

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PRO REITORIA DE PESQUISA E PÓS - GRADUAÇÃO  
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA  
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

**Uso de marcadores citogenéticos clássicos para a caracterização de  
tamoatás (*Hoplosternun* spp., Callichthyidae, Siluriformes) de diferentes  
ambientes amazônicos**

BOLSISTA: Marília Batista Azevedo

**MANAUS-AM  
2011**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PRO REITORIA DE PESQUISA E PÓS - GRADUAÇÃO  
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA  
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL  
PIB-B/0008/2010

**Uso de marcadores citogenéticos clássicos para a caracterização de  
tamoatás (*Hoplosternun* spp., Callichthyidae, Siluriformes) de diferentes  
ambientes amazônicos**

Bolsista: Marília Batista Azevedo, CNPq  
Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Maria Claudia Gross, UFAM  
Co-orientadora: Dra. Eliana Feldberg, INPA

**MANAUS-AM  
2011**

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	2
2.1. Indução de mitoses.....	3
2.2. Obtenção de cromossomos mitóticos.....	3
2.3. Detecção das regiões organizadoras de nucléolo – RONS .....	4
2.4. Detecção da heterocromatina constitutiva (Banda C).....	4
2.5. Análise cariotípica .....	5
3. RESULTADOS.....	5
4. DISCUSSÃO .....	8
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	9

### Lista de figuras

**Figura 1:** a) Cariótipo de *Hoplosternun littorale* em coloração convencional com Giemsa; b) Em destaque par cromossômico portador da RON evidenciado com impregnação por Nitrato de Prata; c) Padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva obtida pelo tratamento com Hidróxido de Bário. .... 7

## 1. INTRODUÇÃO

A bacia amazônica é constituída por uma ampla gama de características naturais que contribuem para a inexistência de ambientes idênticos. Somado as variadas condições da natureza, os igarapés urbanos vêm sofrendo alterações em consequência de ações domésticas e industriais, que também contribuem para o estabelecimento do complexo ecossistema aquático amazônico (Santana & Barroncas, 2007). Por razão dessas mudanças bruscas que ambiente aquático vem sofrendo, supõe-se que espécies de peixes que nele habitam adaptaram-se a tais variações e torna-se interessante verificar se é possível notar mudanças na macroestrutura cariotípica de espécies que vivem tanto em ambientes aquáticos antropizados quanto não antropizados, uma vez que as espécies de peixes apresentam uma grande plasticidade genotípica e fenotípica e atualmente admite-se que a variabilidade genômica é o fator que garante uma rápida adaptação dos organismos ao ambiente (Almeida-Val & Farias, 1996).

Ainda, a contaminação dos ambientes através da interferência antrópica resulta em consequências muitas vezes irreversíveis para os organismos que habitam estes ambientes, uma vez que estes poluentes podem constituir um risco devido ao potencial genotóxico, o qual muitas vezes apresenta efeito cumulativo e torna-se cada vez mais danoso quando inserido em uma cadeia alimentar (Ribeiro *et al.*, 2003). Além do potencial mutagênico, as alterações antrópicas em igarapés podem resultar em modificações da comunidade e distribuição das espécies, visto que os organismos estão em interação com o meio. Assim, espécies que são mais sensíveis a tais mudanças podem deixar de ocorrer em determinado ambiente, propiciando que espécies mais resistentes se adaptem ao ambiente degradado (Pascalichio, 2002).

Os peixes *Hoplosternum littorale*, pertencentes à família Callichthyidae, são espécies encontradas em rios, igarapés e áreas de inundação, tanto em ambientes antropizados quanto não antropizados (Santos *et al.*, 2006). Ainda, estes peixes são bastante consumidas pela população ribeirinha, sendo assim considerada uma importante fonte de proteína.

