

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

**Mapeamento físico cromossômico de elementos repetitivos em peixes  
tamoatás de diferentes tipos de ambientes**

Bolsista: Marília Batista Azevedo, CNPq

MANAUS

2012

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/026/2011

**Mapeamento físico cromossômico de elementos repetitivos em peixes  
tamoatás de diferentes tipos de ambientes**

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

MANAUS  
2012

## RESUMO

Os igarapés da cidade de Manaus, assim como os demais rios de grandes centros urbanos, vêm sofrendo alterações em consequência de ações domésticas e industriais. Algumas espécies de peixes adaptaram-se a tais variações, como os tamoatás (*Hoplosternum littorale*, família Callichthyidae). Estes peixes podem ser encontradas tanto em ambientes antropizados quanto não antropizados, sendo interessante avaliar se existe diferença na organização genômica de indivíduos provenientes destes dois ambientes, uma vez que macro-alterações cariotípicas não são evidentes. Para tanto, os cromossomos foram obtidos a partir de células renais, de tamoatás provenientes dos igarapés São Raimundo e do Educandos (poluídos) e lagos Catalão e Marchantaria (não poluídos) da região de Manaus, AM. Hibridizações fluorescente *in situ* foram realizadas para determinar o número de sítios ribossomais 18S e 5S, bem como o padrão de distribuição do retroelemento Rex 3. Número diplóide igual a 60 cromossomos ( $2n=4m+4sm+52a$ ) e ausência de cromossomos sexuais foi observada para todos os indivíduos de ambos os ambientes, sendo que o sítios ribossomal 18S foi evidenciado nos homólogos do sétimo par, enquanto que o DNAr 5S apresentou-se localizado em ambos os homólogos dos pares 18 e 25 e em apenas um homólogo do par 8. Tanto em tamoatás do ambiente natural quanto dos igarapés urbanos de Manaus, o Rex 3 apresenta-se distribuído de maneira dispersa nos cromossomos, porém nos indivíduos provenientes dos ambientes poluídos estes parecem estar sendo acumulados, com sinais mais evidentes. Com estes dados é possível afirmar que, apesar da macroestrutura cromossômica permanecer estável, a presença de poluição ambiental pode estar atuando na diferenciação da organização do genoma desta espécie.

## Abstract

The freshwaters of Manaus city, as well as others rivers of big urban centers, has been changed because of industrial and domestic actions. Some fish species have adapted in these situations, like tamoatás (*Hoplosternum littorale*, Callichthyidae), that may be found in two types of environments: polluted and non polluted. Thus, is necessary to evaluate if there are differences in karyotype composition between specimens from these polluted and non polluted environments. In this study, metaphase cells of tamoatás, from São Raimundo and Educando stream (polluted) and, Catalão and Marchantaria lakes (non polluted) were analyzed. The chromosomes were obtained from renal cells and stained with Giemsa. Patterns of constitutive chromatin were obtained by action of barium hydroxide and nucleolus organizers regions by silver nitrate impregnation. Fluorescent *in situ* hybridization was performed to determinate 18S and 5S ribosomal sites and pattern distribution of *Rex 3* retroelement. Diploid number of 60 chromosomes ( $2n=4m+4sm+52a$ ) and absent sex chromosomes were observed for all specimens. Nucleolus organizer regions were simple and were located on the seventh pair, which was confirmed by 18S rDNA probe hybridization. The the 5S rDNA is located in both of homologous pairs 18 and 25 and in one same pair 8. In both tamoatás from polluted and non polluted urban freshwaters of Manaus, the retroelement *Rex 3* is dispersed in chromosomes. However in specimens of polluted environment the sites are conspicuous and suggest an accumulation of this element in genome. Despite of chromosome macrostructure has been stable; the mapping of retroelement *Rex 3* indicated that polluted environment may be acting in differentiation of genome organization of *Hoplosternun littorale* .

