



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

TATIA RAMOS SAMPAIO

**“ESTUDO DO COMPORTAMENTO MITÓTICO E  
MEIÓTICO DE DIFERENTES ESPÉCIES DE PEIXES DA  
FAMÍLIA CURIMATIDAE (CHARACIFORMES)”**



**Universidade Estadual de Londrina**



**Instituto Agronômico do Paraná**



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**

---

TATIANE RAMOS SAMPAIO

**“ESTUDO DO COMPORTAMENTO MITÓTICO E  
MEIÓTICO DE DIFERENTES ESPÉCIES DE PEIXES DA  
FAMÍLIA CURIMATIDAE (CHARACIFORMES)”**

TATIANE RAMOS SAMPAIO

**“ESTUDO DO COMPORTAMENTO MITÓTICO E  
MEIÓTICO DE DIFERENTES ESPÉCIES DE PEIXES DA  
FAMÍLIA CURIMATIDAE (CHARACIFORMES)”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Genética e Biologia Molecular, da  
Universidade Estadual de Londrina, como requisito  
para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Ana Lúcia Dias.

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Renata da Rosa.

Londrina  
2013

### **Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

S192e Sampaio, Tatiane Ramos.

Estudo do comportamento mitótico e meiótico de diferentes espécies de peixes da família curimatidae (characiformes)/ Tatianes Ramos Sampaio. – Londrina, 2013.  
66f. : il.

Orientador: Ana Lúcia Dias.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2013.

Inclui bibliografia.

1. Peixe Citologia– Teses. 2. Cromossomos– Teses. 3. Heterocromastina– Teses. 4. Meiose– Teses. I. Dias, Ana Lúcia. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Título.

CDU 597.554.1

TATIANE RAMOS SAMPAIO

**“ESTUDO DO COMPORTAMENTO MITÓTICO E MEIÓTICO DE  
DIFERENTES ESPÉCIES DE PEIXES DA FAMÍLIA CURIMATIDAE  
(CHARACIFORMES)”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Ana Lúcia Dias  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof<sup>o</sup> Dr. Alberto Sérgio Fenocchio  
Universidad Nacional de Misiones - UNAM

---

Prof<sup>o</sup> Dr. Carlos Roberto Maximiano  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 26 de fevereiro de 2013.

*Agradeço à Deus, aos meus pais, Edson e  
Meiri, à minha avó, Maria Ivone, e ao  
Fernando por todo amor e pelo apoio na  
realização deste curso!*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por permitir a realização e concretização deste curso, dando-me paz e forças para enfrentar os desafios que me foram proporcionados.

À Prof<sup>a</sup> Dra. Ana Lúcia Dias por toda orientação, paciência, total dedicação e muito incentivo nestes dois anos de mestrado, além de toda orientação que recebi na realização do TCC na graduação. Sou muito grata por tudo.

À Prof<sup>a</sup> Dra. Renata da Rosa pela amizade, co-orientação, realização e toda correção deste trabalho. À Prof<sup>a</sup> Dra. Lucia Giuliano-Caetano pelo apoio, amizade, por todo material de estudo deste trabalho e pelas contribuições na banca da qualificação.

À Prof<sup>a</sup> Dra. Ana Cláudia Swarça pela amizade e por aceitar participar desta banca como suplente. À Prof<sup>a</sup> Dra. Mara Cristina de Almeida por sanar muitas dúvidas e por aceitar participar desta banca como suplente.

Aos membros da banca examinadora, Prof<sup>o</sup> Dr. Alberto Fenocchio e Prof<sup>o</sup> Dr. Carlos Maximiano, por aceitarem participar desta banca, e contribuir imensamente com as sugestões deste trabalho.

À Universidade Estadual de Londrina e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular por toda estrutura oferecida para realização deste trabalho. À CAPES pelo apoio financeiro. À secretária Sueli e aos técnicos, Dário e Melissa por serem tão prestativos e por todo auxílio que foi concedido.

Aos amigos do laboratório de Citogenética Animal: Laura, Juceli, Mariana Campaner, Vivian, Marceléia, Téia, Larissa Lacerda, Matheus, Angélica Tiêpo, Ana Beatriz e Jéssica. Em especial aos meus amigos Angélica Rossotti, Larissa Pires, Natália e Fábio pela grande amizade que criamos, por toda ajuda e companhia nos momentos de alegria e de dificuldades!

Ao meu namorado Fernando, que mesmo distante, participou grandemente na realização deste trabalho, com muito amor, paciência, sendo companheiro, respeitando e confiando em mim. Agradeço também por todos os conselhos e por todo apoio que recebi durante estes dois anos!

E por fim, aos meus pais, Edson e Meiri, à minha avó, Maria Ivone, ao meu irmão Luis Augusto, a minha sobrinha Luisa e aos meus familiares, por todo amor, apoio, paciência e confiança em mim depositados nestes anos de estudo!

SAMPAIO, T.R. **Estudo do comportamento mitótico e meiótico de diferentes espécies de peixes da família Curimatidae (Characiformes)**. 2013. 66f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular), Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

## RESUMO

A família Curimatidae é um grupo de peixes de água doce composto por 8 gêneros e 101 espécies, distribuídas na América do Sul e sul da América Central, encontrados em diversos ecossistemas aquáticos como rios, córregos e lagos. Estudos que focam a evolução dos cromossomos nos curimatídeos, baseados em dados de bandamentos cromossômicos são escassos. Da mesma forma, poucas informações se tem sobre o comportamento do nucléolo e da atividade transcricional durante a divisão meiótica, tanto nos curimatídeos, como em outros grupos de vertebrados. Espécies de peixes dos gêneros *Cyphocharax* e *Steindachnerina*, de diferentes pontos da bacia do rio Paranapanema, do sistema hidrográfico Laguna dos Patos e da bacia do rio Tramandaí foram analisados. Todas as espécies (*Cyphocharax modestus*, *C. saladensis*, *C. spilottus*, *C. voga*, *Steindachnerina biornata* e *S. insculpta*) apresentaram  $2n=54$  m-sm e  $NF=108$ , e todas as populações apresentaram indivíduos com microcromossomos B. Um padrão de AgRONS simples foi observado nas seis espécies, em região terminal, diferindo quanto ao par e à localização no braço cromossômico de cada uma. As AgRONS foram confirmadas pela FISH com sonda de DNAr 18S, e mostraram-se  $CMA_3^+/DAPI^-$ , com exceção de *Steindachnerina biornata*, que apresentou um pequeno par de cromossomos a mais, com sítios de DNAr 18S indicando, possivelmente, um padrão múltiplo para esta espécie. A heterocromatina distribuiu-se em regiões pericentroméricas e em algumas regiões terminais, mostrando-se  $CMA_3^+/DAPI^-$ . Em *Steindachnerina biornata* foi observado o par da RON com heterocromatina  $CMA_3^+$  nas duas regiões terminais, sendo um bloco no braço longo associado à RON e uma marcação mais discreta no braço curto, que pode ser considerado um marcador espécie-específico. Apesar do número diploide conservado, foi possível caracterizar e diferenciar as espécies de curimatídeos, que apresentaram divergências na localização das RONs, mostrando que a evolução cromossômica nos curimatídeos vem sendo acompanhada de rearranjos na microestrutura cariotípica. Em relação ao comportamento das RONs durante a meiose dos curimatídeos, o nitrato de prata evidenciou um nucléolo nos núcleos em interfase, um par de cromossomos nas metáfases espermatogoniais e um bivalente nos paquítenos; nas células em diplóteno, diacinese, metáfase I e II, as AgRONS não foram evidenciadas. A FISH confirmou a AgRON nos núcleos, nas espermatogonias e nos paquítenos e evidenciou esta região nos demais estágios meióticos, da mesma forma que o fluorocromo  $CMA_3$ , que revelou marcas fluorescentes em todos os estágios meióticos analisados. A ausência de impregnação da prata após o estágio de paquíteno, provavelmente, é devido a uma inativação da atividade dos genes ribossômicos e que, no final da divisão meiótica, são ativados novamente. Estes resultados mostram que todo o aparato proteico relacionado à atividade transcricional passa por alterações, levando a sua inatividade, mas que não alteram as sequências gênicas, permitindo assim uma correta divisão celular.

**Palavras-chaves:** AgRON. FISH. Heterocromatina. Meiose. Transcrição.

SAMPAIO, T.R. **Study mitotic and meiotic behavior of different species of fish of the family Curimatidae (Characiformes)**. 2013. 66p. Dissertation (Master's degree in Genetics and Molecular Biology), Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

### ABSTRACT

The family Curimatidae is a group of the freshwater fish comprising eight genera and 101 species, distributed in South and southern Central America, found in many aquatic ecosystems such as rivers, streams and lakes. Studies that focus on the evolution of chromosomes in curimatids, based on banding data are scarce. Likewise, you have little information about the behavior of the nucleolus and transcriptional activity during meiotic division, both in curimatids, as in other vertebrate groups. Fish species of the genus *Cyphocharax* and *Steindachnerina*, of different sites of Paranapanema river basin, Laguna dos Patos hydrographic system and Tramandai river were analyzed. All species (*Cyphocharax modestus*, *C. saladensis*, *C. spilotos*, *C. voga*, *Steindachnerina biornata* and *S. insculpta*) showed  $2n=54$  m-sm and  $NF=108$ , and all populations showed specimens with B microchromosome. Pattern of simple AgNORs were observed in the six species, in the terminal region, differing as to the pair and the chromosome arm. All AgNORs were confirmed by FISH with 18S rDNA probe, and were  $CMA_3^+/DAPI^-$ , except for *Steindachnerina biornata*, which showed a small pair of chromosomes to more, with 18S rDNA sites, possibly indicating a multiple pattern for this species. The heterochromatin was distributed at pericentromeric regions and parts terminals, and was  $CMA_3^+/DAPI^-$ . In *Steindachnerina biornata* was observed the NOR pair with heterochromatin  $CMA_3^+$  in the two terminals regions, being a block on the long arm associated with RON and a more discreet marking on the short arm, which may be considered a species-specific marker. Although the diploid number conserved, was possible to characterize and differentiate curimatids species that showed differences in the NORs location, showing that chromosomal evolution in curimatids has been accompanied by rearrangements in the microstructure karyotypic. Regarding the behavior of NORs during meiosis of curimatids, silver nitrate showed a nucleolus in interphase nuclei, a pair of chromosomes in spermatogonial metaphases and a bivalent in pachytene; cells in diplotene, diakinesis, metaphase I and II, were not evidenced AgNORs. The FISH confirmed the AgNOR in the nuclei, spermatogonial and pachytene and showed this region in other meiotic stages, in the same way as the fluorochrome  $CMA_3$  revealed fluorescent marks that in all analyzed meiotic stages. The absence of silver impregnation after the pachytene stage is probably due to inactivation of the activity of ribosomal genes and that at the end of meiotic division, are activated again. These results show that the whole apparatus protein related transcriptional activity undergoes changes, leading to his inactivity, but that do not change gene sequences, allowing a correct cell division.

**Keywords:** AgNOR. FISH. Heterochromatin. Meiosis. Transcription.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Exemplos de: a) *Cyphocharax modestus*; b) *Cyphocharax saladensis*; c) *Cyphocharax spilodus*; d) *Cyphocharax voga*; e) *Steindachnerina biornata*; f) *Steindachnerina insculpta*..... 25
- Figura 2** - Mapa do Brasil: (a) Locais de coleta da bacia do rio Paranapanema: rio Água dos Patos (SP), riacho do Pavão, rio Jacutinga e ribeirão Três Bocas (PR); (b) Locais de coleta do sistema hidrográfico Laguna dos Patos: rio Forquetinha, Gasômetro, Saco da Alemoa, Açude da Estação Experimental Agrônômica da UFRGS, Arroio Capivara e Lagoa dos Barros (RS); Locais de coleta do rio Tramandaí: Lagoa dos Quadros (RS)..... 26
- CAPÍTULO I - Tendências evolutivas na família Curimatidae (Characiformes): inferências a partir de bandamentos cromossômicos**
- Figura 1** - Cariótipos com microcromossomo B de: a) *Cyphocharax modestus*; b) *Cyphocharax saladensis*; c) *Cyphocharax spilodus*. Nos boxes laterais, o par portador da RON com impregnação com nitrato de prata, coloração com CMA3 e FISH com sonda de DNAr 18S de cada espécie. Em (c), o par da RON com a constrição secundária está destacado no Box..... 43
- Figura 2** - Cariótipos com microcromossomo B de: a) *Cyphocharax voga*; b) *Steindachnerina biornata*; c) *Steindachnerina insculpta*. Nos boxes laterais, o par portador da RON com impregnação com nitrato de prata, coloração com CMA3 e FISH com sonda de DNAr 18S de cada espécie. Em (a) e (b), o par da RON com a constrição secundária está destacado no Box ..... 44
- Figura 3** - Metáfases somáticas de *Cyphocharax voga*, coletados na Lagoa dos Barros (RS): (a) Giemsa; (b) AgRON (sequencial); (c) CMA3; (d) FISH com sonda de DNAr 18S. As setas indicam o cromossomo portador da constrição secundária e da RON ..... 45
- Figura 4** - Metáfases somáticas com bandamento C de: a) *Cyphocharax modestus*; b) *Cyphocharax saladensis*; c) *Cyphocharax spilodus*; d) *Cyphocharax voga*; e) *Steindachnerina biornata*; f) *Steindachnerina insculpta*. As setas e os boxes em (a), (b) e (f) destacam o microcromossomo B

heterocromático. As setas e o box em (e) indicam o par heterocromático de *S. biornata*..... 46

**Figura 5 -** Metáfases somáticas de bandamento C coradas com fluorocromo CMA3 de: a) *Cyphocharax modestus*; b) *Cyphocharax saladensis*; c) *Cyphocharax spilotus*; d) *Cyphocharax voga*; e) *Steindachnerina biornata*; f) *Steindachnerina insculpta*. Os (\*) indicam os pares das RONS. A seta e o box em (b) destaca o microcromossomo B de *C. saladensis* heterocromático CMA3+. As cabeças de setas em (e) indicam o par heterocromático de *S. biornata*..... 46

## **CAPÍTULO II - Padrão de atividade das regiões organizadoras de nucléolos (RONS) na divisão meiótica de diferentes espécies de curimatídeos (Characiformes)**

**Figura 1 -** Células meióticas após impregnação com nitrato de prata de: (a) *Cyphocharax modestus*; (b) *C. saladensis*; (c) *C. spilotus*. As setas indicam as RONS nos estágios em metáfases espermatogoniais e paquítenos. Em (a) e (c), os estágios de paquítenos são representados por duas células, assim como em (c) para a interfase. Note a ausência de impregnação com a prata nos estágios de diplóteno, diacinese, metáfase I e II ..... 55

**Figura 2 -** Células meióticas após impregnação com nitrato de prata de: (a) *Cyphocharax voga*; (b) *Steindachnerina insculpta*. As setas indicam as RONS nos estágios de paquíteno. Em (a), o estágio de paquíteno é representado por três células. Note a ausência de impregnação com a prata nos estágios de diplóteno, diacinese, metáfase I e II..... 56

**Figura 3 -** Células meióticas submetidas ao FISH com sonda de DNAr 18S: (a) *Cyphocharax modestus*; (b) *C. saladensis*; (c) *C. spilotus*; (d) *C. voga*; (e) *Steindachnerina insculpta*. As setas indicam as RONS. Note o sinal de hibridação em todos os estágios meióticos. Em (d), o estágio de paquíteno é representado por duas células, assim como em (e) para metáfase II ..... 57

**Figura 4 -** Células meióticas coradas com fluorocromo CMA3 de: (a) *Cyphocharax spilotus*; (b) *C. voga*. As setas indicam as RONS. Em (a) e (b), os estágios de paquítenos são representados por duas células..... 58

**Figura 5 -** Células meióticas coradas com fluorocromo CMA3 de: (a) *Cyphocharax modestus*; (b) *C. saladensis*; (c) *Steindachnerina insculpta*. As setas indicam as RONS. Em (c), o estágio de paquíteno é representado por duas células..... 58

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** - Espécies, locais de coleta e bacias hidrográficas dos exemplares estudados ..... 24

### **CAPÍTULO I - Tendências evolutivas na família Curimatidae (Characiformes):**

#### **inferências a partir de bandamentos cromossômicos**

**Tabela 1** - Espécies, locais de coleta e bacias hidrográficas dos exemplares estudados ..... 38

**Tabela 2** - Pares cromossômicos das regiões organizadoras de nucléolos (AgRONS) e suas respectivas posições ..... 38

**Tabela 3** - Revisão citogenética de espécies da família Curimatidae ..... 40

### **CAPÍTULO II - Padrão de atividade das regiões organizadoras de nucléolos**

#### **(RONS) na divisão meiótica de diferentes espécies de curimatídeos (Characiformes)**

**Tabela 1** - Espécies, locais de coleta e bacias hidrográficas dos exemplares estudados ..... 55

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
1.1	ASPECTOS GERAIS DA FAMÍLIA CURIMATIDAE.....	14
1.2	ASPECTOS CITOGENÉTICOS DA FAMÍLIA CURIMATIDAE.....	15
1.3	OCORRÊNCIA DE CROMOSSOMOS B EM PEIXES NEOTROPICAIS, COM ÊNFASE NA FAMÍLIA CURIMATIDAE.....	17
1.4	ANÁLISES MEIÓTICAS EM PEIXES NEOTROPICAIS.....	20
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	22
2.1	OBJETIVO GERAL.....	22
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
<b>3</b>	<b>LOCAIS DE COLETA E ESPÉCIES ESTUDADAS</b> .....	23
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	27
<b>CAPÍTULO I - Tendências evolutivas na família Curimatidae (Characiformes):</b>		
	<b>inferências a partir de bandamentos cromossômicos</b> .....	27
	<b>RESUMO</b> .....	27
	<b>Introdução</b> .....	28
	<b>Material e Métodos</b> .....	29
	<b>Resultados</b> .....	29
	<b>Discussão</b> .....	31
	<b>Referências Bibliográficas</b> .....	35
<b>CAPÍTULO II –Padrão de atividade das regiões organizadoras de nucléolo</b>		
	<b>(RONs) na divisão meiótica de diferentes espécies de curimatídeos</b>	
	<b>(Characiformes)</b> .....	47
	<b>Resumo</b> .....	47
	<b>Introdução</b> .....	48
	<b>Material e Métodos</b> .....	49
	<b>Resultados</b> .....	49
	<b>Discussão</b> .....	50

<b>Referências Bibliográficas .....</b>	<b>52</b>
<b>5      CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>59</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>61</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 ASPECTOS GERAIS DA FAMÍLIA CURIMATIDAE

A família Curimatidae ocupa uma variedade de ecossistemas de água doce neotropicais, como lagos e rios de curso lento de terras baixas, rios de águas paradas e riachos de forte correnteza de terras altas (VARI, 1983a; VARI, 1989). Estes peixes ocorrem a oeste e ao norte dos Andes (sul da Costa Rica até norte do Peru) e nas drenagens do Caribe no noroeste da América do Sul. Nas vertentes atlânticas da América do Sul, curimatídeos são encontrados desde o rio Orinoco na Venezuela, passando pela bacia Amazônica e rios costeiros das Guianas, Brasil, Uruguai e Argentina, até o sul de Buenos Aires.

Esta família é distinguível de outros Characiformes devido a ausência de dentição na mandíbula, característica encontrada nos peixes adultos (VARI, 2003). Seu intestino é longo e alimentam-se de lodo, principalmente algas e detritos, devido a adaptações anatômicas e fisiológicas para a digestão dos detritos tendo, portanto, grande importância no fluxo de energia e ciclagem de nutrientes dentro dos ecossistemas (BOWEN, 1984 *apud* FELDBERG, 1990).

Este grupo de peixes inclui 101 espécies e 8 gêneros, sendo eles: *Curimata*, *Curimatella*, *Curimatopsis*, *Cyphocharax*, *Potamorhina*, *Psectrogaster*, *Pseudocurimata* e *Steindachnerina* (NETTO-FERREIRA, VARI, 2011). O gênero *Cyphocharax* é o mais especioso dentro da família, e somente o gênero *Pseudocurimata* não foi estudado citogeneticamente, até o momento.

Baseado em um estudo das relações filogenéticas de grupos externos, Vari (1983b) estabeleceu um cladograma sugerindo que as famílias Curimatidae, Prochilodontidae, Anostomidae e Chilodontidae formam um grupo monofilético devido a uma série de caracteres derivados (apomórficos), encontrados nas mandíbulas, nos arcos branquiais, no crânio, na coluna vertebral, entre outros. As famílias Curimatidae e Prochilodontidae são consideradas grupos irmãos, e estes, por sua vez, são o grupo irmão da linhagem formada pelas famílias Anostomidae e Chilodontidae. Dessas famílias, Curimatidae é o táxon mais basal (VARI, 1983b).

## 1.2 ASPECTOS CITOGENÉTICOS DA FAMÍLIA CURIMATIDAE

Os estudos citogenéticos em peixes neotropicais revelam uma grande diversidade cromossômica, com variabilidade cariotípica tanto intra quanto interespecífica. Dentro da ordem Characiformes existem duas tendências bem diferenciadas: grupos que mostram grandes diferenças no número diploide e/ou na fórmula cariotípica e grupos cariotipicamente homogêneos (BERTOLLO et al., 1986; OLIVEIRA et al., 2009). A família Curimatidae pertence ao segundo grupo, apesar de apresentar exceções à regularidade observada, o que permite inferir sobre as vias evolutivas dentro da família (GALETTI Jr. et al., 1994; GALETTI Jr., 1998).

