -                            | -                              | 8          |

|                       |                    |    |             |                      |                                   |                                           |                     |        |
|-----------------------|--------------------|----|-------------|----------------------|-----------------------------------|-------------------------------------------|---------------------|--------|
| <i>Rhamdia quelen</i> | Brasil (RS)        | 58 | 0-1<br>0-2* | Pequeno<br>Médio*    | Simples                           | -                                         | -                   | 9<br>* |
| <i>Rhamdia quelen</i> | Argentina          | 58 | 0           | -                    | Simples/Braço<br>curto/Terminal   | -                                         | Parcial/ Telomérica | 7      |
| <i>Rhamdia quelen</i> | Brasil (SP)        | 58 | 0-4         | Metacêntrico – Médio | Simples/Braço<br>curto/Terminal   | Telomérica                                | Parcial/ Telomérica | 7      |
| <i>Rhamdia quelen</i> | Brasil (SC)        | 58 | 0-1         | Metacêntrico – Médio | Simples/Braço<br>curto/Terminal   | Telomérica                                | Parcial/ Telomérica | 7      |
| <i>Rhamdia quelen</i> | Brasil (SP)        | 58 | 0-4         | Médio/grande         | Simples/Braço<br>curto/Terminal   | -                                         | Parcial/ Telomérica | 10     |
| <i>Rhamdia quelen</i> | Brasil (PR)        | 58 | 0           | -                    | Simples/ Braço<br>curto /terminal | Telomérica/<br>Centromérica               | Parcial/ Telomérica | 10     |
| <i>Rhamdia quelen</i> | Brasil (MS)        | 58 | 0-3         | Subm-meta/pequeno    | Simples/ Braço<br>curto /terminal | Telomérica/Centromérica                   | Eucromático         | 11     |
| <i>Rhamdia quelen</i> | Brasil (SP,<br>PR) | 58 | 0-2         | Meta/pequeno         | -                                 | -                                         | Heterocromático     | 12     |
| <i>Rhamdia quelen</i> | Brasil (SC)        | 58 | 0-2         | Meta/pequeno         | -                                 | -                                         | Parcial/ Telomérica | 12     |
| <i>Rhamdia quelen</i> | Brasil (SP)        | 58 | -           | -                    | Simples/ Braço<br>curto /terminal | Poucas na região<br>terminal/ pericentral | -                   | 13     |
| <i>Rhamdia quelen</i> | Brasil (GO)        | 58 | 0-3         | Microcromossomo      | Simples/ Braço<br>curto /terminal | Poucas na região<br>terminal/ pericentral | -                   | 13     |

|                       |             |       |     |                                            |                                   |                                        |                                      |    |
|-----------------------|-------------|-------|-----|--------------------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------------|--------------------------------------|----|
| <i>Rhamdia quelen</i> | Brasil (MT) | 58    | 0-5 | Microcromossomo                            | Simples/ Braço curto /terminal    | Poucas na região terminal/ pericentral | -                                    | 13 |
| <i>Rhamdia quelen</i> | Brasil (PR) | 58    | 0-1 | Médio-metacêntrico                         | Simples/ Braço curto /terminal    | Telomérica/Centromérica                | Parcial/ Telomérica                  | 14 |
| <i>Rhamdia quelen</i> | Brasil (RJ) | 58    | 0-1 | Médio-metacêntrico                         | Simples/ Braço curto /terminal    | Poucas na região terminal/ central     | Parcial/terminal                     | 14 |
| <i>Rhamdia quelen</i> | Brasil (SP) | 58    | 0-5 | Pequeno/médio                              | Simples/ Braço curto /terminal    | Poucas na região terminal/ central     | Parcial/eucromático/ heterocromático | 14 |
| <i>Rhamdia quelen</i> | Brasil (MG) | 58    | 0-1 | Pequeno                                    | Simples/Braço longo/ Intersticial | Poucas na região terminal/ pericentral | Parcial/ Telomérica                  | 15 |
| <i>Rhamdia quelen</i> | Brasil (MG) | 58    | 0-2 | Pequeno                                    | Simples/ Braço curto /terminal    | Poucas na região terminal/ pericentral | Parcial/terminal                     | 15 |
| <i>Rhamdia quelen</i> | Brasil (MG) | 58    | 0-2 | Pequeno                                    | Simples/ Braço curto /terminal    | Poucas na região terminal/ pericentral | Parcial/terminal                     | 15 |
| <i>Rhamdia quelen</i> | Brasil (MG) | 58    | 0-4 | Pequeno                                    | Simples/ Braço curto /terminal    | Poucas na região terminal/ pericentral | Parcial/terminal                     | 15 |
| <i>Rhamdia quelen</i> | Brasil (MG) | 58    | 0-7 | Metacêntrico/submetacêntrico/a crocêntrico | Simples/ Braço curto /terminal    | Poucas na região terminal/ pericentral | Heterocromático                      | 16 |
| <i>Rhamdia quelen</i> | Brasil (MG) | 58    | 0-7 | -                                          | -                                 | -                                      | -                                    | 17 |
| <i>Rhamdia quelen</i> | Brasil (MG) | 59-61 | 1-3 | Tamanho variável                           | Múltipla/Braço longo/Terminal     | Telomérica/Centromérica                | Parcial/terminal Eucromático         | 15 |
| <i>Rhamdia quelen</i> | Brasil (PR) | 58    | 0-2 | Microcromossomo                            | Simples/Braço longo/Terminal      | Centromérica                           | Heterocromático                      | 19 |

|                        |             |    |     |                            |                                        |                         |                 |    |
|------------------------|-------------|----|-----|----------------------------|----------------------------------------|-------------------------|-----------------|----|
| <i>Rhamdia sapo</i>    | Argentina   | 58 | 0-1 | Acro/metacêntrico- pequeno | -                                      | -                       | Heterocromático | 18 |
| <i>Rhamdia voulezi</i> | Brasil (PR) | 58 | 0-2 | Metacêntrico               | Simples/ Braço curto /terminal         | Telomérica/Centromérica | Eucromática     | 2  |
| <i>Rhamdia</i> sp.     | -           | 58 | -   | -                          | -                                      | -                       | -               | 1  |
| <i>Rhamdia</i> sp.     | Brasil (PR) | 58 | 0-2 | Acrocêntrico               | Múltipla/ Braço longo- subtelocêntrico | Telomérica/Centromérica | Eucromática     | 2  |

1) LeGrande (1981); 2) Abucarma & Martins-Santos (2001); 3) Toledo (1975) *apud* Maistro *et al.* (2002); 4) Almeida-Toledo & Ferrari (1976) *apud* Stivari & Martins-Santos (2004); 5) Maistro *et al.* (2002); 6) Fenocchio & Bertollo (1990); 7) Fenocchio *et al.* (2000); 8) Vissotto *et al.* (1999); 9) Hochberg & Erdtmann (1988) *apud* Swarça *et al.* (2000); 10) Stivari & Martins-Santos (2004); 11) Moraes *et al.* (2007); 12) Moraes *et al.* (2009); 13) Martinez. *et al.* (2011); 14) Garcia *et al.* (2010); 15) Presente trabalho; 16) Guilherme (2005); 17) De Campos Junior (2011); 18) Valcarel *et al.* (1993); 19) Borba *et al.* (2012).

\* Hochberg & Erdtmann (1988) *apud* Stivari & Martins-Santos (2004)