## Lista de figuras

Figura 1: Células metafásicas de *Hoplosternun littorale* provenientes de ambientes antropizados (a) e não antropizados (b) das proximidades de Manaus. a-c) Retroelemento *Rex 3* (sítios avermelhados) nos cromossomos mitóticos (seta) e núcleos celulares (cabeça de seta) de indivíduos proveniente de igarapé urbano poluído de Manaus (a, c) e de ambiente natural não antropizado (b). d) Localização física cromossômica do DNAr 5S (sítios avermelhados) e do DNAr 18S (sítios avermelhados – cabeça de seta). Barras: 10µm.....6

## Sumário

1. Introdução .....	1
2. Material e Métodos .....	3
3. Resultados .....	6
4. Discussão.....	8
5. Referências.....	9

## **1. Introdução**

### **1.1 Apresentação geral do problema**

Os seres vivos são afetados por substâncias presentes no ambiente. Essas substâncias podem ser classificadas como provenientes de elementos e compostos naturais ou compostos tóxicos que são sintetizados pela indústria. Sob condições naturais, os elementos deslocam-se no ambiente através dos ciclos biogeoquímicos e se tornam disponíveis para a biota. Contudo, os ciclos biogeoquímicos são influenciados pelas atividades humanas, providenciando novas fontes de elementos e, conseqüentemente, alterando disponibilidade desses para a biota (Wood, 1974).

A quantificação destes elementos na natureza é fundamental, porém há uma necessidade em se detectar e avaliar o impacto dos mesmos nos organismos devido ao fato de existirem diferenças na forma de metabolizar os compostos. Desta forma, durante as últimas três décadas, a comunidade científica e agências regulatórias têm tomado consciência dos impactos ambientais sobre a saúde humana e a sustentabilidade dos ecossistemas (Bickham *et al.*, 2000), uma vez que a interferência antrópica pode resultar em conseqüências muitas vezes irreversíveis para os organismos que habitam estes ambientes (Ribeiro *et al.*, 2003).

Todos os organismos vivos estão em interação com o ambiente, de maneira que seu material genético se encontra exposto às alterações que este ambiente sofre. Quando estas alterações são positivas, levam a uma maior adaptação dos organismos ao ambiente, de forma a explorá-los de uma melhor forma, modificando-o também (Minissi & Lombi, 1997; Bombassaro, 2007). Porém, algumas alterações podem ser prejudiciais, uma vez que são capazes de alterar processos vitais e resultam no funcionamento incorreto da maquinaria celular, o que leva à mutagênese devido a multiplicação das células com informações alteradas (Al-Sabti & Metcalfe, 1995; Bombassaro, 2007).

Estes organismos expostos à mutágenos de origem natural ou antrópica, tais como alterações nos níveis de CO<sub>2</sub>, pH, presença de metais pesados e outros produtos químicos, incidência de raios ultra violeta, entre outros, tendem a apresentar alterações cromossômicas ou mudanças a

organização do seu genoma. A detecção destas alterações nos organismos é importante devido ao impacto que podem trazer para as populações, especialmente a humana (Rabelo-Gay *et al.*, 1993).

Como a principal via de contaminação nos seres humanos é através da ingestão de alimentos, principalmente peixe, estes organismos receberam uma atenção especial por serem capazes de metabolizar xenobióticos e poluentes acumulados no meio aquático (De Flora *et al.*, 1993; Grisólia & Cordeiro, 2000). Alguns desses compostos apresentam efeito cumulativo, tornando-se cada vez mais danoso quando inserido em uma cadeia alimentar (Ribeiro *et al.*, 2003).

Contudo, até o momento não existe nenhuma informação acerca de alterações na organização de genoma de espécies de peixes encontrados em diferentes ambientes amazônicos, sendo esta abordagem de fundamental.