Das 101 espécies distribuídas na região Neotropical, 38 foram estudadas citogeneticamente, sendo que 32 espécies apresentam número diploide ( $2n$ ) de 54 cromossomos e número fundamental (NF) igual a 108 e, destas, 28 possuem cromossomos meta-submetacêntricos (m-sm) (SAMPAIO et al., 2011). Em algumas espécies de curimatídeos foi encontrado um número diploide diferente do comumente observado na família. Feldberg et al. (1992) observaram em *Curimata ocellata* (Eigenmann & Eigenmann, 1889), da bacia Amazônica,  $2n=56$  do tipo m-sm, sugerindo que estes cromossomos podem ter se originado a partir de uma fissão em um par de cromossomos, seguida de inversões pericêntricas. Navarrete e Júlio Jr. (1997) realizaram estudos em peixes do Rio Miranda (Pantanal/MS) e observaram em *Curimatopsis myersi* Vari, 1982  $2n=46$ , do tipo m-sm, e em *Potamorhina squamoralevis* (Braga & Azpelicueta, 1983)  $2n=102$ , possuindo em sua fórmula cariotípica cromossomos acrocêntricos. Segundo os autores, estas espécies provavelmente passaram por extensos processos de rearranjos robertsonianos e não-robertsonianos.

Além das espécies descritas acima, Brassesco et al. (2004) encontraram variações no número diploide em duas espécies de curimatídeos, coletadas no rio Paraná, na Argentina: *Cyphocharax platanus* (Günther, 1880) apresentou um  $2n=58$  distribuídos em  $52m-sm+6st$  e  $NF=116$  e *Potamorhina squamoralevis* apresentou  $2n=102$  com  $14m-sm+88a$  e  $NF=116$ , como já descrito por Navarrete e Júlio Jr. (1997). Um indivíduo de *Cyphocharax modestus* (Fernández-Yépez, 1948) (citado como *Curimata modesta*) apresentou triploidia natural, com  $3n=82$ , sendo esse tipo de alteração numérica de ocorrência rara e, algumas vezes, deletéria para certos grupos de organismos (VENERE, GALETTI, 1985).

Em relação às regiões organizadoras de nucléolo (RONs) na família Curimatidae, geralmente são encontradas em apenas um par de cromossomos, mas em braços e cromossomos diferentes (TERIBELE et al., 2008). Feldberg et al. (1992) realizaram estudos

em diferentes espécies dos gêneros *Curimata*, *Psectrogaster*, *Steindachnerina* e *Curimatella* coletadas na bacia Amazônica Central. Em todas as espécies foi observado um padrão de AgRONS simples, com exceção de *Curimata vittata* (Kner, 1858) que apresentou somente um cromossomo portador da AgRON.

Martins et al. (1996) observaram que, em *Cyphocharax modestus* (citado como *Cyphocharax modesta*), a AgRON estava presente na região telomérica do par 2. Brassesco et al. (2004) observaram esta região em *Steindachnerina brevipinna* (Eigenmann & Eigenmann, 1889) no par metacêntrico 15, e em *Curimatella dorsalis* (Eigenmann & Eigenmann, 1889) e *Cyphocharax platanus* no par 2 e par 5, respectivamente. Em *Cyphocharax voga* (Hensel, 1870) os mesmos autores observaram a AgRON na região telomérica do braço longo de um par de cromossomos (par não definido) e em *Cyphocharax spilotus* (Vari, 1987) na região subteloamérica do par 1.

De Rosa et al. (2007) analisando uma população de *Cyphocharax modestus* (citado como *Cyphocharax modesta*) e uma população de *Steindachnerina insculpta* (Fernández-Yépez, 1948), observaram que a AgRON estava presente no par 2 e no 7, respectivamente, comprovados pela hibridação fluorescente *in situ* (FISH) com sonda de DNAr 18S. Os mesmos resultados foram observados por Teribele et al. (2008).

Diferente dos resultados anteriormente descritos nos curimatídeos, Venere et al. (2008) observaram as AgRONS em mais de um par de cromossomos em *Curimata inornata* Vari, 1989, *Steindachnerina amazonica* (Steindachner, 1911), *S. gracilis* Vari & Vari, 1989 e *Cyphocharax nagelii* (Steindachner, 1881), evidenciando um sistema múltiplo. Os resultados atualmente disponíveis para as AgRONS mostram uma grande variabilidade entre os curimatídeos, indicando que estes sítios podem ser considerados importantes marcadores citogenéticos (DE ROSA et al., 2007; VENERE et al., 2008).

Quanto aos tratamentos com fluorocromos base-específicos, Martins et al. (1996) observaram pelo tratamento com fluorocromo DAPI (diamidino-2-phenylindole), que a RON de *Cyphocharax modestus*, da bacia do rio Tibagi/PR, apresentou banda negativa e mostrou marcas fluorescentes após a utilização do fluorocromo mitramicina, indicando que esta região é rica em GC. Teribele et al. (2008) analisando *Cyphocharax modestus* e *Steindachnerina insculpta*, também da bacia do rio Tibagi, observaram marcas fluorescentes correspondentes à RON, após a utilização do fluorocromo cromomicina A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>) que, assim como a mitramicina, é GC específico.

Em relação ao padrão de distribuição da heterocromatina, Venere (1991) observou em cinco espécies da família Curimatidae, *Cyphocharax* sp., *C. gilberti* (Quoy &

Gaimard, 1824), *C. nagelii*, *C. modestus* e *Steindachnerina insculpta*, algumas características interessantes. *C. nagelii* e *S. insculpta* são as espécies que mostram a maior e menor quantidade de heterocromatina, respectivamente, e o padrão de bandas C pericentroméricas observado nas quatro espécies de *Cyphocharax*, apresentou-se como uma característica comum ao gênero. A espécie *Steindachnerina* cf. *guentheri* (Eigenmann & Eigenmann, 1889) também apresentou bandas pericentroméricas na maioria dos cromossomos (CARVALHO et al., 2001).

Navarrete e Júlio Jr. (1997) observaram em *Curimatella dorsalis* e *Psectrogaster curviventris* Eigenmann & Kennedy, 1903 bandas pericentroméricas, e em *Steindachnerina brevipinna* pequena quantidade de heterocromatina em regiões pericentroméricas e terminais. Brassesco et al. (2004) analisaram 8 espécies de curimatídeos do rio Paraná, na Argentina (*Cyphocharax voga*, *C. spilodus*, *C. platanus*, *Steindachnerina brevipinna*, *S. conspersa* (Holmberg, 1891), *Curimatella dorsalis*, *Psectrogaster curviventris* e *Potamorhina squamoralevis*), e todas apresentaram banda C, principalmente, em região centromérica. As espécies *Steindachnerina insculpta* e *Cyphocharax modestus*, analisadas por De Rosa et al. (2007), mostraram a heterocromatina em regiões pericentroméricas e algumas terminais dos cromossomos.

Todos esses estudos sugerem que a evolução cromossômica nesta família se deve a mudanças na fórmula cariotípica em algumas espécies de curimatídeos, no padrão das RONS e da distribuição da heterocromatina (VENERE, GALETTI, 1989; TERIBELE et al., 2008).

### 1.3 OCORRÊNCIA DE CROMOSSOMOS B EM PEIXES NEOTROPICAIS, COM ÊNFASE NA FAMÍLIA CURIMATIDAE

Em algumas espécies, além dos cromossomos que compõem o cariótipo normal, ditos cromossomos A, aparecem cromossomos extras, geralmente pequenos e heterocromáticos, chamados cromossomos B, supranumerários ou acessórios, com morfologia semelhante ou claramente distinta dos cromossomos do complemento normal. O número de Bs varia entre diferentes células de um mesmo indivíduo nas espécies que os possuem. Isto se deve a um retardo anafásico, com eliminação do B de algumas células ou tecidos, ou à não disjunção mitótica, quando ambas as cromátides migram para um mesmo pólo (GUERRA, 1988).

Segundo Jones e Rees (1982), existem alguns critérios pelos quais os cromossomos supranumerários podem ser diferenciados dos outros cromossomos do complemento, que são os seguintes: (a) não são essenciais à reprodução, desenvolvimento e sobrevivência dos organismos que os possuem; (b) apresentam uma frequência variável intra e interindividual, variando também quanto à morfologia nos diferentes indivíduos que os apresentam; (c) não são homólogos a nenhum cromossomo do complemento A; (d) geralmente são formados de heterocromatina; (e) geralmente são subinertes, ou seja, destituídos de genes, não apresentando assim efeitos fenotípicos detectáveis; (f) não seguem as leis mendelianas, não tendo um padrão definido de divisão mitótica e/ou meiótica.

Em muitos organismos, os cromossomos B são estáveis durante o ciclo celular somático e são herdados, assim como os cromossomos autossômicos. Durante a meiose, os Bs pareiam estritamente entre si e tem a capacidade de formar multivalentes quando mais de dois estão presentes, embora raramente pareiem com a mesma eficiência e regularidade dos autossomos. Os Bs que não ocorrem em pares têm comportamento variável. Geralmente, há pouca perda meiótica de univalentes e Bs dispareados, mas a perda é importante, desde que é um dos meios pelo qual a frequência dos Bs pode ser ajustada na população (JONES, REES, 1982).

Cromossomos B já foram encontrados em 61 espécies de peixes neotropicais de água doce, distribuídos em sete ordens diferentes, como relatado em última revisão realizada por Carvalho et al. (2008). A ordem Characiformes abrange a maioria das espécies com esse tipo de cromossomo, incluindo 31 espécies de seis famílias diferentes: Anostomidae, Characidae, Crenuchidae, Curimatidae, Parodontidae e Prochilodontidae. A ordem Siluriformes possui 21 espécies distribuídas nas famílias Callichthyidae, Heptapteridae, Loricariidae, Pimelodidae e Trichomycteridae, com cromossomos B (CARVALHO et al., 2008), sendo *Rhamdia* (família Heptapteridae) o gênero onde esses cromossomos são mais comumente encontrados (MORAES et al., 2009). Dentro da ordem Perciformes, somente cinco espécies apresentaram cromossomos B, todas pertencentes a família Cichlidae, e as ordens Beloniformes, Cyprinodontiformes, Gymnotiformes e Synbranchiformes possuem apenas uma espécie cada com cromossomos extras (CARVALHO et al., 2008).

Os cromossomos B podem ser encontrados como microcromossomos em *Schizodon*, *Astyanax*, *Moenkhausia*, *Cyphocharax*, *Steindachnerina*, *Prochilodus*, *Rhamdia*, *Iheringichthys*, *Loricaria* (CARVALHO et al., 2008), entre outros, até macrocromossomo supranumerário como observado em *Astyanax scabripinnis* (Jenyns, 1842) (SALVADOR,

MOREIRA-FILHO, 1992; MORILHA NÉO et al., 2000) e, recentemente, em *Bryconamericus ecai* Silva, 2004 (SANTOS et al., 2012), variando em morfologia e número, evidenciando a grande diversidade de cromossomos B em peixes neotropicais (CARVALHO et al., 2008).

Na família Curimatidae, o primeiro trabalho a registrar a ocorrência de um cromossomo B foi feito por Venere e Galetti (1985) em um indivíduo de *Cyphocharax modestus* (citado como *Curimata modesta*), coletado no rio Tietê, município de Águas de São Pedro/SP. Este cromossomo se mostrou totalmente heterocromático. Desde então, outras populações de *C. modestus* tem mostrado a presença do cromossomo B, como Martins et al. (1996) que analisaram indivíduos do ribeirão Três Bocas, bacia do rio Tibagi (Londrina/PR) e Venere et al. (1999) que observaram um B pequeno em um indivíduo coletado no Rio Mogi-Guaçu, próximo de Luis Antônio/SP. Trabalhos mais recentes, como de Gravena et al. (2007) e Teribele et al. (2008), que analisaram indivíduos de *C. modestus* coletados em diferentes pontos da bacia do rio Tibagi/PR, observaram uma variação de 0 a 2 cromossomos B nas células somáticas, evidenciando uma variação inter e intraindividual.

Oliveira e Foresti (1993) analisaram 11 indivíduos de *Steindachnerina insculpta* provenientes do rio Paranapanema, em Itatinga/SP, onde 27,3% dos indivíduos apresentaram de 1 a 2 cromossomos B, que se mostraram eucromáticos, diferindo dos resultados encontrados nesta mesma espécie por Gravena et al. (2007), em populações da bacia do rio Tibagi/PR, que apresentaram cromossomos B totalmente heterocromáticos.

Brassesco et al. (2004) encontraram em um indivíduo de *Cyphocharax spilodus* um microcromossomo B, relatado também por Fenocchio et al. (2003). Novas ocorrências de Bs foram observadas por Venere et al. (2008) em *Cyphocharax gouldingi* Vari, 1992, e por Sampaio et al. (2011) em *Cyphocharax voga*, *C. saladensis* (Meinken, 1933) e *Steindachnerina biornata* (Braga & Azpelicueta, 1987). Oliveira e Foresti (1993) e Martins et al. (1996) propuseram duas hipóteses, para explicar a origem do cromossomo B nas espécies da família Curimatidae. A primeira sugere que este cromossomo surgiu nos ancestrais da família (caráter plesiomórfico) e foi eliminado das espécies que não o possuem. Outra hipótese sugere uma origem recente e independente deste B (caráter apomórfico) nas espécies de curimatídeos que o possuem.

#### 1.4 ANÁLISES MEIÓTICAS EM PEIXES NEOTROPICAIS

A análise de cromossomos meióticos pode complementar os estudos mitóticos, pois corroboram os achados cariotípicos obtidos com base nas observações em metáfases mitóticas, como a presença de rearranjos estruturais e numéricos, ocorrência de poliploidia, sistemas cromossômicos de determinação do sexo do tipo simples ou múltiplo e presença de elementos adicionais correspondentes ao cromossomo B (GROSS et al., 2009; KASAHARA, 2009).

Um exemplo dessa importante associação foi feita em duas espécies endêmicas de *Pimelodus* do rio Iguazu no estado do Paraná, *Pimelodus* sp. e *P. ortmanni* Haseman, 1911, que apresentavam  $2n=56$  e variações intraindividuais de 0 a 4 cromossomos B nas células somáticas. A análise meiótica foi de extrema importância, confirmando a presença desses cromossomos, com uma variação de 0 a 2 Bs em metáfase I, mas não foi possível evidenciar se eles eram univalentes ou bivalentes. *Pimelodus* sp. apresentou 14,64% de indivíduos com cromossomos B e *Pimelodus ortmanni* apresentou 100% de indivíduos com este cromossomo extra. Este fato indica a possível variação interespecífica na estabilidade mitótica e meiótica dos cromossomos B nessas espécies (BORIN, MARTINS-SANTOS, 2004).

Cromossomos B presentes em células somáticas de *Iheringichthys labrosus* (Lütken, 1874) (CARVALHO, DIAS, 2005), também foram observados em metáfases I como um pequeno univalente, mostrando que este cromossomo não era homólogo a nenhum outro do complemento padrão. Os autores também puderam constatar que, além do B apresentar baixa frequência na mitose, apresentou baixa frequência na meiose, comprovando uma variação intraindividual deste cromossomo.

Adicionalmente, a espécie *Rineloricaria pentamaculata* Langeani & Araujo, 1994 do riacho Tauá, bacia do rio Paraná (PORTO et al., 2010), apresentou uma variação no número diplóide de 56 a 59 cromossomos. Esta variação se deve à presença de cromossomos B acrocêntricos, que variavam de 0 a 3 nas células somáticas, comprovados pela análise meiótica que mostrou 28 bivalentes nas fases de metáfase I e metáfase II e pequenos univalentes em 49,02% das células analisadas. Algumas células em metáfase II apresentaram até três univalentes. Estes dados reforçam a classificação desses elementos como cromossomos supranumerários ou B, indicando a instabilidade meiótica na transmissão à prole (PORTO et al., 2010).

Outra importante aplicação dos estudos meióticos nos peixes neotropicais está na confirmação do número diploide e na identificação de cromossomos sexuais. Para caracterizar o comportamento dos cromossomos meióticos, Silva et al. (2012) analisaram diferentes células gaméticas de *Astyanax jacuhiensis* Cope, 1894 ( $2n=50$ ) da Lagoa dos Quadros/RS. Metáfases espermatogoniais foram observadas com 50 cromossomos, paquítenos e metáfases I com 25 bivalentes e metáfases II com 25 cromossomos, confirmando assim o número diploide da espécie.

Em relação a estudos com cromossomos sexuais, para comprovar a homologia entre os cromossomos X e Y de 2 cariomorfos distintos de *Hoplias malabaricus* (Block, 1794), Cioffi e Bertollo (2010) analisaram células gaméticas de machos após a hibridação fluorescente *in situ* (FISH) com sonda de DNAr 18S. Os resultados encontrados foram: metáfases espermatogoniais com 39 cromossomos e 10 sítios de DNAr 18S; células em início de prófase I com 5 pares de sítios de DNAr 18S, devido ao emparelhamento dos cromossomos homólogos durante a fase de zigóteno; diplóteno e diacinese com 18 bivalentes e um trivalente com 5 sítios de DNAr 18S, onde um destes sítios estava localizado no trivalente; e metáfase II com 19 cromossomos (18 autossomos+neo-Y) ou 20 cromossomos (18 autossomos+X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>) com 5 sítios de DNAr 18S. Este estudo mostrou os passos iniciais da diferenciação dos cromossomos XY, além da associação do sistema sexual XY presentes nos cariomorfos C e D (CIOFFI, BERTOLLO, 2010).

Além da presença/ausência de cromossomos B ou cromossomos sexuais, os estudos meióticos são extremamente resolutivos para o conhecimento sobre a composição heterocromática bem como a localização de sequências específicas neles. Poletto et al. (2010), estudando cromossomos meióticos de *Astatotilapia latifasciata* (Regan, 1929) (citado como *Haplochromis obliquidens*), identificaram cromossomos B totalmente heterocromáticos e, após a FISH, a presença de DNAr 18S nestes Bs, evidenciando univalentes em forma de anel.

Dessa forma, os estudos meióticos em peixes complementam as análises cromossômicas, comprovando sua importância na caracterização da estrutura cariotípica, na análise do comportamento de cromossomos B e cromossomos sexuais, assim como de polimorfismos cromossômicos numéricos e estruturais, caracterizando-se como uma ferramenta fundamental nos estudos citogenéticos de peixes Neotropicais.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo geral caracterizar o comportamento mitótico e meiótico de diferentes espécies de peixes da família Curimatidae, de três bacias hidrográficas distintas.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Analisar cromossomos mitóticos, meióticos e Bs das espécies coletadas de curimatídeos;
- ✓ Detectar as regiões organizadoras de nucléolos e o padrão de distribuição da heterocromatina;
- ✓ Evidenciar regiões cromossômicas ricas em pares de bases GC;
- ✓ Localizar os sítios ribossômicos 18S;
- ✓ Analisar o padrão de atividade das regiões organizadoras de nucléolo durante a divisão meiótica;
- ✓ Comparar os dados obtidos com os da literatura, visando compreender melhor a estrutura e a evolução cromossômica da família Curimatidae.

### 3 LOCAIS DE COLETA E ESPÉCIES ESTUDADAS

Foram estudadas espécies de peixes dos gêneros *Cyphocharax* e *Steindachnerina* (figura 1) coletadas em diferentes pontos da bacia do rio Paranapanema (Paraná/São Paulo), do sistema hidrográfico Laguna dos Patos e bacia do rio Tramandaí (Rio Grande do Sul) (tabela 1; figura 2).

O gênero *Cyphocharax* é o mais amplamente distribuído na região Neotropical que qualquer outro gênero desta família, representando quase um terço de todas as espécies do grupo. Possuem uma mancha escura na porção caudal da linha lateral média, sendo apenas diferenciada pelo número de escamas (VARI, 1992). O gênero *Steindachnerina* ocorre, em sua maioria, em sistemas de grandes drenagens que cruzam as enormes terras baixas da região tropical e subtemperada da América do Sul. Possuem corpo alongado, com uma linha escura no meio das laterais do seu corpo e ao longo de todo o seu comprimento (VARI, 1991).

A bacia do rio Paranapanema estende-se pelo sudoeste do estado de São Paulo e norte do Paraná, cobrindo uma área de aproximadamente 100.800 km<sup>2</sup>, dos quais 53% estão no território paranaense e 47% no território paulista (VERMULM JUNIOR et al., 2002). A bacia do rio Tibagi pertence à bacia do rio Paranapanema, com uma área de drenagem de 25.000 km<sup>2</sup> e 550 km de extensão (BENNEMANN et al., 1995), sendo composta pelo rio Tibagi, maior afluente do rio Paranapanema, localizando-se na sua margem esquerda. O rio Tibagi nasce no município de Palmeira e deságua no município de Primeiro de Maio, escoando inteiramente no estado do Paraná (SHIBATTA et al., 2002).

Segundo Shibatta et al. (2002), existem três espécies de curimatídeos endêmicas da bacia do alto rio Paraná, que engloba a bacia do rio Paranapanema: *Cyphocharax modestus*, *Cyphocharax nagellii* e *Steindachnerina insculpta*. São peixes de pequeno porte que preferem locais calmos e com bastante matéria orgânica de origem vegetal depositada no substrato. *C. modestus* e *S. insculpta* estão amplamente distribuídas na bacia do rio Tibagi, podendo ser capturadas tanto no rio Tibagi como em seus afluentes e subafluentes.