Com relação à composição cariotípica, análises citogenéticas básicas revelaram número diplóide igual a 60 cromossomos, sendo 4 cromossomos metacêntricos, 4 submetacêntricos e 52 subtelo-acrocêntricos e a região organizadora de nucléolo localizada no 7<sup>o</sup> par cromossômico para *H. littorale* (Porto & Feldberg, 1992). Contudo, análises cromossômicas comparativas utilizando bandeamentos diferenciais têm revelado que diferentes populações da mesma espécie podem apresentar uma organização cariotípica diferente, podendo estas variações estar relacionadas com os diferentes habitats (Vicari *et al.*, 2006).

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Os peixes *Hoplosternun littorale* foram coletados nos igarapés do Mindú (15 indivíduos) e do Quarenta (15 indivíduos), que formam as microbacias do São Raimundo e Educandos, respectivamente, apontados recentemente como pontos mais críticos de poluição ambiental em Manaus, AM (Pinto *et al.*, 2009). Ainda, foram coletados 15 indivíduos no lago Catatão (na confluência do rio Negro e Solimões) e 15 indivíduos no Lago da Marchantaria (rio Solimões), uma vez que devido ao grande volume de água estes ambientes não apresentam poluentes químicos detectáveis (Pinto *et al.*, 2009). Estas coletas foram feitas utilizando redes de pesca e rapichés. Os exemplares coletados foram acondicionados em recipientes e encaminhados vivos ao Laboratório de Citogenômica Animal da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), onde foram realizadas as análises (Licenças permanentes do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis: 011/2005 de Eliana Feldberg e 22984-1/ 2010 de Maria Claudia Gross).

Os peixes foram anestesiados com óleo de cravo dissolvido em água e posteriormente sacrificados para a retirada dos tecidos. Estes peixes foram numerados, registrados, fixados em formol 10% por 24h, lavados em água corrente e acondicionados em recipientes contendo álcool 70%, visando seu depósito em Coleção de Peixes).

## 2.1. Indução de mitoses

Para se obter um maior número de células em metáfase, foi utilizada a técnica de indução de mitoses descrita por Oliveira *et al.* (1987), que consiste em preparar uma solução de fermento biológico na seguinte proporção: 0,5 g de fermento, 0,5 g de açúcar e 20 mL de água destilada. Em seguida, esta solução foi incubada em banho-maria ou estufa a 40 °C por cerca de 20 minutos, e posteriormente injetada na região intraperitoneal do animal, na proporção de 1 mL para cada 100 g do peso do animal vivo, os quais foram mantidos em aquários aerados por um período de 24 horas.

## 2.2. Obtenção de cromossomos mitóticos

Após 24 horas da aplicação da solução de fermento, foi injetada, intraperitonealmente uma solução aquosa de colchicina 0,0125% na proporção de 1 mL para cada 100 g de peso do animal vivo, por 45 a 60 minutos (Bertollo *et al.*, 1978). Após esse tempo, os peixes foram anestesiados com benzocaína diluída em água e sacrificados para a retirada da porção anterior do rim, que é o órgão hematopoiético. Este foi lavado em KCl a 0,075M e transferido para outro recipiente de vidro contendo cerca de 10 mL da solução hipotônica e dissociado nesta solução com pinças de dissecação. Foi colocada a suspensão obtida em estufa a 37 °C por 20 a 30 minutos. Posteriormente ressuspenso, cuidadosamente com o auxílio de uma seringa desprovida de agulha e em seguida transferido para um tubo de centrífuga, utilizando-se uma pipeta Pasteur. Foi adicionado 4 gotas de fixador Carnoy 3:1 (metanol: ácido acético), recém preparado e gelado. Centrifugado por 10 minutos a 900 rpm, descartado o sobrenadante. Adicionado com cuidado 8 mL de fixador, ressuspenso novamente cuidadosamente, com o auxílio de uma pipeta Pasteur, e foi repetido este processo por mais duas vezes. Após a última centrifugação e eliminação do sobrenadante, foram adicionados 1,5 mL de fixador e o material ressuspenso com cuidado. Esta suspensão celular foi guardada em tubos eppendorf, mantidos em freezer ou em gelo, para posterior utilização.