## **1.2 Desenvolvimento do problema**

A bacia amazônica é constituída por um complexo sistema de drenagem, o qual é determinado por uma ampla gama de características geológicas, físicas, químicas e biológicas (Junk & Furch, 1983; Sioli, 1984). Com base nestes fatores Sioli (1950) subdividiu as águas amazônicas em "brancas", "pretas" e "claras". As águas brancas apresentam-se turvas, com coloração barrenta e baixa transparência, sendo rica em sais minerais, pH entre 6,5 e 7 e condutividade alta. As águas pretas apresentam grande concentração de ácidos húmicos e fúlvicos que se originam da decomposição incompleta de matéria orgânica das florestas que circundam os rios, sendo que a água apresenta pH entre 3,0 e 5,0, ausência de cálcio/magnésio e a pobreza de sais minerais. As águas claras apresentam maior transparência, com pH variando entre 4,5 e 7,0 e sua condutividade é relativamente baixa (Sioli, 1984, Furch, 1984). Além das características fisicoquímicas naturais, ações antrópicas (domésticas e industriais) vêm alterando o ambiente dos igarapés que ocorrem nos grandes centros urbanos, contribuindo também para o estabelecimento do complexo ecossistema aquático amazônico (Santana & Barroncas, 2007).



Em vista desta heterogeneidade de ambientes aquáticos amazônicos, supõe-se que espécies de peixes que nele habitam adaptaram-se a tais variações. Assim, espécies de peixes desenvolveram durante o processo evolutivo 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). Os peixes do gênero *Hoplosternum*, pertencentes à família Callichthyidae, são espécies encontradas em rios de águas brancas, igarapés e áreas de inundação, tanto em ambientes antropizados quanto não antropizados (Santos *et al.*, 2006). Com relação à macroestrutura cariotípica, *H. littorale* de ambientes antropizados e não antropizados de Manaus apresentam número diplóide igual a 60 cromossomos ( $2n= 4$  metacêntricos, 4 submetacêntricos, 52 subteloacrocêntricos), marcações tênues de heterocromatina na região centromérica da maioria dos cromossomos e região organizadora de nucléolo localizada no 7<sup>o</sup> par (Porto & Feldberg, 1992; Azevedo *et al.*, 2011), não sendo observadas alterações cromossômicas entre os indivíduos dos dois ambientes. Contudo, técnicas citogenéticas mais sensíveis, como a identificação de seqüências específicas de DNA nos cromossomos através de sondas, tendem a revelar polimorfismos intra e interespecíficos não detectados por ferramentas da citogenética clássica. Desta forma, este trabalho visou caracterizar as populações de *H. littorale* que ocorrem em diferentes ambientes, antropizados e não antropizados, por meio do mapeamento de seqüências de DNA repetitivo, visando compreender como estes elementos se comportam nos diferentes ambientes.

## **2. Material e Métodos**

Foram analisadas preparações cromossômicas de *Hoplosternun litoralle* disponíveis no Laboratório de Citogenômica Animal (UFAM). Estes peixes são provenientes do rio Amazonas – PA (água branca), do lago Catalão (mistura de água branca e preta), ilha da Marchantaria (água branca) e nos igarapés urbanos poluídos do Mindú e do Quarenta, 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). Foram analisados citogeneticamente 6 indivíduos de cada ambiente (3 ♂ e 3 ♀ de cada espécie). Para extração do DNA foi utilizado o protocolo de fenol-clorofórmio descrito por Sambrook & Russell, 2001, no qual um fragmento de tecido muscular foi macerado e transferido para um tubo de 1.5 ml, posteriormente adicionado tampão de lise e em seguida proteinase K e RNase. As amostras foram incubadas a 60 °C por aproximadamente 2 horas para que o tecido fosse totalmente digerido. Posteriormente foram feitas lavagens sucessivas com fenol, fenol clorofórmio, álcool isoamílico e clorofórmio hidratado. Após a lise, o DNA foi separado das proteínas por precipitação salina juntamente com centrifugação. O sobrenadante foi então precipitado com isopropanol. Ao final, o DNA foi hidratado em água milli-Q e estocado em freezer -20 C.