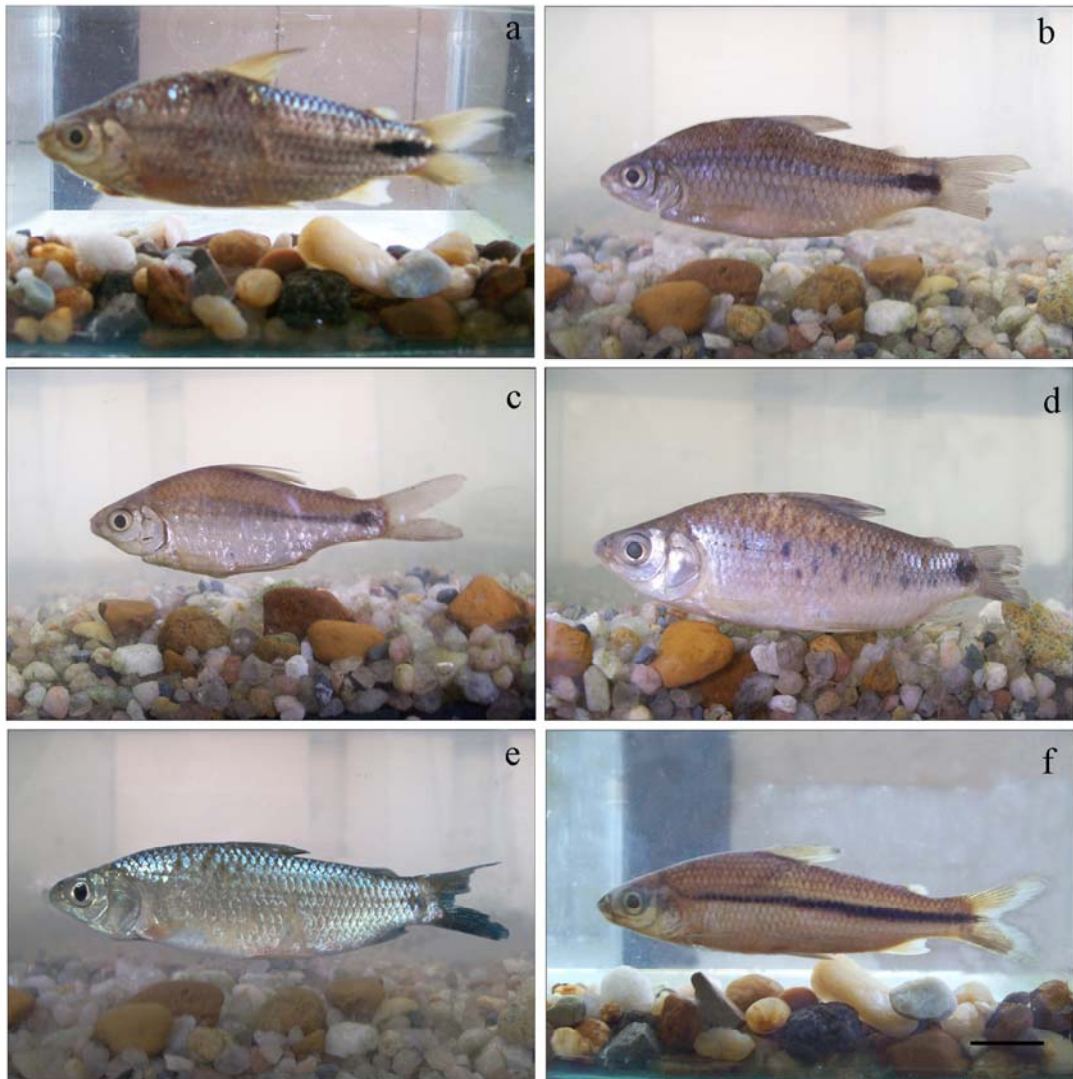
O sistema hidrográfico Laguna dos Patos localiza-se na porção leste do estado do Rio Grande do Sul, e constitui-se em um dos maiores reservatórios de água doce do planeta, apresentando uma superfície aproximada de 10.000 km<sup>2</sup> (SEMA/RS, 2002; TOLDO et al., 2006). Nesta região, os peixes das lagoas, rios e arroios são o sustento de milhares de pessoas e a economia de dezenas de município. Existem, relativamente, poucos trabalhos realizados no estado do Rio Grande do Sul que enfocam a comunidade dos peixes e, assim, o

estudo da ictiofauna destes sistemas hidrográficos é considerado incipiente, quando comparado aos rios Paraná e Paraguai (SEMA/RS, 2002).

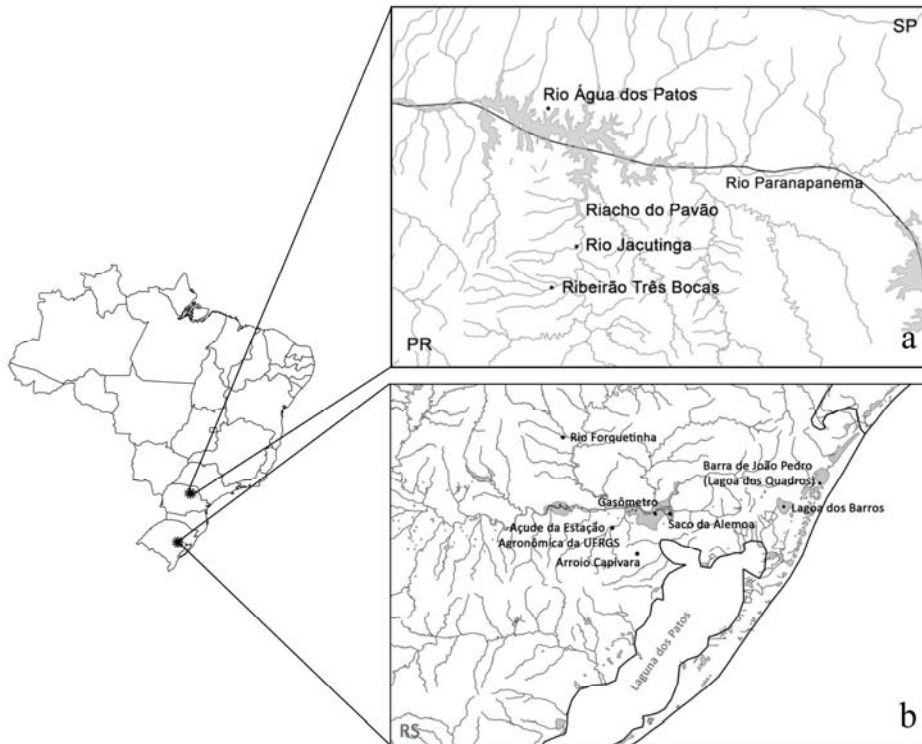
**Tabela 1** - Espécies, locais de coleta e bacias hidrográficas dos exemplares estudados.

<b>Espécie</b>	<b>Nº de indivíduos</b>	<b>Local de coleta</b>	<b>Bacia</b>
<i>Cyphocharax modestus</i>	5♀, 6♂	Ribeirão Três Bocas, Londrina, PR, Brasil S 23°17'12.9" W 51°13'58.2"	Paranapanema
<i>Cyphocharax saladensis</i>	1♀, 9♂	Açude da Estação Experimental Agronômica da UFRGS, Eldorado do Sul, RS, Brasil S 30°05'33.7" W 51°40'40.0"	Laguna dos Patos
<i>Cyphocharax spilotus</i>	2♀, 2♂	Arroio Capivara, Barra do Ribeiro, RS, Brasil S 30°17'34.0" W 51°19'21.2"	Laguna dos Patos
	1♂	Gasômetro, Porto Alegre, RS, Brasil S 30°02'06.3" W 51°14'29.12"	
<i>Cyphocharax voga</i>	1♀, 1♂	Rio Saco da Alemoa, Eldorado do Sul, RS, Brasil S 29°59'15.6" W 51°14'24.1"	Laguna dos Patos
	3♀, 9♂	Arroio Capivara, Barra do Ribeiro, RS, Brasil S 30°17'34.0" W 51°19'21.2"	
	1♀, 3♂	Gasômetro, Porto Alegre, RS, Brasil S 30°02'06.3" W 51°14'29.12"	
	5♂	Lagoa dos Barros, Osório, RS, Brasil S 29°56'30.0" W 50°19'32.0"	
	3♀, 4♂	Lagoa dos Quadros – Barra do João Pedro, Maquiné, RS, Brasil S 29°46'21.2" W 50°05'08.0"	Tramandaí
<i>Steindachnerina biornata</i>	1♀, 1♂	Rio Forquetinha, Canudos do Vale, RS, Brasil S 29°24'22.4" W 52°03'19.2"	Laguna dos Patos
<i>Steindachnerina insculpta</i>	3♀, 2♂	Ribeirão Três Bocas, Londrina, PR, Brasil S 23°17'12.9" W 51°13'58.2"	Paranapanema
	2♂	Riacho do Pavão, Sertanópolis, PR, Brasil	
	6♀, 12♂	Rio Jacutinga, Londrina, PR, Brasil S 23°23'6.6" W 51°04'35.8"	
	3♀, 7♂	Rio Água dos Patos, Iepê, SP, Brasil S 23°12'23.3" W 50°56'49.1"	
<b>Total de indivíduos:</b>	<b>93</b>		

**Figura 1** - Exemplos de: a) *Cyphocharax modestus*; b) *Cyphocharax saladensis*; c) *Cyphocharax spilotus*; d) *Cyphocharax voga*; e) *Steindachnerina biornata*; f) *Steindachnerina inculpta*. Barra: 1 cm



**Figura 2** - Mapa do Brasil: (a) Locais de coleta da bacia do rio Paranapanema: rio Água dos Patos (SP), riacho do Pavão, rio Jacutinga e ribeirão Três Bocas (PR); (b) Locais de coleta do sistema hidrográfico Laguna dos Patos: rio Forquetinha, Gasômetro, Saco da Alemoa, Açude da Estação Experimental Agrônômica da UFRGS, Arroio Capivara e Lagoa dos Barros (RS); Locais de coleta do rio Tramandaí: Lagoa dos Quadros (RS).



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### CAPÍTULO I

#### TENDÊNCIAS EVOLUTIVAS NA FAMÍLIA CURIMATIDAE (CHARACIFORMES): INFERÊNCIAS A PARTIR DE BANDAMENTOS CROMOSSÔMICOS

\* Este artigo será submetido à publicação na revista *Review Fish Biology Fisheries*.

#### Tendências evolutivas na família Curimatidae (Characiformes): inferências a partir de bandamentos cromossômicos

Tatiane Ramos Sampaio, Larissa Bettin Pires, Renata da Rosa, Ana Lúcia Dias.

Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, PR445, Km 380, Caixa Postal 6001, CEP: 86051-970, Londrina, Paraná, Brasil.  
anadias@uel.br

#### RESUMO

A família Curimatidae é um grupo de peixes de água doce composto por 8 gêneros e 101 espécies, distribuídas na América do Sul e sul da América Central. Poucos estudos de bandamentos cromossômicos focando a evolução dos cromossomos dos curimatídeos foram realizados. Espécies de peixes dos gêneros *Cyphocharax* e *Steindachnerina* foram coletadas em diferentes pontos da bacia do rio Paranapanema, do sistema hidrográfico Laguna dos Patos e da bacia do rio Tramandaí. Todas as espécies apresentaram  $2n=54$  m-sm e  $NF=108$ , e em todas as populações foram observados indivíduos com microcromossomos B. Um padrão de AgRONS simples foi observado nas seis espécies, em região terminal, diferindo quanto ao par e à localização no braço cromossômico de cada uma. Todas as AgRONS foram confirmadas pela FISH com sonda de DNAr 18S, exceto *Steindachnerina biornata* que apresentou um pequeno par de cromossomos a mais, com sítios de DNAr 18S indicando um padrão múltiplo para esta espécie. As AgRONS mostraram-se  $CMA_3^+/DAPI^-$  sendo, portanto, ricas em pares de base GC. A heterocromatina distribuiu-se em regiões pericentroméricas e em algumas regiões terminais, mostrando-se  $CMA_3^+/DAPI^-$ . Apesar do número diploide conservado, foi possível caracterizar e diferenciar as espécies de curimatídeos analisadas, que apresentaram divergência na localização das RONS, mostrando que a evolução cariotípica nos curimatídeos vem sendo acompanhada de rearranjos na microestrutura cromossômica.

**Palavras chave:** AgRON. FISH. Heterocromatina. Peixes de água doce. Diversificação cariotípica. Evolução.

## Introdução

Os estudos citogenéticos em peixes neotropicais revelam uma grande diversidade cromossômica, com variabilidade cariotípica tanto intra quanto interespecífica. Dentro da ordem Characiformes existem duas tendências bem diferenciadas: grupos que mostram grandes diferenças no número diploide e/ou na fórmula cariotípica e grupos cariotipicamente homogêneos (Bertollo et al. 1986; Oliveira et al. 2009). Diante dessas tendências, a família Curimatidae pertence ao segundo grupo, pois das 101 espécies descritas (Netto-Ferreira e Vari 2011), 38 foram estudadas citogeneticamente, sendo que 32 espécies apresentam número diploide ( $2n$ ) de 54 cromossomos e número fundamental (NF) igual a 108 e, destas, 28 possuem cromossomos meta-submetacêntricos (m-sm) (Sampaio et al. 2011).

A evolução cromossômica nos curimatídeos é acompanhada por pequenas mudanças na microestrutura cariotípica, como no padrão das regiões organizadoras de nucléolo (RONS) e na distribuição de heterocromatina, que podem ser considerados importantes marcadores citogenéticos. Assim, apesar do grupo ser considerado conservado, algumas espécies apresentam exceções à regularidade observada, o que permite inferir sobre as vias evolutivas dentro da família (Galetti Jr. et al. 1994; Galetti Jr. 1998).

Outra característica, considerada uma diversificação cromossômica dentro dos curimatídeos, é a presença de cromossomos B em algumas espécies (Venere et al. 2008). Este cromossomo, também chamado de supranumerário ou acessório, pode apresentar morfologia semelhante ou claramente distinta dos cromossomos do complemento A. O número de Bs pode variar entre diferentes células de um mesmo indivíduo nas espécies que os possuem, sendo devido a um retardo anafásico, com eliminação do B de algumas células ou tecidos, ou à não disjunção mitótica, quando ambas as cromátides migram para um mesmo pólo (Camacho 2000). Até o momento, cromossomos B foram descritos em sete espécies de curimatídeos, de diferentes populações: *Cyphocharax gouldingi*, *C. modestus*, *C. saladensis*, *C. spilotus*, *C. voga*, *Steindachnerina biornata* e *S. insculpta* (Venere et al. 2008; Sampaio et al. 2011).

O objetivo do presente trabalho foi caracterizar seis espécies de curimatídeos quanto aos seus cariótipos, RONS e distribuição de heterocromatina, para melhor entender a estrutura e organização cromossômica e identificar possíveis marcadores citogenéticos, contribuindo assim para um melhor entendimento sobre a evolução cromossômica nesse importante grupo de peixes.

## Material e Métodos

Foram analisadas seis espécies de curimatídeos coletadas em diferentes pontos da bacia do rio Paranapanema (PR/SP), do sistema hidrográfico Laguna dos Patos e bacia do rio Tramandaí (RS) (tabela 1). Os exemplares foram coletados com a permissão do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), protocolo número 11399-1. Os espécimes foram depositados no Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina (MZUEL), Paraná, Brasil, sob os seguintes números de voucher: MZUEL 1374 - *Cyphocharax modestus*; MZUEL 5058 - *C. saladensis*; MZUEL 5106 - *C. spilotus*; MZUEL 5105 - *C. voga*; MZUEL 5059 - *Steindachnerina biornata*; MZUEL 1042 - *S. insculpta*.

A estimulação mitótica foi realizada pela injeção prévia de solução de fermento biológico nos animais *in vivo*, descrita por Lee e Elder (1980); os cromossomos mitóticos foram obtidos por preparação direta, com a retirada do rim anterior, segundo Bertollo et al. (1978), visualizados por coloração convencional com Giemsa 5% e classificados em metacêntricos (m) e submetacêntricos (sm), de acordo com Levan et al. (1964).

As regiões organizadoras de nucléolos foram detectadas pela impregnação por nitrato de prata (AgRONS), segundo Howell e Black (1980) e pela técnica de hibridação fluorescente *in situ* (FISH), segundo Pinkel et al. (1986), com sonda de DNAr 18S, proveniente de *Prochilodus argenteus* (Hatanaka e Galetti Jr. 2004). As regiões ricas em pares de bases GC foram evidenciadas utilizando fluorocromo cromomicina A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>), conforme descrito por Schweizer (1980). As regiões heterocromáticas foram visualizadas com a técnica de banda C, com utilização de ácido clorídrico, hidróxido de bário e solução salina 2XSSC, segundo Sumner (1972), coradas com Giemsa 5% e posteriormente, coradas com fluorocromo CMA<sub>3</sub>.

## Resultados

Todas as espécies analisadas apresentaram número diploide de 54 cromossomos meta-submetacêntricos (m-sm) e número fundamental (NF) igual a 108, e em todas as populações foram observados indivíduos com microcromossomos B (dot) em suas células somáticas (Fig. 1, 2). Constrições secundárias terminais foram observadas em *Cyphocharax voga* (Hensel, 1870) e *Steindachnerina biornata* (Braga & Azpelicueta, 1987)

no braço longo dos pares 5 e 3, respectivamente (Fig. 2a, b, box lateral); e em *Cyphocharax spilotus* (Vari, 1987), uma constrição secundária foi observada na posição intersticial do braço curto do par 2 (Fig. 1c, box lateral).

A impregnação com nitrato de prata evidenciou as regiões organizadoras de nucléolos (AgRONS) na região terminal de um par de cromossomos em todas as espécies (Fig. 1, 2, box lateral). A tabela 2 mostra o par e a posição da AgRON de cada espécie. A constrição secundária foi coincidente com a AgRON em *C. voga* (par 5) e *S. biornata* (par 3) (Fig. 2a, b, box); em *C. spilotus* o par da constrição foi o mesmo da AgRON (par 2), mas ela não foi coincidente com esta região (Fig. 1c, box).

As AgRONS foram confirmadas pela hibridação fluorescente *in situ* (FISH) com sonda de DNAr 18S nas espécies *Cyphocharax modestus* (Férrandez-Yépez, 1948), *C. saladensis* (Meinken, 1933), *C. spilotus*, *C. voga* e *Steindachnerina insculpta* (Férrandez-Yépez, 1948) (Fig. 1, 2, box lateral). *Steindachnerina biornata* apresentou, além do par impregnado pela prata, um pequeno par de cromossomos metacêntricos com sítios ribossômicos 18S na região terminal do braço longo (Fig. 2b, box lateral). A coloração com o fluorocromo CMA<sub>3</sub> revelou marcas fluorescentes na região terminal de um par de cromossomos correspondentes às AgRONS, em todas as espécies (Fig. 1, 2, box lateral).

Dois indivíduos de *Cyphocharax voga*, coletados na Lagoa dos Barros/RS, apresentaram um bloco correspondente à AgRON e ao fluorocromo CMA<sub>3</sub> na constrição secundária de um cromossomo somente e a FISH revelou sítios ribossômicos em dois cromossomos, onde um dos homólogos apresentou um grande bloco e o outro cromossomo um pequeno sítio, revelando um heteromorfismo desta região (Fig. 3).

A heterocromatina nas espécies de curimatídeos foi observada, preferencialmente, em regiões pericentroméricas e em algumas regiões terminais (Fig. 4). Após a coloração com fluorocromos, todas as regiões heterocromáticas se mostraram CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> (Fig. 5). Em *Steindachnerina biornata* foi observada heterocromatina nas duas regiões terminais do par portador da RON, sendo um bloco no braço longo e uma marcação mais discreta no braço curto e, após a coloração com o fluorocromo CMA<sub>3</sub>, estas regiões apresentaram-se fluorescentes (Fig. 4e, 5e).

O microcromossomo B apresentou-se heterocromático em *Cyphocharax modestus*, *C. saladensis* e em *Steindachnerina insculpta* (Fig. 4a, b, f, boxes, respectivamente); nas demais espécies não foi possível sua visualização com bandamento C. Somente em *C. saladensis* foi visualizado o cromossomo B heterocromático fluorescente após a coloração com fluorocromo CMA<sub>3</sub> (Fig. 5b).

## Discussão

Na família Curimatidae, existem dados citogenéticos somente para 38 espécies, considerando as 101 já descritas para o grupo. Destas 38 espécies, 32 apresentam 54 cromossomos, caracterizando este  $2n$  como conservado para este grupo de peixes (tabela 3). As espécies do presente estudo mantiveram o padrão, apresentando  $2n=54$  do tipo m-sm. Segundo Feldberg et al. (1992), este é um cariótipo ancestral dos curimatídeos e variações desta condição representam caracteres derivados. Brassesco et al. (2004), por exemplo, estudaram as espécies *Cyphocharax platanus* (Günther, 1880) e *Potamorhina squamoralevis* (Braga & Azpelicueta, 1983) e encontraram variações no número diploide: *C. platanus* apresentou um  $2n=58$  com fórmula cariotípica de  $52m-sm+6st$  e *P. squamoralevis* apresentou  $2n=102$  com  $14m-sm+88a$ . Estes dados indicam que a evolução cromossômica em algumas espécies de curimatídeos é acompanhada por pequenas mudanças na macroestrutura cariotípica (Venere e Galetti 1989).

Sampaio et al. (2011) analisaram o comportamento mitótico e meiótico dos microcromossomos B presentes nas espécies do presente estudo, sendo esta uma importante característica citogenética deste grupo de peixes. A ocorrência destes cromossomos B foi relatada, até o momento, em sete espécies de curimatídeos de diferentes populações (tabela 3), correspondendo a 18,42% do total de espécies estudadas (Sampaio et al. 2011). Apesar de ser considerado uma característica marcante da família Curimatidae, dos 8 gêneros analisados apenas 2, *Cyphocharax* e *Steindachnerina*, mostraram, até então, a presença deste tipo de cromossomo (tabela 3).