Para a preparação das lâminas, as mesmas foram colocadas em solução sulfocrômica por 24 horas. Após este tempo, foram retiradas, lavadas

em água corrente e destilada e armazenadas em álcool 100%. As lâminas foram imersas em água destilada a 45 °C, em banho-maria. Após 5 minutos, as mesmas foram retiradas da água, e a suspensão celular gotejada sobre três pontos diferentes desta lâmina. As lâminas secaram diretamente ao ar. Em seguida, foram coradas com Giemsa 5%, diluído em tampão fosfato 0,06M e pH 6,8, por 15 minutos, lavadas em água destilada e secas ao ar.

### 2.3. Detecção das regiões organizadoras de nucléolo – RONS

Para a detecção das regiões organizadoras de nucléolo (RONS) foi utilizada a técnica descrita por Howell & Black (1980). As lâminas foram preparadas conforme o item 2.2.2. Em seguida, as lâminas foram tratadas em HCl 0,2N, 37 °C, por 10 minutos, lavadas e secas ao ar. Após isso foram pingadas sobre as lâminas 2 a 3 gotas de uma solução coloidal de gelatina (2 g de gelatina comercial sem sabor, dissolvida em 100 mL de água destilada, acrescentando 1mL de ácido fórmico) e adicionadas, sobre cada gota de gelatina, duas gotas de solução aquosa de nitrato de Prata (AgNO<sub>3</sub>) a 50%, agitando-se levemente a lâmina. Esta foi coberta com lamínula e colocada em câmara úmida, em banho-maria a 60 °C, durante 3 a 8 minutos. Após o tempo apropriado, quando a lâmina adquirir uma coloração marrom dourada, foi lavada em água destilada, permitindo que a lamínula fosse retirada naturalmente pela própria água e secas ao ar.

### 2.4. Detecção da heterocromatina constitutiva (Banda C)

Para a detecção da heterocromatina constitutiva (banda C) foi utilizada a técnica descrita por Sumner (1972), que consiste em tratar a lâmina preparada segundo a técnica descrita para cromossomos mitóticos com HCl 0,2N à temperatura ambiente, por 2 minutos. Foi rapidamente em água destilada, à temperatura ambiente. A lâmina foi incubada por 5 segundos em solução de hidróxido de bário a 5%, recém preparada e filtrada a 42 °C. Foi interrompida a ação do hidróxido de bário, imergindo rapidamente a lâmina em solução de HCl

0,2N (temperatura ambiente) e lavada em água destilada. Foi incubada a lâmina em solução 2xSSC (cloreto de sódio 0,3M e citrato trisódico 0,03M, pH 6,8) em banho-maria a 60 °C, por 15 minutos. Foi lavada várias vezes em água destilada e seca ao ar. As lâminas foram coradas com solução de Giemsa (diluída a 5% em tampão fosfato 0,06M e pH 6,8) durante 10 minutos, lavadas em água destilada e seca ao ar.

## 2.5. Análise cariotípica

As lâminas foram analisadas em microscopia ótica e 30 metáfases por indivíduo foram contadas para se determinar o número diplóide. As melhores metáfases tiveram suas imagens capturadas com objetiva de imersão em câmera digital.

Para a montagem dos cariótipos foi utilizado o programa Adobe Photoshop 7.0, versão CS3, onde os cromossomos metafásicos mitóticos foram recortados e emparelhados visualmente. Os cromossomos foram medidos, utilizando o programa livre ImageJ e agrupados de acordo com a sua morfologia e colocados em ordem decrescente de tamanho. A morfologia cromossômica foi determinada de acordo com os critério de relação de braços ( $RB=BM/Bm$ , onde BM = braço maior e Bm = braço menor) segundo Levan *et al.* (1964). Os cromossomos foram separados em metacêntricos (m), que apresentam  $RB=1,00$  a  $1,70$ ; submetacêntricos (sm)  $RB=1,71$  a  $3,00$ ; subtlocêntricos (st)  $RB=3,01$  a  $7,00$ ; e acrocêntricos (a)  $RB$  maior que  $7,00$ . O número fundamental (NF) foi determinado de acordo com o número de braços cromossômicos, considerando-se, os metacêntricos, submetacêntricos e os subtlocêntricos como tendo dois braços e acrocêntricos como tendo apenas um braço.