O elemento transponível Rex3 foi amplificado via PCR utilizando os primers RTX3-F3 (5'CGG TGA YAA AGG GCA GCC CTG) e RTX3-R3 (5'TGG CAG ACN GGG GTG GTG GT) (Volf *et al.*, 1999, 2000, 2001a). Para amplificação do DNA ribossomal 5S foram utilizados os primers DNAr 5SA (5'-TACGCCCGATCTCGTCCGATC-3') e 5SB (5'-CAGGCTGGTATGGCCGTAAGC-3') (Komiya & Takemura, 1979) e para o DNA ribossomal 18S os primers IpF (5'CCGCTTTGGTGACTCTTGAT) e IpR (5'CCGAGGACCTCACTAAACCA) (Gross *et al.*, 2010).

Após a amplificação os fragmentos foram marcados com biotina-14-dATP ([Biotin](#) Nick Translation mix; Invitrogen) e digoxigenina-11-dUTP (DigNick Translation mix; Roche) por meio da reação de *nick translation* seguindo as recomendações do fabricante, e utilizados como sonda na técnica de Hibridação Fluorescente *in situ* (FISH) (Pinkel *et al.*, 1986). Nesta técnica as laminas foram lavadas em tampão PBS 1x por 5 minutos em temperatura ambiente e desidratadas em série alcoólica gelada (70%, 85% e 100%) durante 5 minutos cada. Em seguida foram tratadas com 90 µl de RNase 10 µg/mL por 1 hora em câmara úmida a 37 °C. As lâminas foram lavadas três vezes em 2xSSC durante 5 minutos cada e posteriormente lavadas em PBS 1x durante 5 minutos. Após isso foi realizada a fixação em formaldeído 1% em PBS 1X/50mM MgCl<sub>2</sub> durante 10 minutos à temperatura ambiente e lavagem em PBS 1x por 5 minutos. Após a desidratação alcoólica gelada (70%, 85% e

100%) durante 5 minutos cada, as lâminas foram secas ao ar. Posteriormente foram desnaturadas em formamida 70% em 2xSSC a 70 °C por 5 minutos e novamente desidratadas em etanol gelado 70%, 85% e 100% por 5 minutos cada. Deixou-se secar ao ar. Para a realização da solução de hibridização em um tubo eppendorf, foram adicionados 6 µl de sonda, 15 µl de formamida, 6 µl de sulfato de dextrano 50% e 3 µl de 20xSSC. A sonda foi desnaturada a 99 °C por 10 minutos e passada imediatamente ao gelo. Após isso foi realizado o processo de hibridização onde foram colocados 30 µl de solução de hibridização sobre uma lamínula e a lâmina foi invertida sobre a lamínula. As lâminas foram mantidas com o material voltado para baixo em câmara úmida (H<sub>2</sub>O destilada) a 37 °C por cerca de 14 horas. Posteriormente as 14h ocorreu a lavagens onde as lamínulas foram removidas das lâminas. Em seguida foram lavadas em 2xSSC a 72 °C por 5 minutos. Após, foram transferidas para solução de PBD 1x (leite em pó desnatado; Triton X-100; 20xSSC; diluído em água destilada ajustando para pH 7,0) a temperatura ambiente. Para detecção das sondas foram adicionados sobre cada lâmina 30 µL dos anticorpos FITC-Avidina conjugada (Sigma; [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)) em tampão C (0,1 M Bicarbonato de Sódio) e anti-digoxigenina rodamina (Roche). Posteriormente foram cobertas com lamínula e deixadas por 30 minutos em câmara úmida com água destilada. Em seguida as lamínulas foram removidas e as lâminas foram lavadas três vezes em solução de PBD 1x recém preparado a 45 °C por 2 minutos cada. Após isso as lâminas foram desidratadas em série alcoólica gelada (70%, 85% e 100%) e secas ao ar. Os cromossomos foram contra-corados com DAPI (2µg/ml) diluído em *antifade* (Vector).