Das 11 espécies do gênero *Cyphocharax* estudadas citogeneticamente, 5 portaram o cromossomo B, sendo elas: *Cyphocharax gouldingi* Vari, 1992 (Venere et al. 2008), *C. modestus*, *C. saladensis*, *C. spilotus* e *C. voga* (Sampaio et al. 2011), representando 45% do total de espécies (tabela 3). Dentre estas, *C. modestus* é a espécie com mais populações analisadas (9), onde 5 delas apresentam exemplares com cromossomos extras, equivalendo à 55,5% do total de populações desta espécie. Dentro do gênero *Steindachnerina*, 9 espécies foram estudadas, e somente 2 portaram o cromossomo B: *Steindachnerina biornata* e *S. insculpta* (Sampaio et al. 2011), representando 22% do total de espécies (tabela 3). *S. insculpta* é o curimatídeo com mais populações estudadas até o momento (13), sendo que 6 delas apresentaram exemplares com cromossomos extras, equivalendo à 46% do total de populações desta espécie.

As análises das regiões organizadoras de nucléolos na família Curimatidae mostram que, geralmente, são encontradas em um par de cromossomos, em braços e cromossomos diferentes, como nas espécies deste estudo. Trabalhos anteriores descrevem as AgRONS de *Cyphocharax spilodus* e *Steindachnerina insculpta* em pares diferentes do presente estudo (tabela 3), demonstrando uma variabilidade interpopulacional na localização da AgRON entre os curimatídeos. Esses peixes são encontrados em diversos ecossistemas da região Neotropical, sendo que populações isoladas podem ser estabelecidas sob diferentes condições ambientais, o que pode permitir o aumento da frequência de determinadas variações (Vari 2003; Brassesco et al. 2004). Essas variações podem ser devidas a rearranjos na microestrutura cromossômica, como translocações e/ou inversões (Venere Galetti 1989; De Rosa et al. 2007).

Todas as populações estudadas de *Cyphocharax modestus* apresentaram a AgRON no par 2, assim como as populações de *C. voga*, que apresentaram a AgRON principalmente no par 5 (tabela 3), indicando que estes sítios podem ser considerados importantes marcadores citogenéticos espécie-específicos (De Rosa et al. 2007; Venere et al. 2008).

Uma característica citogenética não muito comum nos curimatídeos é a presença de constrições secundárias. Somente Feldberg et al. (1992), observaram constrições coincidentes com a AgRON em *Curimata inornata* Vari, 1989 e *Steindachnerina leuciscus* (Günther, 1868), e Teribele et al. (2008), em um cromossomo de *Cyphocharax modestus*, do rio Taquari/PR. Neste estudo, a constrição secundária observada em *C. voga* e *S. biornata* foi coincidente com a AgRON, diferindo de *C. spilodus*, onde o par da constrição foi o mesmo da AgRON, mas não coincidente com esta região.

A FISH com sonda de DNAr 18S confirmou a localização e o par correspondente a AgRON de cada espécie neste estudo, além de evidenciar, em *Steindachnerina biornata*, um pequeno par de cromossomos metacêntricos com sítios ribossômicos 18S não identificados pela impregnação com nitrato de prata, o que pode ser devido à falta de atividade transcricional destes sítios, como sugerido por Da Rosa et al. (2011) em *Hoplias malabaricus* (Block, 1794). Estes são os primeiros dados de bandamento cromossômico para a espécie *Steindachnerina biornata* e o resultado da FISH evidencia mais uma espécie com padrão de RONS múltiplas entre os curimatídeos, o qual foi observado apenas em *Curimata inornata*, *Cyphocharax nagelii* (Steindachner, 1881), *Steindachnerina amazonica* (Steindachner, 1911) e *S. gracilis* Vari&Vari, 1989 (Venere et al. 2008). Como

relatado na tabela 3, a maioria dos estudos com RONS somente utilizaram nitrato de prata, o que pode explicar as poucas espécies com RONS múltiplas neste grupo de peixes.

Poucos são os dados sobre coloração com fluorocromos na literatura para a família Curimatidae, sendo relatados apenas para *Cyphocharax modestus* e *Steindachnerina insculpta* (Martins et al. 1996; De Rosa et al. 2007; Teribele et al. 2008) e os resultados são coincidentes com os observados neste estudo, onde as RONS mostraram somente sinais fluorescentes para o fluorocromo CMA<sub>3</sub>, indicando que esta região é rica em pares de base GC.

Dois indivíduos de *Cyphocharax voga* da população de Lagoa dos Barros/RS apresentaram um resultado diferente dos demais indivíduos desta população e das outras espécies do presente estudo. Estes exemplares portaram um bloco, correspondente à AgRON e ao fluorocromo CMA<sub>3</sub>, na constrição secundária de apenas um cromossomo e a FISH revelou sítios ribossômicos em dois cromossomos, onde um apresentou um grande bloco e o outro cromossomo um pequeno sítio ribossômico. Este heteromorfismo da RON nos cromossomos homólogos de *C. voga*, provavelmente é devido a um crossing-over desigual, onde o sítio pequeno pode ter se tornado inativo, ou devido ao seu tamanho, não pode ser detectado pelo nitrato de prata ou CMA<sub>3</sub>. Resultados semelhantes foram encontrados por Teribele et al. (2008), em um indivíduo de *Cyphocharax modestus* coletado no rio Taquari/PR.

As análises de banda C mostraram o mesmo padrão de distribuição da heterocromatina nas espécies estudadas, onde pouca heterocromatina, mas presente principalmente nas regiões pericentroméricas representou uma característica comum entre estes curimatídeos, ou seja, não foi possível caracterizar e diferenciar as espécies e/ou gêneros analisados. Venere et al. (2008) puderam constatar uma diversificação significativa na distribuição e na quantidade de heterocromatina de algumas espécies de curimatídeos, diferenciando os gêneros *Steindachnerina* e *Cyphocharax*. Enquanto espécies do gênero *Cyphocharax* portaram maior quantidade de heterocromatina, espécies do gênero *Steindachnerina* portaram menor quantidade, indicando a caracterização cromossômica de cada grupo em relação à heterocromatina. A diferença na quantidade de heterocromatina dos curimatídeos do presente estudo e de Venere et al. (2008), reflete na variabilidade interpopulacional que ocorre nesta família, que pode ter um importante papel na evolução cromossômica deste grupo de peixes. Como citado anteriormente, os curimatídeos podem ser estabelecidos em populações isoladas sob diferentes condições ambientais, o que pode permitir o aumento de variações na distribuição da heterocromatina (Brassesso et al. 2004).

A banda C corada com fluorocromo CMA<sub>3</sub> revelou sinais fluorescentes nas regiões heterocromáticas de muitos cromossomos do complemento, mostrando, portanto, que a heterocromatina destes curimatídeos é composta na maior parte por pares de bases GC. Em *Steindachnerina biornata* foi observado um par cromossômico que pode ser considerado um marcador espécie-específico, pois foi detectada heterocromatina nas duas regiões terminais do par portador da RON, sendo um bloco no braço longo associado à RON e uma marcação mais discreta no braço curto, e ambas as regiões também se mostraram CMA<sub>3</sub><sup>+</sup>. A RON adjacente aos blocos heterocromáticos facilitaria as quebras cromossômicas, levando a rearranjos estruturais nestas regiões (Moreira-Filho et al. 1984).

Em *Cyphocharax modestus*, *C. saladensis* e *Steindachnerina insculpta* o microcromossomo B apresentou-se totalmente heterocromático, indicando ausência total de atividade gênica, como em outras populações analisadas de *C. modestus* (Venere et al. 1999; Gravena et al. 2007). Já em *S. insculpta*, o B foi observado tanto eucromático (Oliveira e Foresti 1993) quanto heterocromático (Gravena et al. 2007). Após a coloração com CMA<sub>3</sub>, o cromossomo B heterocromático de *C. saladensis* mostrou-se fluorescente, portanto, rico em pares de base GC. Resultado semelhante foi observado em outras espécies de peixes como *Leporinus* sp. (Venere et al. 1999), *Iheringichthys labrosus* (Lütken, 1874) (Carvalho et al. 2010) e *Bryconamericus ecai* Silva, 2004 (Santos et al. 2012). Entretanto, o cromossomo B de *C. modestus*, estudado por Martins et al. (1996), se mostrou CMA<sub>3</sub><sup>-</sup>/DAPI<sup>-</sup>. Considerando as duas hipóteses propostas para a origem do B em curimatídeos, (Oliveira e Foresti 1993; Martins et al. 1996), onde este cromossomo pode ter surgido nos ancestrais da família, sendo eliminado das espécies que não o possuem, ou tiveram uma origem recente e independente, pode-se sugerir que a segunda hipótese seja mais real, resultando em espécies próximas, ou até a mesma espécie, com diferenças no padrão e na composição da heterocromatina do cromossomo B.

Este estudo mostrou os primeiros dados de bandamento cromossômico para as populações de curimatídeos pertencentes ao estado do Rio Grande do Sul, nas bacias do sistema hidrográfico Laguna dos Patos e do rio Tramandaí, assim como os primeiros dados para as espécies *Cyphocharax saladensis* e *Steindachnerina biornata*. Apesar dos curimatídeos serem caracterizados, na sua maioria, por uma macroestrutura cariotípica conservativa, os dados apresentados acima mais os da literatura comprovam que as variações interpopulacionais na localização das RONS, assim como na distribuição de heterocromatina, são causadas por importantes mecanismos que levam à evolução e diversificação deste grupo de peixes.

## Referências Bibliográficas

- Bertollo, LAC, Takahashi CS, Moreira-Filho O (1978) Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Braz J Genet* 1: 103-120.
- Bertollo, LAC, Moreira-Filho O, Galetti PM (1986) Cytogenetics and taxonomy: considerations based on chromosome studies of freshwater fish. *J Fish Biol* 28:153-159.
- Brassesco MS, Pastori MC, Roncati HA, Fenocchio AS (2004) Comparative cytogenetics studies of Curimatidae (Pisces, Characiformes) from the middle Paraná River (Argentina). *Genet Mol Res* 3 (2): 293-301.
- Camacho JPM, Sharbel TF, Beukeboom LW (2000) B-chromosome evolution. *Phil Trans R Soc Lond B: Biol Sciences* 355: 163–178. doi: 10.1098/rstb.2000.0556
- Carvalho ML, Oliveira C, Foresti F (2001) Cytogenetic analysis of three species of the families Characidae and Curimatidae (Teleostei, Characiformes) from the Acre River. *Chromosome Science* 5: 91-96.
- Carvalho RA, Laudicina A, Giuliano-Caetano L, Martins-Santos IC, Dias AL (2010) Cytogenetics analysis of the 18S, 5S rDNA and B chromosome of *Iheringichthys labrosus* (Lütken, 1984) (Siluriformes, Pimelodidae). *Braz J Biol* 70 (3): 631-636.
- Da Rosa R, Rubert M, Martins-Santos IC, Giuliano-Caetano L (2011) Evolutionary trends in *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Agassiz 1829) (Characiformes, Erythrinidae). *Rev Fish Biol Fisheries*. doi: 10.1007/s11160-011-9237-3
- De Rosa LV, Foresti F, Wasko AP, Oliveira C, Martins C (2006) Nucleotide sequence, genomic organization and chromosome localization of 5S rDNA in two species of Curimatidae (Teleostei, Characiformes). *Genet Mol Biol* 29 (2): 251-256.
- De Rosa LV, Foresti F, Martins C, Oliveira C, Sobrinho PE, Wasko AP (2007) Cytogenetic analyses of two Curimatidae species (Pisces; Characiformes) from the Paranapanema and Tietê Rivers. *Braz J Biol* 67: 333-338.
- De Rosa LV, Foresti F, Martins C, Oliveira C, Wasko AP (2008) Identification and description of distinct B chromosomes in *Cyphocharax modestus* (Characiformes, Curimatidae). *Genet Mol Biol* 31(1): 265-269.
- Feldberg E, Porto JIR, Bertollo LAC (1992) Karyotype evolution in Curimatidae (Teleostei, Characiformes) of the Amazon region. I. Studies on the genera *Curimata*, *Psectrogaster*, *Steindachnerina* and *Curimatella*. *Braz J Genet* 15(2): 369-383.
- Feldberg E, Porto JIR, Nakayama CM (1993) Karyotype evolution in Curimatidae (Teleostei, Characiformes) from the Amazon region. II. Centric fissions in the genus *Potamorhina*. *Genome* 36.
- Fenocchio AS, Pastori MC, Roncati HA, Moreira-Filho O, Bertollo LAC (2003) A cytogenetic survey of the fish fauna from Argentina. *Caryologia* 2: 197-204.

- Galetti Jr. PM, Bertollo LAC, Moreira-Filho O (1994) Trends in chromosome evolution of neotropical characiform fishes. *Caryologia* 47: 289-297.
- Galetti Jr. PM (1998) Chromosome diversity in neotropical fishes: NOR studies. *Ital J Zool* 65: 53-56.
- Gravena W, Teribele R, Giuliano-Caetano L, Dias AL (2007) Occurrence of B chromosomes in *Cyphocharax modestus* (Fernández-Yépez, 1948) and *Steindachnerina insculpta* (Fernández-Yépez, 1948) (Characiformes, Curimatidae) from the Tibagi River basin (Paraná State, Brazil). *Braz J Biol* 67(4 Suppl): 905-908.
- Hatanaka T, Galetti Jr. PM (2004) Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetica* 122: 239-244.
- Howell WM, Black DA (1980) Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a One-step method. *Experientia* 36: 1014-1015.
- Lee MR, Elder FFB (1980) Yeast stimulation of bone marrow mitosis for cytogenetics investigations. *Cytog Cell Genet* 52: 36-40.
- Levan A, Fredga K, Sanberg AA (1964) Nomenclatura for centromeric position on chromosome. *Hereditas* 52: 201-204.
- Martins C, Giuliano-Caetano L, Dias AL (1996) Occurrence of a B chromosome in *Cyphocharax modestus* (Pisces, Curimatidae). *Cytobios* 85: 247-253.
- Moreira-Filho O, Bertollo LAC, Galetti Jr PM (1984) Structure and variability of nucleolar organizer regions in Parodontidae fish. *Canad J Genet Cytol* 5: 564-568.
- Navarrete MC, Júlio Junior HF (1997) Cytogenetic analysis of four curimatids from the Paraguay Basin, Brasil (Pisces: Characiformes, Curimatidae). *Cytologia* 62: 241-247.
- Netto-Ferreira AL, Vari RP (2011) New species of *Steindachnerina* (Characiformes: Curimatidae) from the Rio Tapajós, Brazil, and review of the genus in the Rio Tapajós and Rio Xingu basins. *Copeia* 4: 523-529.
- Oliveira C, Foresti F (1993) Occurrence of supernumerary microchromosomes in *Steindachnerina insculpta* (Pisces, Characiformes, Curimatidae). *Cytobios* 76: 183-186.
- Oliveira C, Foresti F, Hilsdorf AWS (2009) Genetics of neotropical fish: from chromosomes to populations. *Fish Physiol Biochem* 35: 81-100.
- Pinkel D, Straume T, Gray JW (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 2934-2938.
- Sampaio TR, Gravena W, Gouveia JG, Giuliano-Caetano L, Dias AL (2011) B microchromosomes in the family Curimatidae (Characiformes): mitotic and meiotic behavior. *Comparative Cytogenetics* 5 (4): 301-313. doi: 10.3897/CompCytogen.v5i4.1650

- Santos AR, Rubert M, Giuliano-Caetano L, Dias AL (2012) Sympatric occurrence of four cytotypes and one extra chromosome in *Bryconamericus ecai* (Characidae): 18S rDNA polymorphism and heterochromatin composition. *Hereditas* 000: 001-010. doi: 10.1111/j.1601-5223.2011.02234.x
- Schweizer D (1980) Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatic regions (DA/DAPI) in human chromosomes. *Cytog Cell Genet* 27: 190-193.
- Sumner AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Res* 75: 304-306.
- Teribele R, Gravena W, Carvalho K, Giuliano-Caetano L, Dias AL (2008) Karyotypic analysis in two species of fishes of the family Curimatidae: AgNO<sub>3</sub>, CMA<sub>3</sub> and FISH with 18S probe. *Caryologia* 61(3): 211-215.
- Vari RP (2003) Family Curimatidae. In: Reis RE, Kullander SO, Ferraris JRCJ (eds). *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America*. Porto Alegre, RS: Edipucrs, pp 51-64.
- Venere PC, Galetti PM (1985) Natural triploidy and chromosome B in the fish *Curimata modesta* (Curimatidae, Characiformes). *Braz J Genet* 8: 681-687.
- Venere PC, Galetti PM (1989) Chromosome evolution and phylogenetic relationships of some neotropical Characiformes of the family Curimatidae. *Braz J Genet* 12: 17-25.
- Venere PC, Miyazawa CS, Galetti Junior PM (1999) New cases of supernumerary chromosomes in Characiform fishes. *Genet Mol Biol* 22 (3): 345-349.
- Venere PC, Souza IL, Silva LK, Dos Anjos MB, De Oliveira RR, Galetti Junior PM (2008) Recent chromosome diversification in the evolutionary radiation of the freshwater fish family Curimatidae (Characiformes). *J Fish Biol* 72: 1976-1989. doi: 10.1111/j.1095-8649.2008.01814.x

**Tabela 1** - Espécies, locais de coleta e bacias hidrográficas dos exemplares estudados.

<b>Espécie</b>	<b>Nº de indivíduos</b>	<b>Local de coleta</b>	<b>Bacia</b>
<i>Cyphocharax modestus</i>	5♀, 6♂	Ribeirão Três Bocas, Londrina, PR, Brasil S 23°17'12.9" W 51°13'58.2"	Paranapanema
<i>Cyphocharax saladensis</i>	1♀, 9♂	Açude da Estação Experimental Agronômica da UFRGS, Eldorado do Sul, RS, Brasil S 30°05'33.7" W 51°40'40.0"	Laguna dos Patos
<i>Cyphocharax spilotus</i>	2♀, 2♂	Arroio Capivara, Barra do Ribeiro, RS, Brasil S 30°17'34.0" W 51°19'21.2"	Laguna dos Patos
	1♂	Gasômetro, Porto Alegre, RS, Brasil S 30°02'06.3" W 51°14'29.12"	
<i>Cyphocharax voga</i>	1♀, 1♂	Rio Saco da Alema, Eldorado do Sul, RS, Brasil S 29°59'15.6" W 51°14'24.1"	Laguna dos Patos
	3♀, 9♂	Arroio Capivara, Barra do Ribeiro, RS, Brasil S 30°17'34.0" W 51°19'21.2"	
	1♀, 3♂	Gasômetro, Porto Alegre, RS, Brasil S 30°02'06.3" W 51°14'29.12"	
	5♂	Lagoa dos Barros, Osório, RS, Brasil S 29°56'30.0" W 50°19'32.0"	
	3♀, 4♂	Lagoa dos Quadros – Barra do João Pedro, Maquiné, RS, Brasil S 29°46'21.2" W 50°05'08.0"	Tramandaí
<i>Steindachnerina biornata</i>	1♀, 1♂	Rio Forquetinha, Canudos do Vale, RS, Brasil S 29°24'22.4" W 52°03'19.2"	Laguna dos Patos
<i>Steindachnerina insculpta</i>	3♀, 2♂	Ribeirão Três Bocas, Londrina, PR, Brasil S 23°17'12.9" W 51°13'58.2"	Paranapanema
	2♂	Riacho do Pavão, Sertanópolis, PR, Brasil	
	6♀, 12♂	Rio Jacutinga, Londrina, PR, Brasil S 23°23'6.6" W 51°04'35.8"	
	3♀, 7♂	Rio Água dos Patos, Iepê, SP, Brasil S 23°12'23.3" W 50°56'49.1"	
<b>Total de indivíduos:</b>	93		

**Tabela 2** - Pares cromossômicos das regiões organizadoras de nucléolos (AgRONS) e suas respectivas posições.

<b>Espécie</b>	<b>Par da AgRON</b>	<b>Posição da AgRON no cromossomo</b>	<b>Construção secundária</b>
<i>Cyphocharax modestus</i>	02	Terminal/Braço longo	-----
<i>Cyphocharax saladensis</i>	08	Terminal/Braço longo	-----
<i>Cyphocharax spilotus</i>	02	Terminal/Braço longo	Intersticial/Braço curto
<i>Cyphocharax voga</i>	05	Terminal/Braço longo	Terminal/Braço longo
<i>Steindachnerina biornata</i>	03	Terminal/Braço longo	Terminal/Braço longo
<i>Steindachnerina insculpta</i>	12	Terminal/Braço curto	-----

**Tabela 3 -** Revisão citogenética de espécies da família Curimatidae (2n: número diploide; NF: número fundamental; m: metacêntrico; sm: submetacêntrico; st: subteloicêntrico; a: acrocêntrico; B: cromossomo supranumerário; term.: terminal; peric.: pericentromérica; centr.: centromérica; inters.: intersticial; br.: braço; RF: referências).