## 3. RESULTADOS

Número diplóide igual a 60 cromossomos, sendo  $2n=4m+4sm+52a$  foi observado para todos os indivíduos, dos quatro locais amostrados. Ainda, não



foi observado nenhum sistema cromossômico de diferenciação de sexo, ou seja, machos e fêmeas apresentam a mesma composição cariotípica (Figura 1a).

Com relação à região organizadora de nucléolo, estas foram do tipo simples e localizaram-se ao longo do braço curto dos cromossomos do par 7 (cromossomos acrocêntricos grandes) para todos os indivíduos analisados (Figura 1b).

Ainda, a heterocromatina apresentou marcações brandas, sendo possível verificar sua distribuição restrita às regiões centroméricas da maioria das cromossomos e nenhuma deposição diferencial de heterocromatina pode ser observada em indivíduos provenientes dos diferentes ambientes amostrados (Figura 1c).

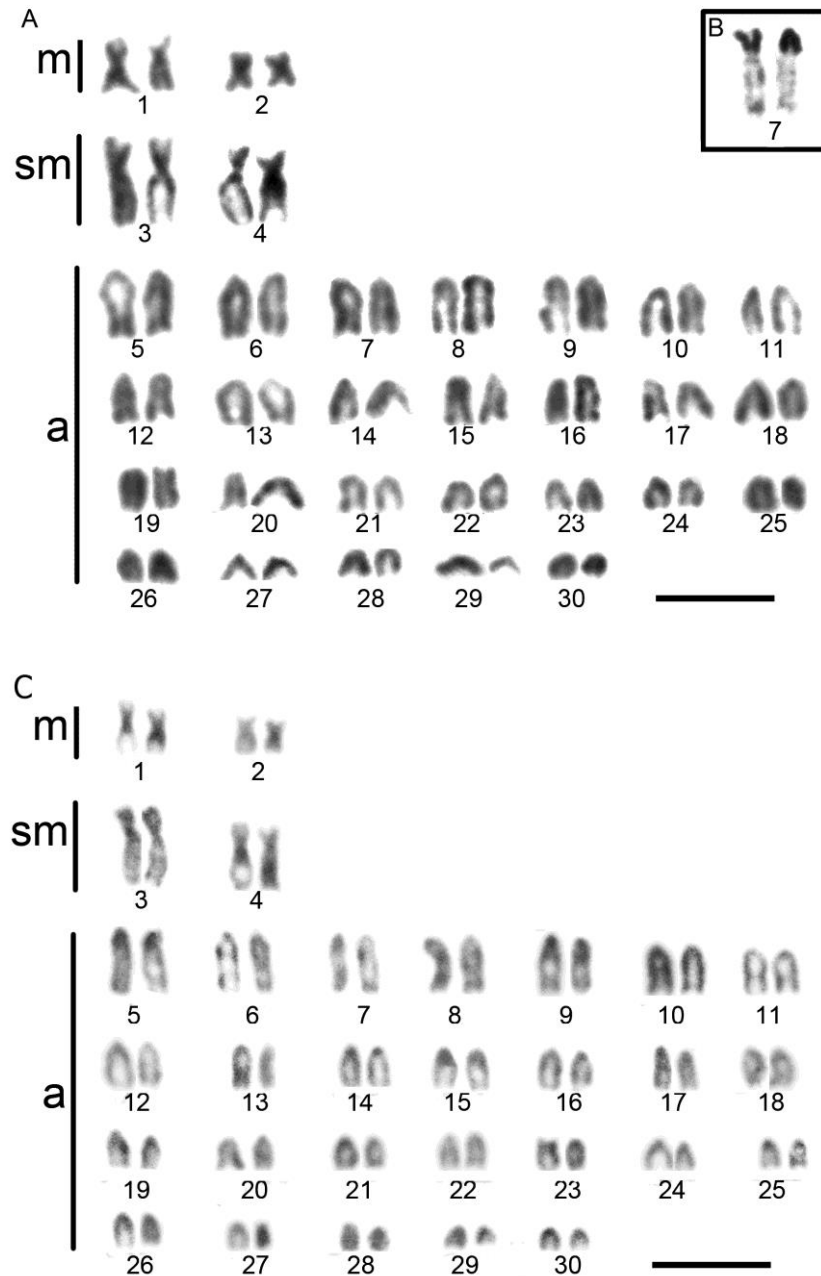


Figura 1: a) Cariótipo de *Hoplosternun littorale* em coloração convencional com Giemsa; b) Em destaque par cromossômico portador da RON evidenciado com impregnação por Nitrato de Prata; c) Padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva obtida pelo tratamento com Hidróxido de Bário.

## 4. DISCUSSÃO

Os peixes do gênero *Hoplosternum* são espécies encontradas em rios, igarapés e áreas de inundação, tanto em ambientes antropizados quanto não antropizados, sendo uma das espécies mais abundantes em igarapés urbanos poluídos e com pouco oxigênio dissolvido na água, provavelmente devido à sua capacidade de respiração aérea. Ainda, dimorfismo sexual secundário podem ser visualizados em indivíduos com comprimento total acima de 9cm de comprimento, os quais já atingiram a maturidade sexual: os espinhos peitorais são maiores, mais robustos e com as pontas curvas nos machos durante o período reprodutivo (Santos *et al.*, 2006). Contudo, dimorfismo cromossômico sexual não foi observado na espécie *Hoplosternun littorale*.