As metáfases foram analisadas em microscópio de epifluorescência Olympus BX51, capturadas com câmera digital (Olympus DP71) através do *software* Image-Pro MC 6.3 e processadas no programa Adobe Photoshop CS3. Os cromossomos foram medidos, emparelhados e organizados em ordem decrescente, obedecendo a razão de braços proposta por Levan *et al.* (1964).

### 3. Resultados

Tanto em tamoatás do ambiente natural quanto dos igarapés urbanos de Manaus, o elemento transponível Rex 3 apresentou distribuição dispersa na maioria dos cromossomos (Figura 1 a - c), porém nos indivíduos provenientes dos ambientes poluídos apresentou sinais mais evidentes em alguns cromossomos, tais como os dos grupos meta-submetacêntricos (Figura 1a,c). Este aumento de elementos repetitivos Rex 3 pode confirmado pela hibridização destas sequências em núcleos interfásicos, sendo que os indivíduos provenientes de ambientes poluídos apresentam maior número de marcações nucleares e sinais mais evidentes (Fig 1a, cabeça de seta), se comparado com os indivíduos provenientes de ambientes considerados não poluídos (fig 1b, cabeça de seta).

Quanto aos DNAs ribossomais, não houve diferença de localização física cromossômica destes entre os indivíduos de ambientes antropizados e não antropizados de Manaus e tampouco sintonia entre os sítios DNAr 18S e DNAr 5S. O DNAr 18S apresentou-se localizado na região terminal do braço curto de ambos os homólogos do sétimo par do complemento, enquanto DNAr 5S foi evidenciado na região terminal do braço curto de ambos os homólogos dos pares 18 e 25, bem como em apenas um dos homólogos do par 8 (Figura 1d).