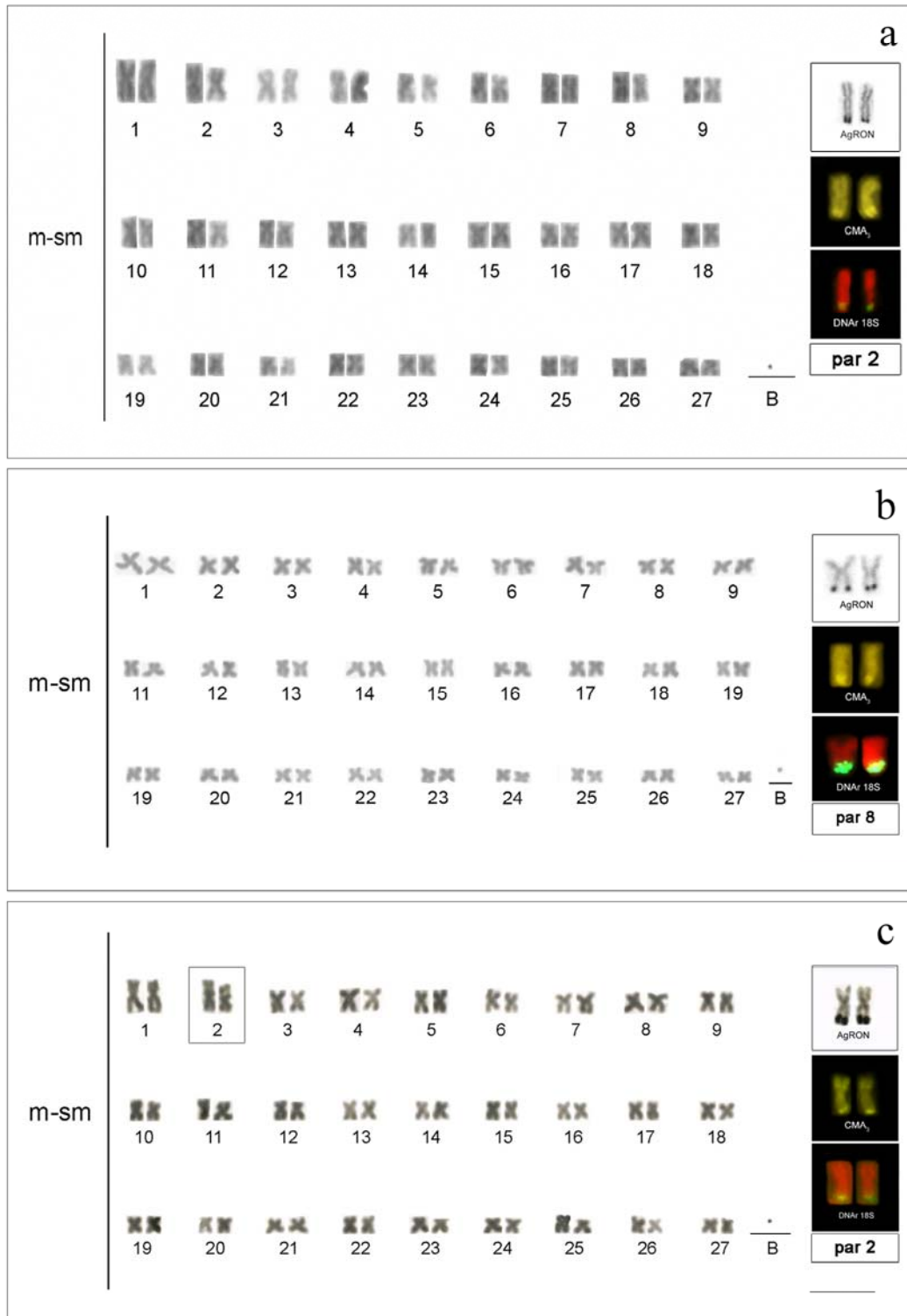
Espécie	Localidade	2n	Fórmula Cariotípica	NF	Par da AgRON	Posição	Nº de cístrons DNAr 18S	Nº de cístrons DNAr 5S/posição	Banda C	RF
<i>Curimata cyprinoides</i>	Rio Negro e Solimões/AM	54	44m + 10sm	108	3	term. br. longo	-	-	-	3
	Rio Araguaia/MT	54	44m + 10sm	108	7	term. br. longo	-	-	-	16
<i>Curimata inornata</i>	Rio Negro e Solimões/AM	54	40m + 14sm	108	21	inters. br. curto	-	-	-	3
	Rio Araguaia/MT	54	40m + 14sm	108	3, 22	term. br. longo	-	-	Peric./term.	16
<i>Curimata kneri</i>	Rio Negro e Solimões/AM	54	40m + 14sm	108	27	term. br. curto	-	-	-	3
<i>Curimata ocellata</i>	Rio Negro e Solimões/AM	56	40m + 16sm	112	26	inters. br. curto	-	-	-	3
<i>Curimata vittata</i>	Rio Negro e Solimões/AM	54	42m + 12sm	108	9	term. br. longo	-	-	-	3
<i>Curimatella alburna</i>	Rio Negro e Solimões/AM	54	46m + 8sm	108	14	term. br. longo	-	-	-	3
<i>Curimatella dorsalis</i>	Rio Miranda/MS	54	46m + 8sm	108	13	term. br. curto	-	-	Peric.	7
	Rio Paraná/AR	54	54m/sm	108	2	term. br. longo	-	-	Centr./term.	11
<i>Curimatella imaculata</i>	Rio Araguaia/GO	54	46m + 8sm	108	24	inters. br. longo	-	-	Peric.	16
<i>Curimatella lepidura</i>	Rio São Francisco//SP	54	54m/sm	108	9	term. br. curto	-	-	-	2
<i>Curimatella meyeri</i>	Rio Negro e Solimões/AM	54	46m + 8sm	108	9	term. br. longo	-	-	-	3
<i>Curimatopsis myersi</i>	Rio Miranda/MS	46	42m + 4sm	92	-	-	-	-	-	7
<i>Cyphocharax gilbert</i>	Rio Paraibuna/SP	54	44m + 10sm	108	2	term. br. curto	-	-	Peric./term.	16
<i>Cyphocharax cf. gillii</i>	Rio Bento Gomes/MT	54	54m/sm	108	1	inters. br. longo	-	-	-	2
<i>Cyphocharax gouldingi</i>	Rio Araguaia/GO	54	54m + B	108	2	term. br. longo	-	-	Peric.	16
<i>Cyphocharax modestus</i>	Rio Tiête/SP	54	54m/sm/B	108	-	term. br. longo	-	-	Centr./term.	1
	Águas de São Pedro/SP	54	54m/sm	108	2	term. br. longo	-	-	-	2
	Ribeirão Três Bocas/PR	54	54m/sm + B	108	2	term. br. longo	2	-	Peric./term.	6, 13, 15, 18, 19
	Rio Mogi-Guaçu/SP	54	54m/sm + B	108	-	-	-	-	Peric.	8
	Rio Taquari/PR	54	54m/sm + B	108	2	term. br. longo	2	-	Peric./term.	13, 15
	Rio Tibagi/PR	54	54m/sm	108	2	term. br. longo	2	-	-	15
	Rio Água da Floresta/PR	54	54m/sm	108	2	term. br. longo	2	-	-	15
	Rio Paranapanema/SP	54	54m/sm + B	108	2	term. br. longo	2	4/peric. br. curto	Centr./term.	12, 14, 17
	Rio Tietê/SP	54	54m/sm	108	2	term. br. longo	2	4/peric. br. curto	Centr./term.	12, 14, 17
<i>Cyphocharax nagelii</i>	Rio Mogi-Guaçu/SP	54	54m/sm	108	25	term. br. curto	-	-	-	2
	Rio Mogi-Guaçu/SP	54	46m + 8sm	108	1,2,6,11,21	term. br. curto/longo	-	-	Peric./term.	16
<i>Cyphocharax platanus</i>	Rio Paraná/AR	58	52m/sm + 6st	116	5	term. br. curto	-	-	Centr.	11

	Riacho Pirá-Pytá/ AR	58	48m + 4 sm + 6st	116	6	term. br. curto	-	-	Peric./term.	16
<i>Cyphocharax cf. spilurus</i>	Rio Madeira/RO	54	54m/sm	108	10	term. br. longo	-	-	-	2
<i>Cyphocharax spilurus</i>	Rio Paraná/AR	54	54m/sm + B	108	1	inters. br. longo	-	-	Centr./term.	10, 11
	Arroio Capivara/RS	54	54m/sm + B	108	2	term. br. longo	2	-	Peric./term.	18, 19
	Gasômetro/RS	54	54m/sm + B	108	2	term. br. longo	2	-	Peric./term.	18, 19
<i>Cyphocharax vanderi</i>	Rio Preto/SP	54	54m/sm	108	6	term. br. longo	-	-	-	2
<i>Cyphocharax voga</i>	Riacho Bolacha/RS	54	54m/sm	108	6	term. br. longo	-	-	-	2
	Rio Paraná/AR	54	54m/sm	108	-	term. br. longo	-	-	Inters./term.	11
	Rio Saco da Alemoa/RS	54	54m/sm + B	108	5	term. br. longo	2	-	Peric./term.	18, 19
	Arroio Capivara/RS	54	54m/sm + B	108	5	term. br. longo	2	-	Peric./term.	18, 19
	Gasômetro/RS	54	54m/sm + B	108	5	term. br. longo	2	-	Peric./term.	18, 19
	Lagoa dos Barros/RS	54	54m/sm + B	108	5	term. br. longo	2	-	Peric./term.	18, 19
	Lagoa dos Quadros/RS	54	54m/sm + B	108	5	term. br. longo	2	-	Peric./term.	18, 19
<i>Cyphocharax saladensis</i>	Açude EEA – UFRGS/RS	54	54m/sm + B	108	8	term. br. longo	2	-	Peric./term.	18, 19
<i>Potamorhina altamazonica</i>	Rio Negro e Solimões/AM	102	2m + 2sm + 98a	106	5	term. br. longo	-	-	Peric./inters. /term.	4
<i>Potamorhina latior</i>	Rio Negro e Solimões/AM	56	52m + 2sm + 2st	112	25	term. br. longo	-	-	Peric./term.	4
<i>Potamorhina pristigaster</i>	Rio Negro e Solimões/AM	54	42m + 12sm	108	25	term. br. curto	-	-	Peric.	4
<i>Potamorhina squamoralevis</i>	Rio Paraná/AR	102	14m/sm + 88a	116	-	term. br. longo	-	-	Centr.	11
<i>Psectrogaster amazonica</i>	Rio Araguaia/MT	54	44m + 10sm	108	17	term. br. curto	-	-	Peric.	16
<i>Psectrogaster curviventris</i>	Rio Miranda/MS	54	42m + 12sm	108	20	term. br. curto	-	-	Peric.	7
	Rio Paraná/AR	54	54m/sm	108	-	inters. br. longo	-	-	Centr./term.	11
<i>Psectrogaster rutiloides</i>	Rio Negro e Solimões/AM	54	42m + 12sm	108	9	term. br. longo	-	-	-	3
<i>Steindachnerina amazonica</i>	Rio Araguaia/GO	54	42m + 12sm	108	2, 23	term. br. longo	-	-	Peric./term.	16
<i>Steindachnerina biornata</i>	Rio Forquetinha/RS	54	54m/sm + B	108	3	term. br. longo	4	-	Peric./term.	18, 19
<i>Steindachnerina brevipinna</i>	Rio Miranda/MS	54	48m + 6sm	108	17	term. br. curto	-	-	Centr./term.	7
	Rio Paraná/AR	54	54m/sm	108	15	term. br. longo	-	-	Centr./inters. /term.	11
<i>Steindachnerina conspersa</i>	Rio Paraguai/MS	54	54m/sm	108	2	inters. br. longo	-	-	-	2
	Rio Paraná/AR	54	54m/sm	108	2	term. br. longo	-	-	Centr./inters.	11

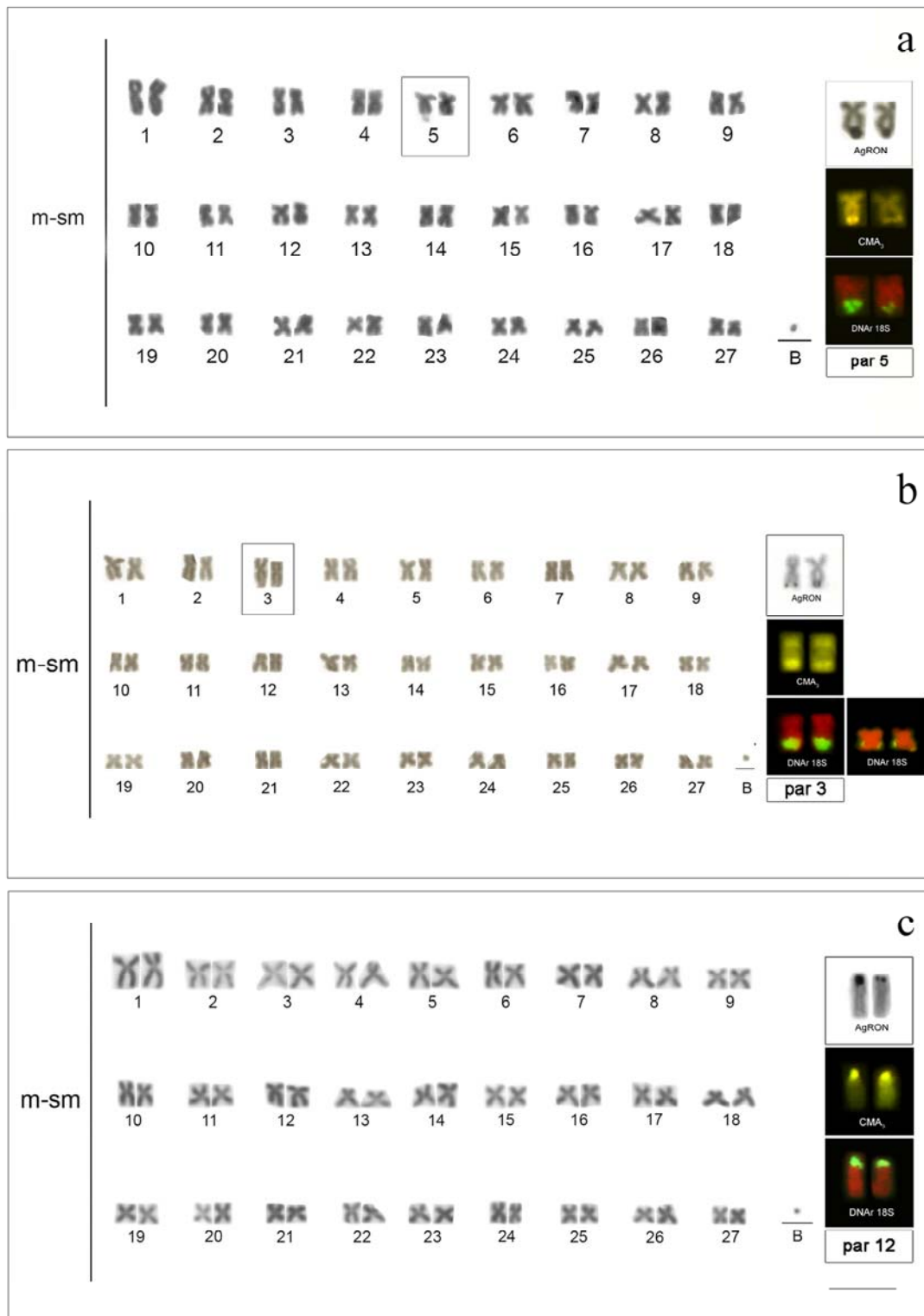
										/term.	
<i>Steindachnerina elegans</i>	Rio São Francisco/SP	54	54m/sm	108	25	term. br. curto	-	-	-	-	2
<i>Steindachnerina gracilis</i>	Rio Araguaia/MT	54	38m + 16sm	108	-	term. br. longo	-	-	-	Peric.	16
<i>Steindachnerina cf. guentheri</i>	Rio São Francisco/AC	54	54m/sm	108	24	term. br. curto	-	-	-	Peric./inters.	9
<i>Steindachnerina insculpta</i>	Rio Mogi-Guaçu/SP	54	54m/sm	108	25	term. br. curto	-	-	-	/term.	2
	Rio Passa-Cinco/SP	54	54m/sm	108	25	term. br. curto	-	-	-	-	2
	Rio Paranapanema/SP	54	54m/sm + B	108	-	-	-	-	-	Peric.	5
	Reserva Jurumirim/SP	54	54m/sm + B	108	-	-	-	-	-	Peric.	5
	Rio Paranapanema/SP	54	54m/sm	108	7	term. br. longo	2	2/peric. br. curto	-	Centr./term.	12, 14, 17
	Rio Tietê/SP	54	54m/sm	108	7	term. br. longo	2	2/peric. br. curto	-	Centr./term.	12, 14, 17
	Ribeirão Três Bocas/PR	54	54m/sm + B	108	7	term. br. longo	2	-	-	Peric./term.	13, 15
	Rio Taquari/PR	54	54m/sm	108	7	term. br. longo	2	-	-	Peric./term.	13, 15
	Rio Tibagi/PR	54	54m/sm	108	7	term. br. longo	2	-	-	Peric./term.	13, 15
	Rio Água da Floresta/PR	54	54m/sm	108	7	term. br. longo	2	-	-	Peric./term.	13, 15
	Cachoeira de Emas/SP	54	54m/sm	108	22	term. br. curto	-	-	-	Peric./term.	16
	Rio Água dos Patos/SP	54	54m/sm + B	108	12	term. br. curto	2	-	-	Peric./term.	18, 19
	Ribeirão Três Bocas/PR	54	54m/sm + B	108	12	term. br. curto	2	-	-	Peric./term.	18, 19
	Riacho do Pavão/PR	54	54m/sm + B	108	12	term. br. curto	2	-	-	Peric./term.	18, 19
	Rio Jacutinga/PR	54	54m/sm + B	108	12	term. br. curto	2	-	-	Peric./term.	18, 19
<i>Steindachnerina leucisca</i>	Rio Negro e Solimões/AM	54	48m + 6sm	108	15	term. br. curto	-	-	-	-	3

**1.** Venere, Galetti (1985); **2.** Venere, Galetti (1989); **3.** Feldberg et al. (1992); **4.** Feldberg et al. (1993); **5.** Oliveira, Foresti (1993); **6.** Martins et al. (1996); **7.** Navarrete, Júlio-Jr. (1997); **8.** Venere et al. (1999); **9.** Carvalho et al. (2001); **10.** Fenocchio et al. (2003); **11.** Brassesco et al. (2004); **12.** De Rosa et al. (2006); **13.** Gravena et al. (2007); **14.** De Rosa et al. (2007); **15.** Teribele et al. (2008); **16.** Venere et al. (2008); **17.** De Rosa et al. (2008); **18.** Sampaio et al. (2011); **19.** Sampaio (presente estudo).