Com relação à composição cariotípica, análises já efetuadas anteriormente revelaram número diplóide igual a 60 cromossomos, sendo 4 cromossomos metacêntricos, 4 submetacêntricos e 52 subtelo-acrocêntricos e a região organizadora de nucléolo localizada no 7<sup>o</sup> par cromossômico para *H. littorale* (Porto & Feldberg, 1992). Assim sendo, o presente estudo corroborou os dados publicados previamente, sendo o mesmo resultado obtido tanto para os indivíduos provenientes tanto do ambiente poluído quanto não poluído, o que indica que os indivíduos da espécie não sofreram grandes mudanças na macroestrutura cariotípica, fato este que é compreensível visto que o aumento dos resíduos químicos em igarapés urbanos deu-se nos últimos 30 anos e evolutivamente este é um período muito curto.

O padrão de distribuição da heterocromatina visto na espécie *H. littorale* é similar ao descrito para a maioria dos Siluriformes, ou seja, blocos heterocromáticos localizados em regiões centroméricas e muitos cromossomos do complemento com ausência de heterocromatina ou presença de blocos pálidos e difusos, sendo difícil detectar a heterocromatina constitutiva devido a características peculiares da cromatina nesses peixes quanto ao grau de condensação (para revisão ver Ribeiro, 2009).

Variações na quantidade e na distribuição da heterocromatina constitutiva têm sido consideradas características importantes na evolução de alguns grupos de peixes e permitido a diferenciação de espécies e de

populações (Andreato *et al.*, 2006; Treco *et al.*, 2008). Essas diferenças são resultantes de mecanismos epigenéticos como remodelamento da cromatina e metilação do DNA, que auxiliam na compactação e organização do genoma. Isso é importante devido ao fato de diversas atividades gênicas serem dependentes do estado de condensação da cromatina, que pode mudar em resposta a sinais celulares e atividade gênica, respondendo inclusive a mudanças ambientais (Grewal & Jia, 2007). Contudo, nenhuma variação no padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva foi evidenciada em indivíduos provenientes dos diferentes ambientes.