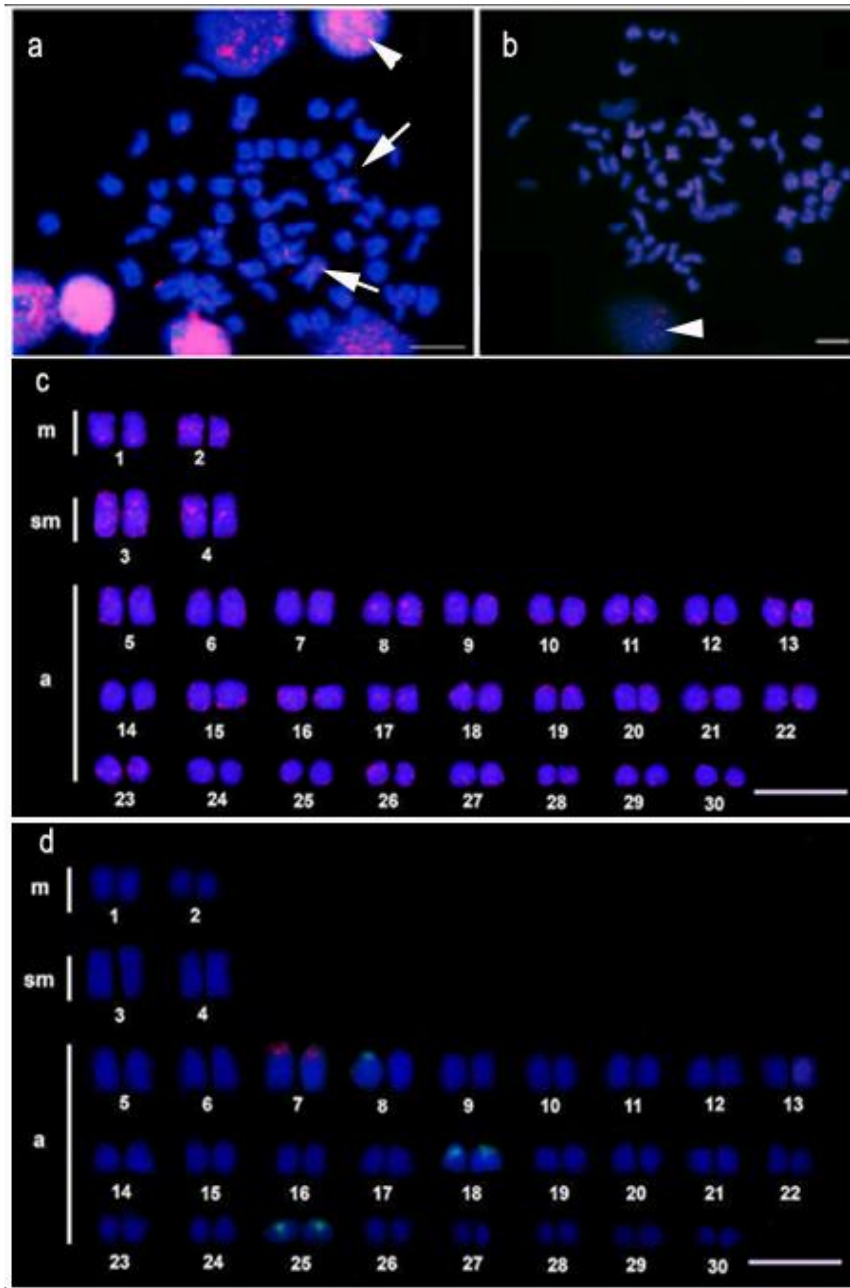


Figura 1: Células metafásicas de *Hoplosternun littorale* provenientes de ambientes antropizados (a) e não antropizados (b) das proximidades de Manaus. a-c) Retroelemento *Rex* 3 (sítios avermelhados) nos cromossomos mitóticos (seta) e núcleos celulares (cabeça de seta) de indivíduos proveniente de igarapé urbano poluído de Manaus (a, c) e de ambiente natural não antropizado (b). d) Localização física cromossômica do DNAr 5S (sítios avermelhados – cabeça de seta) e do DNAr 18S (sítios avermelhados – seta). Barras: 10μm.

#### 4. Discussão

Poucas são as espécies que possuem capacidade de sobreviver tanto em ambientes antropizados quanto não antropizados e os peixes do gênero *Hoplosternum* estão entre estes, sendo capazes de viver com pouco oxigênio dissolvido na água, provavelmente devido à sua capacidade de respiração aérea (Santos *et al.*, 2006). Acredita-se que a variabilidade genômica é o fator que garante a adaptação dos organismos ao ambiente (Almeida-Val & Farias, 1996) e que a maior parte desta variabilidade estaria alocada em regiões de DNA repetitivo, que estariam livre da pressão seletiva (Ridley, 2006). Dentre estas sequências repetitivas destacam-se os DNAs ribossomais e os retroelementos, que para a maior parte dos peixes estão alocados em regiões heterocromáticas, a qual auxilia na regulação da expressão destas sequências (Martins, 2007; Gross *et al.*, 2010a; Gross *et al.*, 2010b). Contudo, as regiões heterocromáticas dos tamoatás restringem-se às porções centroméricas de alguns pares cromossômicos (Azevedo, 2011), não havendo relação entre a localização dos elementos repetitivos e regiões heterocromáticas, o que sugere a presença de outros mecanismos de regulação gênica destas porções do genoma.

Com relação aos DNAs ribossomais, não houve localização física cromossômica diferencial entre os tamoatás provenientes de ambientes antropizados e não antropizados e tampouco sintonia dos sítios DNAr 18S e 5S. Condição esta considerada comum em peixes, uma vez que estes genes são transcritos por diferentes RNA polimerases (Martins, 2007). Os genes ribossomais 18S foram mapeados em ambos os homólogos do 7<sup>o</sup> par, corroborando os dados obtidos por impregnação por nitrato de prata. Contudo, sítios de DNAr 5S foram evidenciados em região terminal de ambos os homólogos dos 18 e 25 e mais um sítio adicional em apenas um homólogo do par 8. Esta variação pode ser oriunda de mecanismos como “crossing-over” desigual, transposições ou outros rearranjos incluindo deleções e/ou duplicações, freqüentemente atribuídos a mecanismos de modificações estruturais dos DNAs ribossomais (Carvalho *et al.*, 2004; Ribeiro *et al.*, 2008).