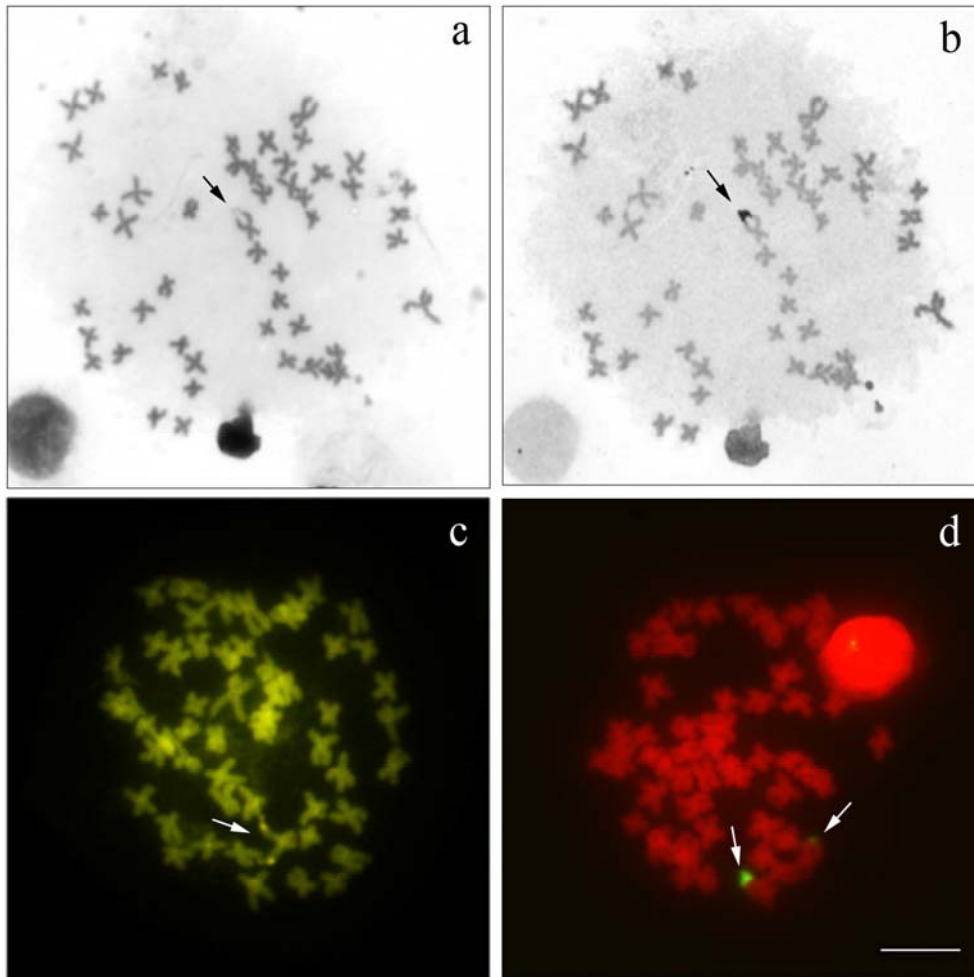
**Figura 1** - Cariótipos com microcromossomo B de: a) *Cyphocharax modestus*; b) *Cyphocharax saladensis*; c) *Cyphocharax spilotos*. Nos boxes laterais, o par portador da RON com impregnação com nitrato de prata, coloração com CMA<sub>3</sub> e FISH com sonda de DNAr 18S de cada espécie. Em (c), o par da RON com a constrição secundária está destacado no box. Barra = 5 µm



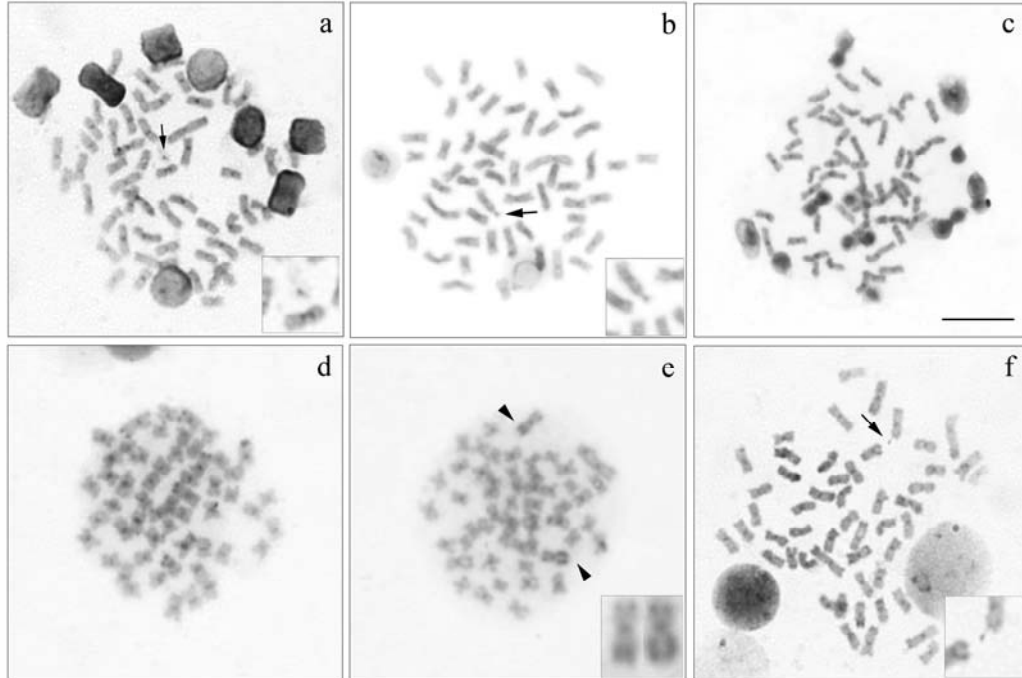
**Figura 2** - Cariótipos com microcromossomo B de: a) *Cyphocharax voga*; b) *Steindachnerina biornata*; c) *Steindachnerina insculpta*. Nos boxes laterais, o par portador da RON com impregnação com nitrato de prata, coloração com CMA<sub>3</sub> e FISH com sonda de DNAr 18S de cada espécie. Em (a) e (b), o par da RON com a constrição secundária está destacado no box. Barra = 5 µm



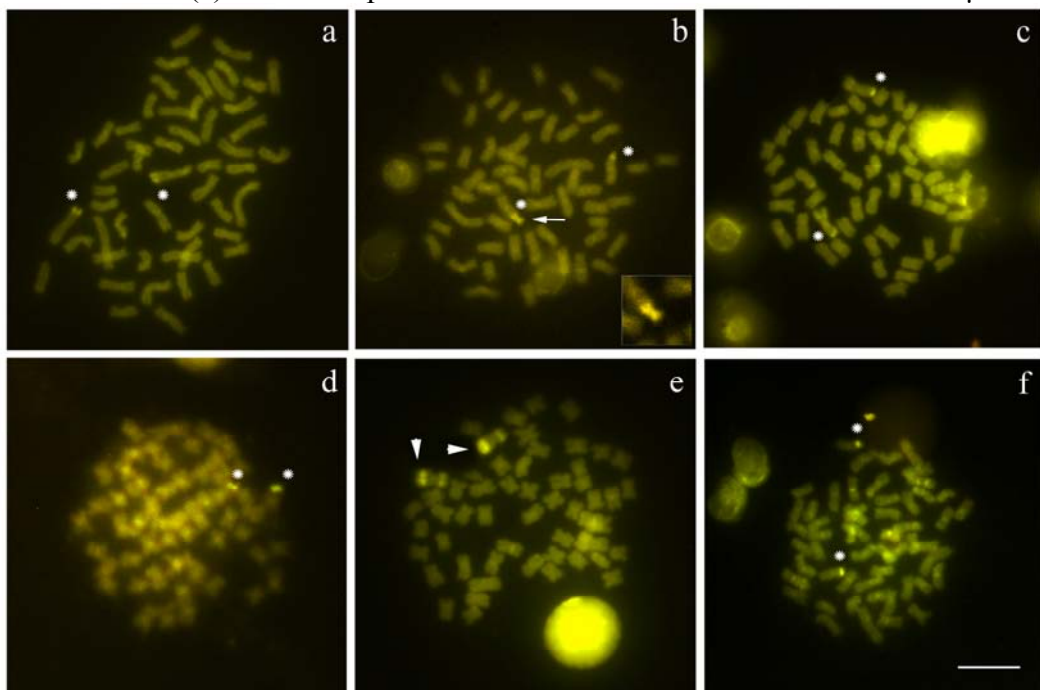
**Figura 3** - Metáfases somáticas de *Cyphocharax voga*, coletados na Lagoa dos Barros (RS): (a) Giemsa; (b) AgRON (sequencial); (c) CMA<sub>3</sub>; (d) FISH com sonda de DNAr 18S. As setas indicam o cromossomo portador da constrição secundária e da RON. Barra = 5 μm



**Figura 4** - Metáfases somáticas com bandamento C de: a) *Cyphocharax modestus*; b) *Cyphocharax saladensis*; c) *Cyphocharax spilotos*; d) *Cyphocharax voga*; e) *Steindachnerina biornata*; f) *Steindachnerina inculpta*. As setas e os boxes em (a), (b) e (f) destacam o microcromossomo B heterocromático. As setas e o box em (e) indicam o par heterocromático de *S. biornata*. Barra = 5  $\mu$ m



**Figura 5** - Metáfases somáticas de bandamento C coradas com fluorocromo CMA<sub>3</sub> de: a) *Cyphocharax modestus*; b) *Cyphocharax saladensis*; c) *Cyphocharax spilotos*; d) *Cyphocharax voga*; e) *Steindachnerina biornata*; f) *Steindachnerina inculpta*. Os (\*) indicam os pares das RONS. A seta e o box em (b) destaca o microcromossomo B de *C. saladensis* heterocromático CMA<sub>3</sub><sup>+</sup>. As cabeças de setas em (e) indicam o par heterocromático de *S. biornata*. Barra = 5  $\mu$ m



## CAPÍTULO II

### **PADRÃO DE ATIVIDADE DAS REGIÕES ORGANIZADORAS DE NUCLÉOLOS (RONs) NA DIVISÃO MEIÓTICA DE DIFERENTES ESPÉCIES DE CURIMATÍDEOS (CHARACIFORMES)**

**\* Este artigo será submetido à publicação na revista *Chromosome Research*.**

### **PADRÃO DE ATIVIDADE DAS REGIÕES ORGANIZADORAS DE NUCLÉOLOS (RONs) NA DIVISÃO MEIÓTICA DE DIFERENTES ESPÉCIES DE CURIMATÍDEOS (CHARACIFORMES)**

Tatiane Ramos Sampaio, Larissa Bettin Pires, Renata da Rosa, Ana Lúcia Dias

Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, PR445, Km 380, Caixa Postal 6001, CEP: 86051-970, Londrina, Paraná, Brasil.  
anadias@uel.br

#### **RESUMO**

O nucléolo é uma importante estrutura nuclear, onde ocorre a transcrição do DNA ribossômico (DNAr). Durante a divisão mitótica, o nucléolo passa por diferentes processos, inativando a transcrição do DNAr; já em relação à meiose, poucas informações se tem sobre o comportamento do nucléolo e da atividade transcricional. Assim, visando elucidar este comportamento, o padrão de atividade das regiões organizadoras de nucléolos (RONs) durante a divisão meiótica em cinco espécies de curimatídeos, foi analisado por impregnação com nitrato de prata, pela hibridação fluorescente *in situ* (FISH) e coloração com fluorocromos base-específicos. A prata evidenciou um nucléolo nos núcleos em interfase, um par de cromossomos nas metáfases espermatogoniais e um bivalente nos paquítenos; nas células em diplóteno, diacinese, metáfase I e II, as AgRONs não foram evidenciadas pela prata. A FISH confirmou a AgRON nos núcleos, nas espermatogonias e nos paquítenos e evidenciou esta região nos demais estágios meióticos, assim como o fluorocromo CMA<sub>3</sub> que revelou marcas fluorescentes em todos os estágios meióticos analisados, coincidindo com as RONs. A atividade gênica e a localização dessa sequência ribossômica durante os diferentes estágios meióticos são discutidos.

**Palavras chave:** AgRON. DNAr. FISH. Meiose. Transcrição.

## Introdução

O nucléolo é um compartimento nuclear onde o DNA ribossômico (DNAr) é transcrito, e é o local onde ocorre a síntese e processamento do RNA ribossômico (RNAr) (Hernandez-Verdum 2006). Ele ocupa uma porção considerável no núcleo, mas varia em tamanho e número dependendo da espécie, do tipo celular e do estado fisiológico (Visintin e Amon 2000). Além das atividades relacionadas ao RNAr, o nucléolo também participa no processamento e exportação de RNAm e RNAt, na regulação da mitose, no progresso e proliferação do ciclo celular, no controle da senescência, na modulação da função da telomerase e nas respostas ao estresse (Visintin e Amon 2000; Olson e Dundr 2005; Beguelini et al. 2011).

Na divisão mitótica, inicia-se a separação nucleolar, onde o nucléolo é desmontado, dispersando seus componentes nucleolares, como RNAs e proteínas, para diferentes partes da célula. A RNA polimerase I e os fatores de transcrição permanecem nas regiões organizadoras de nucléolos (RONs), e a transcrição do DNAr é inativada. Estes componentes são particionados para os núcleos filhos junto com os cromossomos. No final da mitose, durante o estágio da anáfase, os componentes nucleolares são remontados, reativando a transcrição do DNAr (Schmid et al. 1982; Olson e Dundr 2005; Beguelini et al. 2011).

Em relação à meiose, não se tem muitas informações sobre o que acontece com o nucléolo durante a divisão, mas sua remontagem ocorre durante a telófase II. O padrão de atividade das AgRONs durante esta divisão é muito similar em todas as classes de vertebrados, sendo observado atividade transcricional no início do estágio da prófase até a fase de paquíteno, totalmente ausentes nas metáfases I e II, e novamente aparece nos núcleos espermáticos, ou seja, após a remontagem do nucléolo (Hofgärtner et al., 1979; Schmid et al., 1983).

As regiões organizadoras de nucléolo (RONs) são sítios formados por inúmeras cópias de genes, arranjados em tandem, que codificam o RNAr no nucléolo. Estas regiões podem ser identificadas pela impregnação com nitrato de prata (AgRONs) (Howell e Black 1980), onde a prata se associa às proteínas ácidas nucleolares ativas e pela coloração com fluorocromos base-específicos, como a cromomicina A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>) (Schweizer 1980), revelando tanto as RONs ativas como as inativas, devido a grande quantidade de bases CG no DNAr (Salvadori et al. 1995). Para analisar as sequências de DNAr, responsáveis pela transcrição do RNAr, pode-se realizar a hibridação fluorescente *in situ* (FISH) com sondas ribossômicas, evidenciando os genes que codificam o RNAr (Pendás et al. 1993).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi estudar o padrão de atividade e localização das regiões organizadoras de nucléolos durante a divisão meiótica de peixes da família Curimatidae por diferentes técnicas. Os eventos genéticos e citológicos envolvidos nesse processo também são discutidos.

## **Material e Métodos**

Foram analisadas cinco espécies de curimatídeos coletadas em diferentes pontos da bacia do rio Paranapanema (PR/SP), do sistema hidrográfico Laguna dos Patos e da bacia do rio Tramandaí (RS) (tabela 1). Os exemplares foram coletados com a permissão do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), com número de protocolo 11399-1. Os espécimes foram depositados no Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina (MZUEL), Paraná, Brasil, sob os seguintes números de voucher: MZUEL 1374 - *Cyphocharax modestus*; MZUEL 5058 - *C. saladensis*; MZUEL 5106 - *C. spilottus*; MZUEL 5105 - *C. voga*; MZUEL 1042 - *Steindachnerina insculpta*.

Os cromossomos meióticos foram obtidos de gônadas de exemplares machos, segundo a técnica de Kligerman e Bloom (1977) e Bertollo et al. (1978). As regiões organizadoras de nucléolos foram detectadas pela impregnação por nitrato de prata (AgRONS), segundo Howell e Black (1980) e pela técnica de hibridação fluorescente *in situ* (FISH), segundo Pinkel et al. (1986), com algumas modificações, utilizando sonda de DNAr 18S, proveniente de *Prochilodus argenteus* (Hatanaka e Galetti Jr. 2004). As regiões ricas em pares de bases GC foram evidenciadas utilizando fluorocromo cromomicina A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>), conforme descrito por Schweizer (1980).

## **Resultados**

Em todas as espécies, a impregnação com nitrato de prata evidenciou somente um nucléolo nos núcleos em interfase. Nas metáfases espermatogoniais com 54 cromossomos, as AgRONS foram observadas na posição terminal de um par de cromossomos. Nas células em paquíteno com 27 bivalentes, apenas em um bivalente foi detectada a AgRON. Nas células em diplóteno, diacinese, metáfase I e II, as AgRONS não foram evidenciadas com nitrato de prata (Fig.1, 2).

A hibridação fluorescente *in situ* (FISH), com sonda de DNAr 18S, confirmou a presença da AgRON nas metáfases espermatogoniais e nas células de paquíteno.

Nas células em diplóteno, diacinese e metáfase I foi observado um sítio ribossômico em um bivalente; e em metáfase II, um cromossomo portador deste sítio foi observado (Fig. 3). A coloração com o fluorocromo CMA<sub>3</sub> revelou marcas fluorescentes nas AgRONS em todos os estágios meióticos analisados (Fig. 4, 5).

## Discussão

O comportamento dos cromossomos meióticos e o número diploide e haploide de: *Cyphocharax modestus* (Fernández-Yépez, 1948), *C. saladensis* (Meinken, 1933), *C. spilotus* (Vari, 1987), *C. voga* (Hensel, 1870) e *Steindachnerina insculpta* (Fernández-Yépez, 1948), foram descritos anteriormente (Sampaio et al. 2011), onde observou-se um número modal de 54 cromossomos nas metáfases espermatogoniais ( $2n = 54$ ), 27 bivalentes nas fases de paquíteno, diplóteno, diacinese e metáfase I, e 27 cromossomos em metáfase II ( $n = 27$ ), comprovando o número diploide das espécies e indicando uma segregação regular dos cromossomos durante esta divisão. O microcromossomo B presente nestas espécies foi observado como univalente em alguns estágios meióticos por Sampaio et al. (2011).

A análise das células meióticas das cinco espécies aqui analisadas mostrou que, o único nucléolo nos núcleos em interfase, a posição terminal das RONS nos cromossomos metafásicos e o número de RONS em todas as células meióticas, corresponderam aos resultados mitóticos destas mesmas espécies, confirmando assim, um padrão de RONS simples, característico dos curimatídeos. Por outro lado, diferenças nos pares destas regiões são evidenciadas, tornando-as bons marcadores citogenéticos espécie-específicos (De Rosa et al. 2007; Teribele et al. 2008).

Neste estudo foi constatado que a prata evidenciou as RONS somente nos núcleos em interfase, nas metáfases espermatogoniais e nas células em paquíteno; já nas células onde os cromossomos estavam um pouco mais condensados, como em diplóteno, diacinese, metáfase I e metáfase II, as RONS não foram detectadas pela prata e, somente após a FISH com a sonda de DNAr 18S e a coloração com CMA<sub>3</sub>, estas regiões foram reveladas em todos os estágios meióticos.

Uma hipótese que pode explicar a ausência de impregnação da prata após o estágio de paquíteno é que, a partir desta fase, ocorre uma inativação da atividade dos genes ribossômicos e, ao final da divisão meiótica, ocorre uma reativação destes genes. O nitrato de prata se associa a proteínas ácidas nucleolares, envolvidas na atividade transcricional de genes

de RNAr, que estão ativas nos sítios de DNAr (Galetti Jr. Martins 2004; Da Rosa et al. 2011), ou seja, como não há transcrição de RNAr após a fase de paquíteno, o nitrato de prata não impregna nos estágios seguintes.

Hofgartner et al. (1979), Schmid et al. (1982) e Schmid et al. (1983), analisando o padrão de atividade das regiões organizadoras de nucléolo em diferentes espécies de mamíferos, de vertebrados não mamíferos e humanos, chegaram a resultados semelhantes aos do presente estudo em suas análises meióticas. O nitrato de prata detectou a RON em células espermatogoniais e paquítenos. Em metáfase I e metáfase II, não foi observada nenhuma marcação, e nas espermatídes as AgRONS foram visualizadas novamente, indicando uma reativação pós-meiótica destas regiões. Os autores propõem que este padrão de atividade das AgRONS é comum para todos os vertebrados.

Na mitose, o nucléolo passa por um processo de desmontagem no início da divisão e remontagem no final da divisão mitótica, o que leva à inativação da transcrição do DNAr durante a mitose (Schmid et al. 1982; Olson e Dundr 2005). O processo de inativação das AgRONS nas células meióticas dos curimatídeos pode ser comparada ao processo que ocorre na mitose onde, durante a divisão, devido a dinâmica dos componentes nucleolares, ocorre uma diminuição da atividade transcricional, até a inativação dos genes de RNAr e, ao término da meiose, ocorre uma reativação destes genes.

Estudos realizados em células de leveduras puderam constatar que os nucléolos são desmontados após o início da anáfase meiótica, com uma diminuição da atividade transcricional durante a meiose, sugerindo uma regulação diferencial do DNAr durante a segregação dos cromossomos (Li et al. 2011). A desmontagem do nucléolo de leveduras inicia em um estágio posterior, em relação ao nucléolo de curimatídeos, mas a inativação de atividade nucleolar ocorre em ambos os casos.

O padrão de atividade das RONS nos curimatídeos é similar ao encontrado em outros vertebrados, mas difere, por exemplo, do observado em morcegos (Beguelini et al. 2011), onde todos os estágios meióticos apresentaram atividade transcricional, mostrando que não ocorre um padrão geral de comportamento das RONS, podendo variar em cada grupo de vertebrado.

Apesar da abrangência de estudos citogenéticos em peixes, a maioria concentra seus objetivos em dados mitóticos, sendo que informações sobre o comportamento dos cromossomos meióticos neste grupo animal ainda é escasso, principalmente em relação às aplicações de técnicas de bandamento convencional e molecular. Alguns trabalhos focam o comportamento do cromossomo B na meiose, como em *Cyphocharax modestus* e

*Steindachnerina insculpta* (Sampaio et al. 2011), em *Pimelodus* sp. e *P. ortmanni* Haseman, 1911 (Borin e Martins-Santos 2004), em *Iheringichthys labrosus* (Lütken, 1874) (Carvalho e Dias 2005) e em *Rineloricaria pentamaculata* Langeani & Araujo, 1994 (Porto et al. 2010). Outros trabalhos caracterizam o comportamento dos cromossomos meióticos, como realizado em *Astyanax jacuhiensis* Cope, 1894 (Silva et al. 2012) e em *Imparfinis mirini* Haseman 1911 (Gouveia et al. 2012), além de trabalhos que realizam a identificação de cromossomos sexuais, realizado por exemplo, em *Hoplias malabaricus* (Block, 1794), para comprovar a homologia entre os cromossomos X e Y (Cioffi e Bertollo 2010).

As espécies analisadas representam dois gêneros diferentes de curimatídeos, *Cyphocharax* e *Steindachnerina*, e a localização da RON durante a divisão meiótica foi similar nas cinco espécies analisadas. Isso demonstra que não há interferência dos diferentes táxons no comportamento da RON na meiose da família Curimatidae, como sugerido por Beguelini et al. (2011) em estudos com morcegos. Dessa forma, o comportamento da região organizadora de nucléolo nesse grupo de peixes demonstra que, o aparato proteico, relacionado à atividade transcricional, sofre diferentes alterações, enquanto que as sequências gênicas não são modificadas, permanecendo apenas inativas para a correta divisão celular.