Porém, apenas com dados de citogenética clássica não podemos descartar a possibilidade de mudanças sutis na estrutura e organização genômica nos cromossomos terem ocorrido ao longo dos últimos anos, principalmente se considerarmos o aumento da poluição urbana. Vale ressaltar que estudos citogenético-moleculares têm demonstrado que as seqüências de DNA podem ser muito úteis como ferramentas para revelar a organização e evolução do genoma das espécies no complemento cromossômico, sendo as seqüências repetitivas marcadores de grande valor para a citogenética molecular, principalmente por estarem livres de pressão seletiva intensa. Deste modo, análises de citogenética-molecular envolvendo mapeamento de elementos repetitivos serão efetuadas nos mesmo indivíduos analisados neste trabalho .

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida-Val, V.M. F.; Farias, I.P. 1996. Respiration in fish of the Amazon: metabolic adjustments to chronic hypoxia. *In*: Val, A.L.; Almeida-Val, V.M.F.; Randall, D.J. (eds). *Physiology and biochemistry of the fishes of the Amazon*, INPA, Manaus, p. 257-271.
- Andreato, A.A.; Oliveira, C.; Foresti, F. 2006. Karyological characterization of four Neotropical fish species of the genus *Hisonotus* (Teleostei, Loricariidae, Hypoptopomatinae) from distinct Brazilian river basins. *Genetics and Molecular Biology*, 29(1): 62-66.

- Bertollo, L.A.C.; Takahashi, C.S.; Moreira-Filho, O. 1978. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erytrinae). *Revista Brasileira de Genética*, 1: 103-120.
- Grewal S.I.S.; Jia S. 2007. Heterochromatin revised. *Nature Review*, 8: 35-46.
- Howell, W.M.; Black, D.A. 1980. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, 3: 1014-1015.
- Levan, A.; Fredga, K.; Sandberg, A.A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52: 201-220.
- Oliveira, C. 1987. Estudos citogenéticos no gênero “*Corydoras*” (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae). Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. 154 p.
- Pascalichio, A.E. 2002. *Contaminação por metais pesados*. Ed. Annablume, São Paulo. 132pp.
- Pinto, A.G.N.; Horbe, A.M.C.; Silva, M.S.R.; Miranda, A.F.; Pascoalato, D.; Santos, H.M.C. 2009. Efeitos da ação antrópica sobre a hidrogeoquímica do rio Negro na orla de Manaus, AM. *Acta Amazonica*, 39(3): 627-638.
- Porto, J.I.R.; Feldberg, E. 1992. Comparative cytogenetic of the armored catfishes of the genus *Hoplosternun* (Siluriformes, Callichthyidae). *Revista Brasileira de Genética*, 15 (2): 359-367.
- Ribeiro, L.R.; Salvadori, D.M.F.; Marques, E.K. 2003. *Mutagênese ambiental*. Editora da Ulbra .356pp.
- Ribeiro, L.B. 2009. Análise citogenética das espécies do gênero *Hypophthalmus* (Siluriformes, Pimelodidae) da região do Lago Catalão, Amazonas, Brasil. Dissertação de mestrado, INPA, Manaus, 72p.
- Santana, G.P.; Barroncas, P.S.R. 2007. Estudo de metais pesados (Co, Cu, Fe, Cr, Ni, Mn, Pb e Zn) na Bacia do Tarumã-Açu Manaus – (AM). *Acta Amazonica* 37(1): 111-118.
- Santos, G. M; Ferreira, E. J. G; Zuanon, J. A. S. 2006. *Peixes Comerciais de Manaus*. IBAMA 2006 , Manaus. 70pp.
- Sumner, A.T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatic. *Experimental Cell Research*, 75: 304-306.
- Treco, F.R.; Malabarba, L.R.; Giuliano-Caetano, L.; Dias, A.L. 2008. Cytogenetic study of two species of the family Pimelodidae (Siluriformes)

collected in lago Guaíba, Rio Grande do Sul, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 6(1): 87-92.

Vicari, M.R.; Artoni, R.F.; Moreira-Filho, O.; Bertollo, L.A.C. 2006. Basic and molecular cytogenetics in freshwater Cichlidae (Osteichthyes, Perciformes). Karyotypic conservatism and divergence. *Caryologia*, 59 (3): 260-266