Apesar da aparente estabilidade cariotípica observada tanto pelas técnicas clássicas (Azevedo, 2011) quanto pelo mapeamento de genes ribossomais, localização física cromossômica do retroelemento *Rex 3* em tamoatás (*Hoplosternun littorale*) revelou uma organização genômica diferencial entre os indivíduos dos ambientes poluídos e não poluídos, sendo estes mais abundantes e compartimentalizados nas populações afetadas pela ação antrópica. Este acúmulo de retroelementos *Rex 3* pode estar relacionada à natureza destas sequências, uma vez que pertencem a classe de elementos transponíveis, os quais são diferentes de outras sequências do genoma por terem um maquinaria de replicação própria, que lhes confere capacidade de se duplicar e se integrar a novas localizações do genoma, silenciando ou ativando genes (Volf *et al.*, 1999). A abundância de elementos *Rex 3* em indivíduos de ambientes poluídos indicam que os poluentes podem estar favorecendo uma duplicação de elementos transponíveis *Rex 3*, entretanto este processo parece não interferir no de replicação do DNA total e tampouco nas divisões celulares dos tamoatás, uma vez que a análise de micronúcleos não revelou diferenças significativas entre os dois ambientes ( $p=0,304$ ) (Araújo, 2011).

Assim, fica evidente que os *Hoplosternun littorale* de ambientes antropizados e não antropizados de Manaus e seus arredores não sofreram grandes mudanças na macroestrutura cariotípica (Azevedo, 2011), contudo esta espécie já vem respondendo à mudanças ambientes em nível de organização do genoma se consideradas as regiões genômicas que estão livres de pressão seletiva intensa, tais como as sequências repetitivas de DNA. Estes dados indicam uma diferenciação entre as populações desta espécie, sendo esta ocasionada por atividades antrópicas.

## 5. Referências

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.

- Al-Sabti, K. ; Metcalfe, C.D. 1995. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Research*, 343: 121-135.
- Azevedo, M.B. 2011. Uso de marcadores citogenéticos clássicos para a caracterização de tamoatás (*Hoplosternun* spp., Callichthyidae, Siluriformes) de diferentes ambientes amazônicos. *Relatório final de PIBIC 2010-2011*. UFAM/CNPq. 18p.
- Araújo-Silva, F. 2011. Análise de micronúcleos do *Hoplosternum littorale* de ambientes aquáticos antropizados e não antropizados de Manaus, AM. *Relatório final de PIBIC*. UFAM/CNPq. 21p.
- Bickham, J.W.; Sandhu, S.; Hebert, P.D.N.; Chikhi, L.; Athwal, R. 2000. Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology. *Mutation Research*, 463: 33-51.
- Bombassaro, J. U. 2007. *Análise genotóxica do complexo fosfatase ácida púrpura símile FeCuOHH<sub>2</sub>BPBPMP em leucócitos totais e sangue total humano*. Trabalho de conclusão de curso - Curso de Medicina da Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC. Criciúma. 51p.
- Carvalho, R.A.; Giuliano–Caetano, L.; Dias, A.L. 2004. Cytogenetic analysis of A- and B- chromosomes of *Iheringichthys labrosus* from Tibagi River, Paraná, Brazil. *Cytologia*, 60(4): 381-385.
- De Flora, S.; Vigário, I.; D’agostini, E.; Camoirano, A.; Bagnasco, M.; Bennicelli, C.; Melodia, F.; Arillo, A. 1993. Multiple genotoxicity biomarkers in fish exposed in situ to polluted river water. *Mutation Research*, 319: 167-177.
- Furch, K. 1984. Water chemistry of the Amazon Basin: the distribution of chemical elements among freshwaters. In: Sioli, H. (ed.). *The Amazon Limnology and landscape ecology of a mighty tropical river and its basin*. Junk, Dordrecht: p. 167-169.
- Grisolia, C.K.; Cordeiro, C.M.T. 2000. Variability in micronucleus induction with different mutagens applied to several species of fish. *Genetics and Molecular Biology*, 23 (1): 235-239.
- Gross, M.C.; Schneider, C.H.; Valente, G.; Porto, J.I.R.; Martins, C.; Feldberg, E. 2010a. Comparative cytogenetic analysis of the genus *Symphysodon* (Discus Fishes, Cichlidae): chromosomal characteristics of retrotransposons and minor ribosomal DNA. *Cytogenetics and Genome Research*, (1): 1-11.