### Referências Bibliográficas

- Beguelini MR, Marchesin SRC, Azeredo-Oliveira MTV, Morielle-Versute E (2011) Nucleolar behavior during meiosis in four species of phyllostomid bats (Chiroptera, Mammalia). *Genet Mol Res* 10(2): 552-565.
- Bertollo, LAC, Takahashi CS, Moreira-Filho O (1978) Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Braz J Genet* 1: 103-120.
- Borin LA, Martins-Santos IC (2004) Study on karyotype and occurrence of B chromosomes in two endemic species of the genus *Pimelodus* (Siluriformes, Pimelodidae) from the River Iguçu. *Hereditas* 140: 201-209.
- Carvalho RA, Dias AL (2005) Cytogenetic characterization of B chromosomes in two populations of *Iheringichthys labrosus* (Pisces, Pimelodidae) from the Capivara Reservoir (Paraná, Brasil). *Caryologia* 58(3): 269-273.
- Cioffi MB, Bertollo LAC (2010) Initial steps in XY chromosome differentiation in *Hoplias malabaricus* and the origin of an X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>Y sex chromosome system in this fish group. *Heredity* 105: 554-561.
- Da Rosa R, Rubert M, Martins-Santos IC, Giuliano-Caetano L (2011) Evolutionary trends in *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Agassiz 1829) (Characiformes, Erythrinidae). *Rev Fish Biol Fisheries*. doi: 10.1007/s11160-011-9237-3

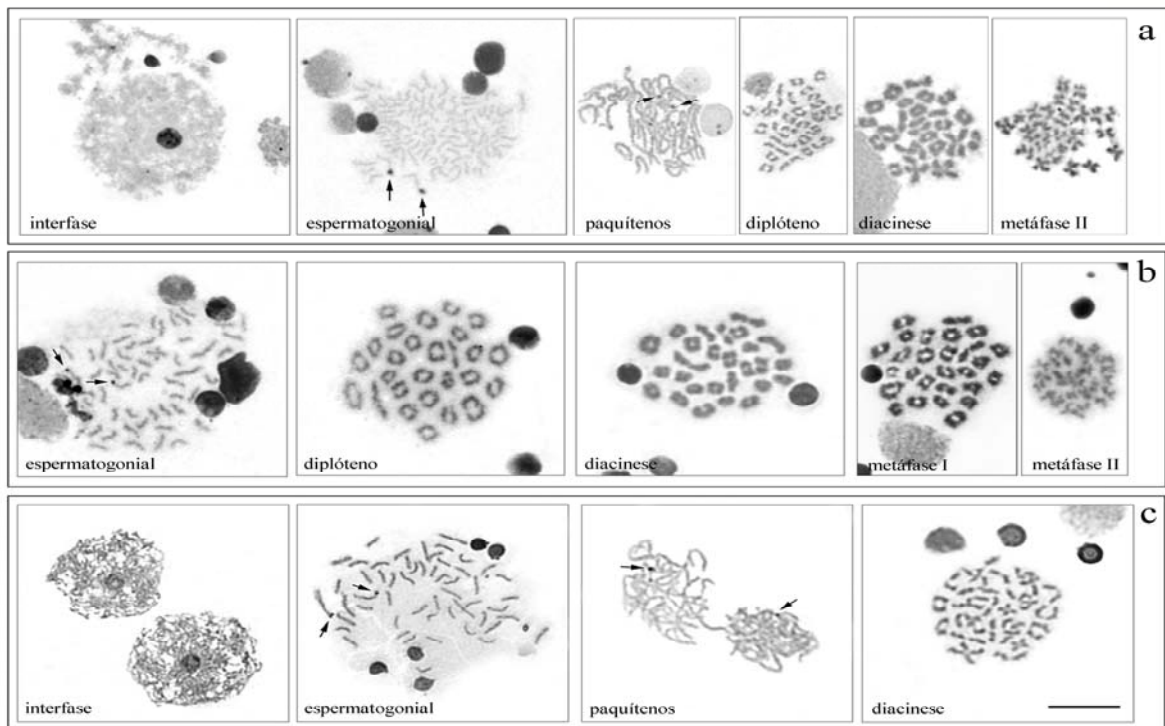
- De Rosa LV, Foresti F, Martins C, Oliveira C, Sobrinho PE, Wasko AP (2007) Cytogenetic analyses of two Curimatidae species (Pisces; Characiformes) from the Paranapanema and Tietê Rivers. *Braz J Biol* 67: 333-338.
- Galetti Jr. PM, Martins C (2004) Contribuição da hibridização *in situ* para o conhecimento dos cromossomos de peixes. In: Guerra MS. FISH – Conceitos e Aplicações na Citogenética. Ribeirão Preto, SP: SBG.
- Gouveia J, Moraes VPO, Sampaio TR, Rosa R, Dias AL (2012) Considerations on karyotype evolution in the genera *Imparfinis* Eigenmann and Norris 1900 and *Pimelodella* Eigenmann and Eigenmann 1888 (Siluriformes: Heptapteridae). *Rev Fish Biol Fisheries*. doi: 10.1007/s11160-012-9286-2
- Hatanaka T, Galetti Jr. PM (2004) Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetica* 122: 239-244.
- Hernandez-Verdun D (2006) Nucleolus: from structure to dynamics. *Histochem Cell Biol* 125: 127-137. doi: 10.1007/s00418-005-0046-4
- Hofgärtner FJ, Schmid M, Krone W, Zenzes MT, Engel W (1979) Pattern of activity of nucleolus organizers during spermatogenesis in mammals as analyzed by silver-staining. *Chromosoma* 71: 197-216.
- Howell WM, Black DA (1980) Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a One-step method. *Experientia* 36: 1014-1015.
- Kligerman AD, Bloom SE (1977) Rapid chromosome preparations from solid tissues of fishes. *J Fish Res B Canada* 34: 266-269.
- Li P, Jin H, Hoang ML, Yu HG (2011) Tracking chromosome dynamics in live yeast cells: coordinated movement of rDNA homologs and anaphase disassembly of the nucleolus during meiosis. *Chromosome Res* 19: 1013-1026. doi: 10.1007/s10577-011-9253-0
- Olson MOJ, Dundr M (2005) The moving parts of the nucleolus. *Histochem Cell Biol* 123: 203-216. doi: 10.1007/s00418-005-0754-9
- Pendás AM, Morán P, Garcia-Vázquez E (1993) Multi-chromosomal location of ribosomal RNA genes and heterochromatin association in Brown trout. *Chromosome Res* 1: 63-67.
- Pinkel D, Straume T, Gray JW (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 2934-2938.
- Porto FE, Portela-Castro ALB, Martins-Santos IC (2010) Possible origins of B chromosomes in *Rinelocaria pentamaculata* (Loricariidae, Siluriformes) from the Paraná River basin. *Genetics and Molecular Research* 9 (3): 1654-1659. doi: 10.4238/vol9-3gmr859
- Salvadori S, Deiana AM, Elisabetta C, Floridia G, Rossi E, Zuffardi O (1995) Colocalization of (TTAGGG)<sub>n</sub> telomeric sequences and ribosomal genes in Atlantic eels. *Chromosome Res* 3: 54-58.

- Sampaio TR, Gravena W, Gouveia JG, Giuliano-Caetano L, Dias AL (2011) B microchromosomes in the family Curimatidae (Characiformes): mitotic and meiotic behavior. *Comparative Cytogenetics* 5 (4): 301-313.
- Schmid M, Löser C, Schmidtke J, Engel W (1982) Evolutionary conservation of a common pattern of activity of nucleolus organizers during spermatogenesis in vertebrates. *Chromosoma* 86: 149-179.
- Schmid M, Müller Hj, Stasch S, Engel W (1983) Silver staining of nucleolus organizer regions during human spermatogenesis. *Human Genetics* 64: 363-379.
- Schweizer D (1980) Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatic regions (DA/DAPI) in human chromosomes. *Cytog Cell Genet* 27: 190-193.
- Silva LLL, Giuliano-Caetano L, Dias AL (2012) Chromosome studies of *Astyanax jacuhiensis* Cope, 1894 (Characidae) from the Tramandai river basin, Brazil, using *in situ* hybridization with the 18S rDNA probe, DAPI and CMA<sub>3</sub> staining. *Folia Biologica* 60:(3-4).
- Teribele R, Gravena W, Carvalho K, Giuliano-Caetano L, Dias AL (2008) Karyotypic analysis in two species of fishes of the family Curimatidae: AgNO<sub>3</sub>, CMA<sub>3</sub> and FISH with 18S probe. *Caryologia* 61(3): 211-215.
- Visintin R, Amon R (2000) The nucleolus: the magician's hat for cell cycle tricks. *Cell Biol* 12: 372-377.

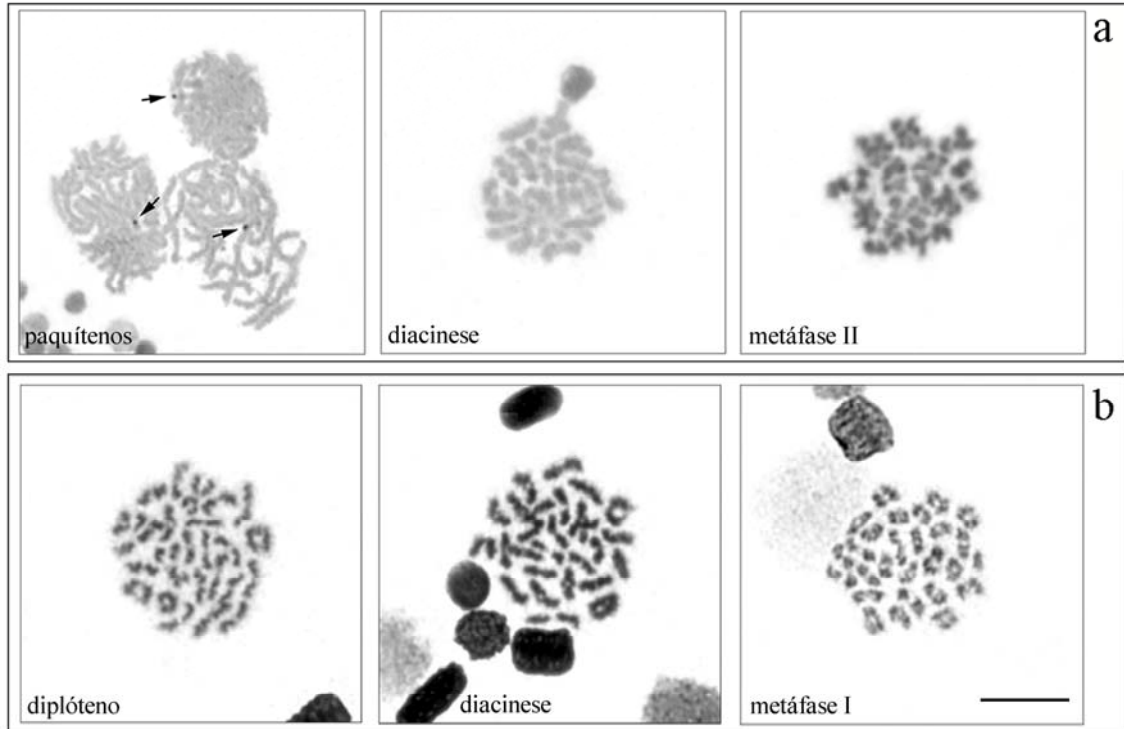
**Tabela 1** - Espécies, locais de coleta e bacias hidrográficas dos exemplares estudados.

Espécie	Nº de indivíduos	Local de coleta	Bacia
<i>Cyphocharax modestus</i>	2♂	Ribeirão Três Bocas, Londrina, PR, Brasil S 23°17'12.9" W 51°13'58.2"	Paranapanema
<i>Cyphocharax saladensis</i>	6♂	Açude da Estação Experimental Agronômica da UFRGS, Eldorado do Sul, RS, Brasil S 30°05'33.7" W 51°40'40.0"	Laguna dos Patos
<i>Cyphocharax spilotus</i>	2♂	Arroio Capivara, Barra do Ribeiro, RS, Brasil S 30°17'34.0" W 51°19'21.2"	Laguna dos Patos
<i>Cyphocharax voga</i>	1♂	Gasômetro, Porto Alegre, RS, Brasil S 30°02'06.3" W 51°14'29.12"	Laguna dos Patos
	8♂	Arroio Capivara, Barra do Ribeiro, RS, Brasil S 30°17'34.0" W 51°19'21.2"	
	1♂	Gasômetro, Porto Alegre, RS, Brasil S 30°02'06.3" W 51°14'29.12"	
<i>Steindachnerina insculpta</i>	2♂	Lagoa dos Quadros – Barra do João Pedro, Maquiné, RS, Brasil S 29°46'21.2" W 50°05'08.0"	Tramandaí
	6♂	Ribeirão Três Bocas, Londrina, PR, Brasil S 23°17'12.9" W 51°13'58.2"	Paranapanema
	6♂	Rio Jacutinga, Londrina, PR, Brasil S 23°23'6.6" W 51°04'35.8"	
	6♂	Rio Água dos Patos, Iepê, SP, Brasil S 23°12'23.3" W 50°56'49.1"	
<b>Total de indivíduos:</b>	40		

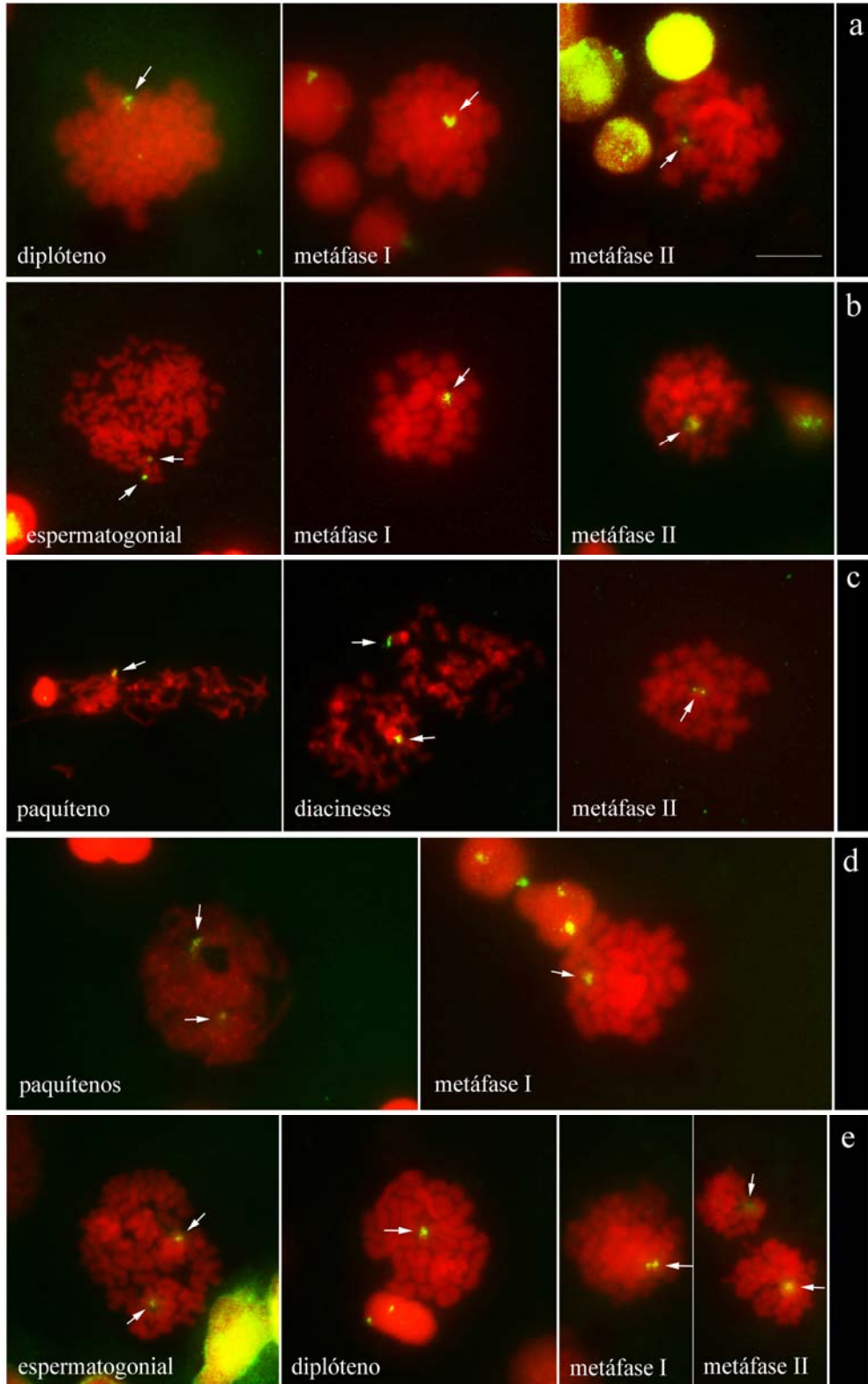
**Figura 1** - Células meióticas após impregnação com nitrato de prata de: (a) *Cyphocharax modestus*; (b) *C. saladensis*; (c) *C. spilotus*. As setas indicam as RONS nos estágios em metafases espermatogoniais e paquítenos. Em (a) e (c), os estágios de paquítenos são representados por duas células, assim como em (c) para a interfase. Note a ausência de impregnação com a prata nos estágios de diplóteno, diacinese, metáfase I e II. Barra = 5 µm



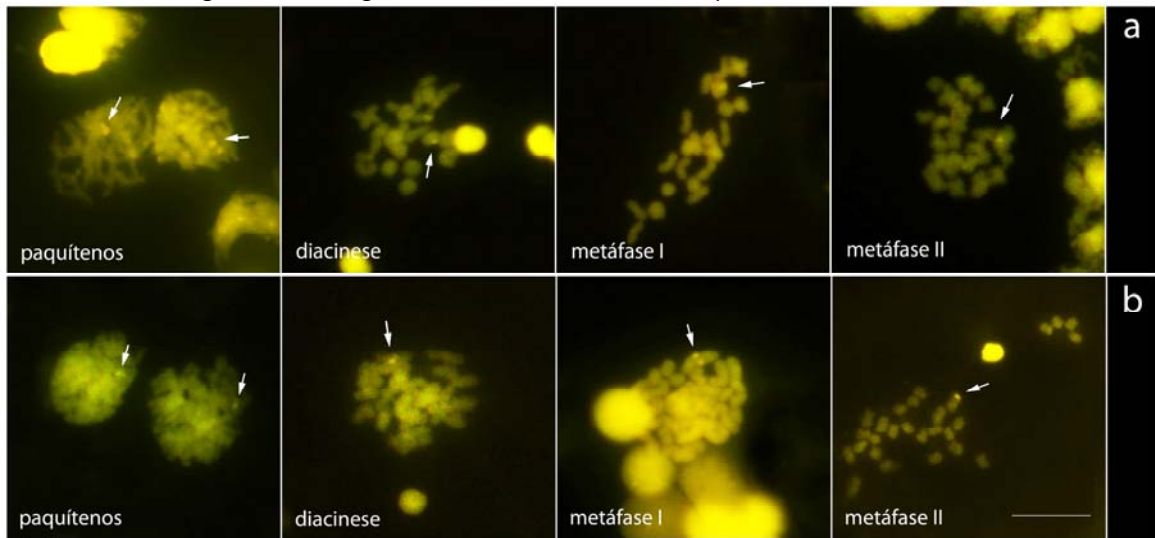
**Figura 2** - Células meióticas após impregnação com nitrato de prata de: (a) *Cyphocharax voga*; (b) *Steindachnerina insculpta*. As setas indicam as RONS nos estágios de paquíteno. Em (a), o estágio de paquíteno é representado por três células. Note a ausência de impregnação com a prata nos estágios de diplóteno, diacinese, metáfase I e II. Barra = 5  $\mu$ m



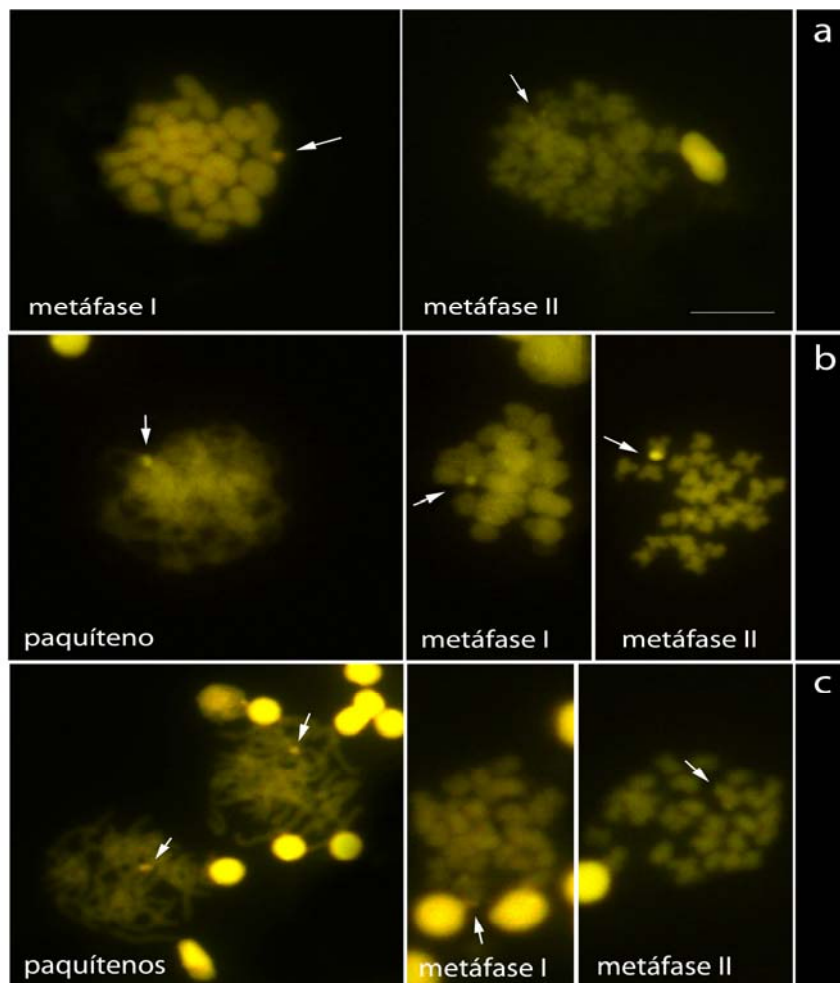
**Figura 3** - Células meióticas submetidas ao FISH com sonda de DNAr 18S: (a) *Cyphocharax modestus*; (b) *C. saladensis*; (c) *C. spilotos*; (d) *C. voga*; (e) *Steindachnerina insculpta*. As setas indicam as RONS. Note o sinal de hibridação em todos os estágios meióticos. Em (d), o estágio de paquíteno é representado por duas células, assim como em (e) para metáfase II. Barra = 5 µm



**Figura 4** - Células meióticas coradas com fluorocromo CMA<sub>3</sub> de: (a) *Cyphocharax spilotos*; (b) *C. voga*. As setas indicam as RONS. Em (a) e (b), os estágios de paquítenos são representados por duas células. Barra = 5 µm



**Figura 5** - Células meióticas coradas com fluorocromo CMA<sub>3</sub> de: (a) *Cyphocharax modestus*; (b) *C. saladensis*; (c) *Steindachnerina insculpta*. As setas indicam as RONS. Em (c), o estágio de paquíteno é representado por duas células. Barra = 5 µm



## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As análises citogenéticas nos curimatídeos deste estudo corroboram os dados disponíveis na literatura, entretanto, divergências na microestrutura cariotípica puderam levar a inferências sobre a evolução cromossômica que vem ocorrendo neste grupo de peixes. Diante disso, destacam-se as seguintes considerações:

1. Os dados cariotípicos de *Cyphocharax modestus*, *C. saladensis*, *C. spilottus*, *C. voga*, *Steindachnerina biornata* e *S. inculpta* confirmaram o número diploide igual 54 cromossomos, encontrado na maioria dos curimatídeos estudados citogeneticamente, além da ocorrência de microcromossomos B, sendo esta uma importante característica dos gêneros *Cyphocharax* e *Steindachnerina*.