- Gross, M.C.; Schneider, C.H.; Valente, G.T.; Martins, C.; Feldberg, E. 2010b. Variability of 18S rDNA locus among *Symphysodon* fishes: chromosomal rearrangements. *Journal of Fish Biology* (76): 1117-1127.
- Junk, W.J.; Furch K. 1993. A general review of tropical South American floodplains. *Wetlands Ecology and Management*, 4: 231-238.
- Levan, A.; Fredga, K.; Sandberg, A.A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52: 201-220.
- Martins, C. 2007. Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome. In: Pisano, E.; Ozouf-Costaz, C.; Foresti, F.; Kapoor, B.G. (eds). *Fish Cytogenetics*. Enfield, New Hampshire, USA, Science Publisher, Inc., p. 421-453.
- Minissi, S.; Lombi, E. 1997. Heavy metal content and mutagenic activity, evaluated by *Vicia faba* micronucleus test, of Tiber river sediments. *Mutation Research*, 39: 317–321.
- Pinkel, D.; Straume, T.; Gray, J.W. 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the Natural Academy of Science*, 83: 2934-2938.
- 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.
- Rabello-Gay, M. N.; Rodrigues, M. A. R.; Monteleone-Neto, R. 1993. *Mutagênese Teratogênese e Carcinogênese: métodos e critérios de avaliação*. Ribeirão Preto, Revista Brasileira de Genética. 241p.
- Ribeiro, L.B; Matoso, D.A.; Almeida, M.C; Vicari, M.R.; Moraes-Neto, A.; Svidinicki, M.C.C.M.; Artoni, R.F. 2008. Karyotypic variability in *Iheringichthys labrosus* (Teleostei, Pimelodidae) from the Tibagi River basin (Paraná State, Brazil). *Genetics and Molecular Research*, 7 (3): 718-724.
- Ribeiro, L.R.; Salvadori, D.M.F.; Marques, E.K. 2003. *Mutagênese ambiental*. Editora da Ulbra .356pp.
- Ridley, M. 2006. *Evolução*. 3 ed. Artmed, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. 752pp.

- Sambrook, J.; Russell, D.W. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Vol. I. Cold Spring Harbor Press. Cold Spring Harbor. NY.
- 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.
- Sioli, H. 1950. Das Wasser im Amazonasgebiet. Forsch. Fortschr. *In: Lowe-McConnel, R.H. (Ed.) Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais*. São Paulo, EDUSP, p. 345-373.
- Sioli, H. 1984. The Amazon and its main effluents: Hydrography, morphology of the river courses, and river types. *In: Sioli, H. (Ed). The Amazon: limnology and landscape ecology of a mighty tropical river and its basin*. Netherlands, W. Junk Publications, p. 127-166.
- Volff, J.N.; Korting, C.; Sweeney, K.; Scharl, M. 1999. The non-LTR retrotransposon *Rex3* from the fish *Xiphophorus* is widespread among teleosts. *Molecular Biology and Evolution*, 16: 1427–1438.
- Volff, J.N., Korting, C., Scharl, M. 2000. Multiple lineages of the non-LTR retrotransposon *Rex1* with varying success in invading fish genomes. *Molecular Biology and Evolution* 17: 1673–1684.
- Wood, J.M. 1974. Biological cycles for toxic elements in the environment. *Science*, 183: 1049-1052.