2. RONS simples foram observadas em todas as espécies, exceto em *Steindachnerina biornata*, mas divergências quanto ao par e ao braço cromossômico, demonstraram uma variabilidade interpopulacional entre os curimatídeos e mostraram que a evolução cromossômica deste grupo foi acompanhada por rearranjos na microestrutura cariotípica. As RONS neste grupo de peixes podem ser consideradas importantes marcadores citogenéticos espécie-específicos.

3. Uma exceção quanto ao padrão das RONS foi observada em *Steindachnerina biornata* que, após a FISH, revelou um pequeno par de cromossomos a mais com sítios de DNAr 18S, indicando um padrão múltiplo para esta espécie. Além disso, essa espécie apresentou o par da RON com as duas regiões terminais heterocromáticas CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> mais conspícuas, constituindo um marcador espécie-específico.

4. Um heteromorfismo da RON foi observado em dois indivíduos de *Cyphocharax voga*, da população de Lagoa dos Barros (RS) indicando, provavelmente, a ocorrência de um crossing-over desigual, onde o sítio pequeno pode ter se tornado inativo, ou devido ao seu tamanho, não foi detectado pelo nitrato de prata nem pelo fluorocromo CMA<sub>3</sub>.

5. O padrão de distribuição da heterocromatina em todas as espécies foi semelhante, apresentando-se em regiões pericentroméricas e algumas terminais e, após a coloração com

fluorocromos, estas regiões se mostraram CMA<sub>3</sub><sup>+</sup>, não sendo possível diferenciar as espécies ou gêneros analisados.

**6.** Os cromossomos B de *Cyphocharax modestus*, *C. saladensis* e *Steindachnerina inculpta* apresentaram-se totalmente heterocromáticos, o que pode indicar a ausência total de atividade gênica. Estes dados diferem de populações anteriormente estudadas, revelando uma diversificação cromossômica, além de enfatizar que o B, nos curimatídeos, provavelmente teve sua origem independente nas espécies que o possuem, resultando em espécies próximas, ou até a mesma espécie, com diferenças cromossômicas entre elas.

**7.** Os dados citogenéticos deste estudo são os primeiros para as populações de curimatídeos das bacias do estado do Rio Grande do Sul, assim como para as espécies *Cyphocharax saladensis* e *Steindachnerina biornata*.

**8.** As RONS em posição terminal dos cromossomos nas metáfases espermatogoniais e a marcação única em todos os estágios meióticos analisados de cinco curimatídeos (*Cyphocharax modestus*, *C. saladensis*, *C. spiloptus*, *C. voga* e *S. inculpta*) puderam confirmar o padrão de RONS simples destas espécies.

**9.** Os resultados da impregnação com nitrato de prata, da FISH e da coloração com CMA<sub>3</sub> nas células meióticas mostraram que, provavelmente, ocorre uma inativação da atividade transcricional nas RONS após o estágio de paquíteno e, ao final da divisão, ocorre uma reativação desta atividade gênica. A razão desta inatividade da transcrição do DNAr pode ser devida ao processo de desmontagem do nucléolo durante a divisão meiótica, e que, antes do término da meiose, o nucléolo é remontado, ativando seu aparato proteico.

**10.** O comportamento da RON nos curimatídeos pôde demonstrar que, apesar do aparato proteico relacionado à atividade transcricional sofrer diferentes alterações, as sequências gênicas não são modificadas durante a meiose, permanecendo apenas inativas para uma correta divisão.

## REFERÊNCIAS

- BEGUELINI, M.R. et al. Nucleolar behavior during meiosis in four species of phyllostomid bats (Chiroptera, Mammalia). **Genetics and Molecular Research**, v.10, n.2, p.552-565, 2011.
- BENNEMANN, S.T.; SILVA-SOUZA, A.T.; ROCHA, G.R. Composicion ictiofaunística em cinco localidades de la cuenca Del Rio Tibagi PR-Brasil. **Interciência**, v.20, n.1, p.7-13, 1995.
- BERTOLLO, L.A.C.; TAKAHASHI, C.S.; MOREIRA-FILHO O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Revista Brasileira de Genética**, v.1, n.2, p.103-120, 1978.
- BERTOLLO, L.A.C.; MOREIRA-FILHO, O.; GALETTI, P.M. Cytogenetics and taxonomy: considerations based on chromosome studies of freshwater fish. **Journal Fish Biology**, v.28, p.153-159, 1986.
- BORIN, L.A.; MARTINS-SANTOS, I.C. Study on karyotype and occurrence of B chromosomes on two endemic species of the genus *Pimelodus* (Siluriformes, Pimelodidae) from the river Iguaçu. **Hereditas**, v.140, p.201-209, 2004.
- BOWEN, S.H. Detritivory in Neotropical fish communities. **Evolutionary ecology of Neotropical freshwater fishes**. Dr. W. Junk Publishers, p.59-66, 1984 *apud* FELDBERG, E. **Estudos Citogenéticos em 12 espécies de peixes da família Curimatidae (Characiformes) da Amazônia Central**. 1990. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – INPA, Manaus, AM.
- BRASSESCO, M.S. et al. Comparative cytogenetics studies of Curimatidae (Pisces, Characiformes) from the middle Paraná River (Argentina). **Genetics and Molecular Research**, v.3, n.2, p.293-301, 2004.
- CAMACHO, J.P.M.; SHARBEL, T.F.; BEUKEBOOM, L.W. B-chromosome evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, n.355, v.1394, p.163–178, 2000. DOI: 10.1098/rstb.2000.0556
- CARVALHO, M.L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Cytogenetic analysis of three especies of the families Characidae and Curimatidae (Teleostei, Characiformes) from the Acre River. **Chromosome Science**, v.5, p.91-96, 2001.
- CARVALHO, R.A.; DIAS, A.L. Cytogenetic characterization of B chromosomes in two populations os *Iheringichthys labrosus* (Pisces, Pimelodidae) from the Capivara Reservoir (Paraná, Brasil). **Caryologia**, v.58, n.3, p.269-273, 2005.
- CARVALHO, R.A.; MARTINS-SANTOS, I.C.; DIAS, A.L. Review Paper: B chromosomes: an update about their occurrence in freshwater Neotropical fishes (Teleostei). **Journal of Fish Biology**, v.72, p.1907–1932, 2008.
- CARVALHO, R.A. et al. Cytogenetics analysis of the 18S, 5S rDNA and B chromosome of *Iheringichthys labrosus* (Lütken, 1984) (Siluriformes, Pimelodidae). **Braz. J. Biol.**, v.70, n.3, p.631-636, 2010.

- CIOFFI, M.B.; BERTOLLO, L.A.C. Initial steps in XY chromosome differentiation in *Hoplias malabaricus* and the origin of an X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>Y sex chromosome system in this fish group. **Heredity**, v.105, p.554-561, 2010.
- DA ROSA, R. et al. Evolutionary trends in *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Agassiz 1829) (Characiformes, Erythrinidae). **Rev Fish Biol Fisheries**, 2011. DOI: 10.1007/s11160-011-9237-3
- DE ROSA, L.V. et al. Nucleotide sequence, genomic organization and chromosome localization of 5S rDNA in two species of Curimatidae (Teleostei, Characiformes). **Genetics and Molecular Biology**, v.29, n.2, p.251-256, 2006.
- DE ROSA, L.V. et al. Cytogenetic analyses of two Curimatidae species (Pisces; Characiformes) from the Paranapanema and Tietê Rivers. **Brazilian Journal of Biology**, v.67, p.333-338, 2007.
- DE ROSA, L.V. et al. Identification and description of distinct B chromosomes in *Cyphocharax modestus* (Characiformes, Curimatidae). **Genetics and Molecular Biology**, v.31, n.1, p.265-269, 2008.
- FELDBERG, E.; PORTO, J.I.R.; BERTOLLO, L.A.C. Karyotype evolution in Curimatidae (Teleostei, Characiformes) of the Amazon region. I. Studies on the genera *Curimata*, *Psectrogaster*, *Steindachnerina* and *Curimatella*. **Revista Brasileira de Genética**, v.15, n.2, p.369-383, 1992.
- FELDBERG, E. et al. Karyotype evolution in Curimatidae (Teleostei, Characiformes) from the Amazon region. II. Centric fissions in the genus *Potamorhina*. **Genome**, v.36, 1993.
- FENOCCHIO, A.S. et al. A cytogenetic survey of the fish fauna from Argentina. **Caryologia**, v.2, p.197-204, 2003.
- GALETTI Jr., P.M.; BERTOLLO, L.A.C.; MOREIRA-FILHO, O. Trends in chromosome evolution of neotropical characiform fishes. **Caryologia**, v.47, p. 289-297, 1994.
- GALETTI Jr., P.M. Chromosome diversity in neotropical fishes: NOR studies. **Ital. J. Zool.**, v.65, p. 53-56, 1998.
- GALETTI Jr., P.M.; MARTINS, C. Contribuição da hibridização *in situ* para o conhecimento dos cromossomos de peixes. In: GUERRA, M.S. FISH – Conceitos e Aplicações na Citogenética. Ribeirão Preto, SP: SBG, 2004.
- GOUVEIA, J. et al. Considerations on karyotype evolution in the genera *Imparfinis* Eigenmann and Norris 1900 and *Pimelodella* Eigenmann and Eigenmann 1888 (Siluriformes: Heptapteridae). **Rev Fish Biol Fisheries**, 2012. DOI: 10.1007/s11160-012-9286-2
- GUERRA, M.S. Introdução à Citogenética Animal. Rio de Janeiro, RS: Editora Guanabara, 1988.
- GRAVENA, W. et al. Occurrence of B chromosomes in *Cyphocharax modestus* (Fernández-Yépez., 1948) and *Steindachnerina insculpta* (Fernández-Yépez., 1948)

- (Characiformes, Curimatidae) from the Tibagi River basin (Paraná State, Brazil). **Brazilian Journal of Biology**, v.67, p.905-908, 2007.
- GROSS, M.C. et al. Intriguing evidence of translocations in Discus fish (*Symphysodon*, Cichlidae) and a report of the largest meiotic chromosomal chain observed in vertebrates. **Heredity**, v. 102, p.435-441, 2009.
- HATANAKA, T.; GATETTI JR, P.M. Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). **Genetica**, v.122, p.239-244, 2004.
- HERNANDEZ-VERDUN, D. Nucleolus: from structure to dynamics. **Histochem Cell Biol**, v.125, p.127-137, 2006. DOI 10.1007/s00418-005-0046-4
- HOFGÄRTNER et al. Pattern of activity of nucleolus organizers during spermatogenesis in mammals as analyzed by silver-staining. **Chromosoma**, v.71, p.197-216, 1979.
- HOWELL, W.M.; BLACK, D.A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a One-step method. **Experientia**, v.36, p.1014-1015, 1980.
- JONES, R.N.; REES, H. B chromosomes. **Academic Press**, London, Great Britain, 1982.
- KASAHARA, S. **Introdução à Pesquisa em Citogenética de Vertebrados**. Ribeirão Preto, SP: Editora SBG – Sociedade Brasileira de Genética, 2009.
- KLIGERMAN, A.D.; BLOOM, S.E. Rapid chromosome preparations from solid tissues of fishes. **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, v.34, p.266-269, 1977.
- LEE, M.R.; ELDER, F.F.B. Yeast stimulation of bone marrow mitosis for cytogenetics investigations. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v.52, p 36-40, 1980.
- LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANBERG, A.A. Nomenclatura for centromeric position on chromosome. **Hereditas**, v.52, p. 201-204, 1964.
- LI et al. Tracking chromosome dynamics in live yeast cells: coordinated movement of rDNA homologs and anaphase disassembly of the nucleolus during meiosis. **Chromosome Research**, v.19, p.1013-1026, 2011. DOI: 10.1007/s10577-011-9253-0
- MARTINS, C.; GIULIANO-CAETANO, L.; DIAS, A.L. Occurrence of a B chromosome in *Cyphocharax modesta* (Pisces, Curimatidae). **Cytobios**, v.85, p.247-253, 1996.
- MORAES, V.P.O.; CARNEIRO, J.S.; DIAS, A.L. B chromosomes in four different populations of *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae): a comparative study of frequency and distribution. **Folia biológica**, v.57, n.3-4, 2009.
- MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L.A.C.; GALETTI, P.M.Jr. Structure and variability of nucleolar organizer regions in Parodontidae fish. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, n.5, p.564–568, 1984.

- MORILHA NÉO, D.; MOREIRA FILHO, O.; CAMACHO, J.P.M. Altitudinal variation for B chromosome frequency in the characid fish *Astyanax scabripinnis*. **Heredity**, v.85, p.136-141, 2000.
- NAVARRETE, M.C.; JÚLIO JUNIOR, H.F. Cytogenetic analysis of four curimatids from the Paraguay Basin, Brasil (Pisces: Characiformes, Curimatidae). **Cytologia**, v.62, p.241-247, 1997.
- NETTO-FERREIRA, A.L.; VARI, R.P. New species of Steindachnerina (Characiformes: Curimatidae) from the Rio Tapajós, Brazil, and review of the genus in the Rio Tapajós and Rio Xingu basins. **Copeia**, n.4, p.523-529, 2011.
- OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Occurrence of supernumerary microchromosomes in *Steindachnerina insculpta* (Pisces, Characiformes, Curimatidae). **Cytobios**, v.76, p.183-186, 1993.
- 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.
- OLSON, M.O.J.; DUNDR, M. The moving parts of the nucleolus. **Histochem Cell Biol**, v.123, p. 203-216, 2005. DOI 10.1007/s00418-005-0754-9
- PENDÁS, A.M.; MORÁN, P.; GARCIA-VÁZQUEZ, E. Multi-chromosomal location of ribosomal RNA genes and heterochromatin association in Brown trout. **Chromosome Research**, v.1, p.63-67, 1993.
- PINKEL D.; STRAUME, T.; GRAY, J.W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.83, p.2934-2938, 1986.
- POLETO, A.B.; FERREIRA, I.A.; MARTINS, C. The B chromosomes of the African cichlid fish *Haplochromis obliquidens* harbour 18S rRNA gene copies. **BMC Genetics**, v.11, 2010.
- PORTO, F.E.; PORTELA-CASTRO, A.L.B.; MARTINS-SANTOS, I.C. Possible origins of B chromosomes in *Rinelocaria pentamaculata* (Loriicariidae, Siluriformes) from the Paraná River basin. **Genetics and Molecular Research**, v.9, n.3, p.1654-1659, 2010.
- SALVADOR, L.B.; MOREIRA-FILHO, O. B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Heredity**, v. 69, p.50-56, 1992.
- SALVADORI, S. et al. Colocalization of (TTAGGG)<sub>n</sub> telomeric sequences and ribosomal genes in Atlantic eels. **Chromosome Research**, v.3, p.54-58, 1995.
- SAMPAIO, T.R. et al. B microchromosomes in the family Curimatidae (Characiformes): mitotic and meiotic behavior. **Comparative Cytogenetics**, v.5, n.4, p.301-313, 2011.
- SANTOS, A.R. et al. Sympatric occurrence of four cytotypes and one extra chromosome in *Bryconamericus ecai* (Characidae): 18S rDNA polymorphism and heterochromatin composition. **Hereditas**, v.000, p.001-010, 2012.

- SCHMID, M. et al. Evolutionary conservation of a common pattern of activity of nucleolus organizers during spermatogenesis in vertebrates. **Chromosoma**, v.86, p.149-179, 1982.
- SCHMID, M. et al. Silver staining of nucleolus organizer regions during human spermatogenesis. **Human Genetics**, v.64, p.363-379, 1983.
- SCHWEIZER, D. Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatic regions (DA/DAPI) in human chromosomes. **Cytogenetics and Cell Genetic**, v.27, p.190-193, 1980.
- SEMA/RS. Secretaria do Meio Ambiente do Estado do Rio Grande do Sul. Pró-Mar-de-Dentro. Disponível em: <http://www.sema.rs.gov.br/sema/html/programas.htm#topo>. Acesso em: 08 fev. 2010.
- SHIBATA, O.A. et al. Diversidade e distribuição de peixes na Bacia do Rio Tibagi. In: MEDRI, M. et al. (Ed.). **A Bacia do Rio Tibagi**. Londrina, PR: 2002, p.403-423.
- SILVA, L.L.L.; GIULIANO-CAETANO, L.; DIAS, A.L. Chromosome studies of *Astyanax jacuhiensis* Cope, 1894 (Characidae) from the Tramandai river basin, Brazil, using *in situ* hybridization with the 18S rDNA probe, DAPI and CMA<sub>3</sub> staining. **Folia Biologica**, v.60, n.3-4, 2012.
- SUMNER, A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**, v.75, p.304-306, 1972.
- TERIBELE, R. et al. Karyotypic analysis in two species of fishes of the family Curimatidae: AgNO<sub>3</sub>, CMA<sub>3</sub> and FISH with 18S probe. **Caryologia**, v.67, n.3, p.000-000, 2008.
- TOLDO E.E.Jr. et al. Sedimentação de Longo e Curto Período na Lagoa dos Patos, Sul do Brasil. **Pesquisas em Geociências**, v.33, n.2, p.79-86, 2006.
- VARI, R.P. Two new fish species of genus *Curimata* (Pisces, Curimatidae) from Venezuela. **Acta Biol. Venez.**, v.11, n.4, p.27-43, 1983a.
- VARI, R.P. Phylogenetic relationship of the families Curimatidae, prochilodontidae, Anostomidae and Chilodontidae (Pisces: Characiformes). **Smithsonian Contribution to Zoology**, v.378, p.1-60, 1983b.
- VARI, R.P. A Phylogenetic study of the neotropical characiform family Curimatidae (Pisces: Ostariophysi). **Smithsonian Contribution to Zoology**, v.471, p.1-71, 1989.
- VARI, R.P. Systematics of Neotropical characiform genus *Steindachnerina* Fowler (Pisces, Ostariophysi). **Smithsonian Contribution to Zoology**, v.507, p.1-117, 1991.
- VARI, R.P. Systematics of Neotropical characiform genus *Cyphocharax* Fowler (Pisces, Ostariophysi). **Smithsonian Contribution to Zoology**, v.529, p.1-137, 1992.
- VARI, R.P. Family Curimatidae. In: Reis, R.E.; Kullander, S.O.; Ferraris, J.R.C.J. (eds). **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Porto Alegre, RS: Edipucrs, 2003, p.51-64.

- VENERE, P.C. **Citogenética comparativa de peixes da família Curimatidae (Characiformes)**. 1991. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.
- VENERE, P.C.; GALETTI JUNIOR, P.M. Natural triploidy and chromosome B in the fish *Curimata modesta* (Curimatidae, Characiformes). **Revista Brasileira de Genética**, v.8, p.681-687, 1985.
- VENERE, P.C.; GALETTI JUNIOR, P.M. Chromosome evolution and phylogenetic relationships of some neotropical Characiformes of the family Curimatidae. **Revista Brasileira de Genética**, v.12, p.17-25, 1989.
- VENERE, P.C.; MIYAZAWA, C.S.; GALETTI JUNIOR, P.M. New cases of supernumerary chromosomes in Characiform fishes. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v.22, n.3, set., 1999.
- VENERE et al. Recent chromosome diversification in the evolutionary radiation of the freshwater fish family Curimatidae (Characiformes). **Journal of Fish Biology**, v.72, p.1976-1989, 2008.
- VERMULM JUNIOR, H. et al. Levantamento da pesca profissional continental, no estado de São Paulo, de 1994 a 2000. Dados preliminares III. Bacia do rio Paranapanema. **Série Relatórios Técnicos**, São Paulo, SP, n.10, p.1-11, 2002. Disponível em: <ftp://ftp.sp.gov.br/ftppesca/326%20iii%20bacia%20do%20rio%20paranapanema.pdf>. Acesso em: 21 fev. 2010.
- VISINTIN, R.; AMON, R. The nucleolus: the magician's hat for cell cycle tricks. **Cell Biology**, v.12, p.372-377, 2000.