

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DIVERSIDADE BIOLÓGICA

**MAPEAMENTO FÍSICO DE SEQUÊNCIAS REPETITIVAS DE DNA EM
CROMOSSOMOS MITÓTICOS E MICRÔNÚCLEOS DE *Hoplosternum littorale*
(CALLICHTHYIDAE, SILURIFORMES) PROVENIENTES DE AMBIENTES
ANTROPIZADOS E NÃO ANTROPIZADOS DE MANAUS, AM**

FRANCIJARA ARAÚJO DA SILVA

Manaus – Amazonas

Maio, 2015

FRANCIJARA ARAÚJO DA SILVA

**MAPEAMENTO FÍSICO DE SEQUÊNCIAS REPETITIVAS DE DNA EM
CROMOSSOMOS MITÓTICOS E MICRÔNÚCLEOS DE *Hoplosternum littorale*
(CALLICHTHYIDAE, SILURIFORMES) PROVENIENTES DE AMBIENTES
ANTROPIZADOS E NÃO ANTROPIZADOS DE MANAUS, AM**

ORIENTADORA: Dra. Maria Claudia Gross - UFAM

COORIENTADOR: Dr. Carlos Henrique Schneider - UFAM

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade Amazônica.

Manaus – Amazonas

Maio, 2015

Ficha catalográfica

S586m Silva, Francijara Araújo da
Mapeamento físico de sequências repetitivas de DNA em cromossomos mitóticos e micronúcleos de *Hoplosternum littorale* (Callichthyidae, Siluriformes) provenientes de ambientes antropizados e não antropizados de Manaus, AM / Francijara Araújo da Silva. 2015
76 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Maria Claudia Gross
Coorientadora: Carlos Henrique Schneider
Dissertação (Mestrado em Diversidade Biológica) - Universidade Federal do Amazonas.

1. DNA repetitivo. 2. tamoatá. 3. poluição. 4. Amazônia. I. Gross, Maria Claudia II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

Sinopse:

O mapeamento de sequências repetitivas de DNA em cromossomos mitóticos e em micronúcleos de *Hoplosternum littorale* tanto de ambiente poluído quanto de ambiente não poluído, assim como a avaliação genotóxica destes ambientes, revelou que o ambiente está promovendo uma organização diferencial no genoma desta espécie, onde diferentes porções estão sendo perdidas na formação dos micronúcleos.

Palavras - chave: DNA repetitivo, tamoatá, poluição, Amazônia

*Dedico esta dissertação à minha família,
mas em especial ao meu avô (in memoriam) por não
estar presente neste momento tão importante de
minha vida.*

*Que a cada passo que eu der, não me falte foco,
força e nem fé!*

(Autor desconhecido)

*Toda ação da nossa vida toca alguma corda que
vibrará na eternidade.*

(E. H. Chapin)

A realização deste projeto foi possível devido:

Ao Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

Ao Laboratório de Citogenômica Animal (LACA) e ao Laboratório de Genética Animal do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).

Ao Laboratório de Citogenética e Evolução, da Universidade Estadual de Ponta Grossa – Ponta Grossa, PR, onde análises complementares de microdissecção dos micronúcleos foram realizadas.

Aos financiamentos proporcionados pelo projeto Identificação e mapeamento físico cromossômico de sequências de DNA obtidas de micronúcleos de peixes submetidos a diferentes condições de estresse – FAPEAM (Edital PPP 10/2011); Avaliação da genotoxicidade de ambientes aquáticos urbanos antropizados em Manaus, AM utilizando tamoatá como modelo – CNPq (processo 476292/2013-1); Genômica comparativa de peixes amazônicos frente a diferentes desafios ambientais – FAPEAM (PRONEX/FAPEAM/CNPQ 003/2009); Centre for Studies of Adaptation to Environmental Changes in the Amazon (INCT ADAPTA,FAPEAM/CNPq 573976/ 2008-2); Estudos citogenéticos e citogenômicos da biodiversidade da Amazônia, com implementação de avanços técnicos (CAPES 23038.009447/2013-45, número do auxílio 3295/2013).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Amazonas (FAPEAM) pela concessão da bolsa de estudo durante a realização deste trabalho.

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, por estar realizando mais uma etapa de minha vida, sem ele nada seria possível. Obrigada Senhor pela força nos momentos mais difíceis que passei para chegar até aqui.

De modo geral, agradeço a TODOS que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho.

Agradeço a toda minha família, que representa meu porto seguro e minha principal motivação. Mas, em especial, agradeço aos meus pais Joana e Francisco pelo esforço que fizeram e continuam fazendo para que eu pudesse chegar até aqui. Serei eternamente grata e espero retribuir todo este amor incondicional da melhor forma possível. Agradeço aos meus irmãos Jussara, Júnior e Flávio e lógico, a minha vizinha Antônia pelos incentivos e força durante esta longa caminhada e pelos momentos de descontrações. Também não poderia deixar de agradecer as minhas “filhas” Lyla e Pipoquinha, que sempre nos enche de amor e alegria todos os dias. Amo todos vocês!

À minha orientadora Dra. Maria Claudia Gross, a quem admiro muito. Obrigada pelos ensinamentos, conselhos, apoio, críticas, incentivo, confiança e amizade. Obrigada por ter me acolhido em seu laboratório e por solucionar todos os problemas na hora do desespero, com toda sua paciência e calma de sempre, além disso, por ter sido o pontapé inicial para que eu pudesse chegar até aqui e por nunca me deixar desistir. Obrigada por me proporcionar experiências incríveis tanto fora quanto dentro do LACA. Tenho um imenso orgulho de tê-la como minha orientadora.

Ao meu coorientador Dr. Carlos Henrique Schneider, pela ajuda e pelos ensinamentos durante os trabalhos de bancada laboratorial. Obrigada pelas discussões, críticas, sugestões e pela sua paciência. Também pelos momentos de descontrações e risadas durante o trabalho.

À Dra. Eliana Feldberg pelo seu apoio, atenção, confiança e por permitir as análises microscópicas de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) em seu laboratório.

Ao professor Dr. Fabricio Beggiato Baccaro, pela sua grande ajuda nas análises estatísticas do trabalho. Obrigada pelos esclarecimentos quanto à escolha do melhor teste a ser utilizado e pela sua gentileza e paciência em nos ajudar.

À família LACA: Camila Borges, Marília Batista, Natália Carvalho, Rafael Ferreira, Thais Lemos, Ana Carolina, Jennifer Ferreira “agregada”, Renan Gabriel, Karoline Costa,

Karolyne Lins, Mariah Normando, José Paulo, Erika Milena, Vanessa Pinheiro, Vanessa Sales, Dayane Serfaty, Patrick Viana, Jéssica Nery, Sabrina Araújo, Júlia do Carmo, Rafaela Ota, Leonardo Goll, Ramon Favarato, Édika Sabrina, Phamela Barbosa e a polaquinha Alice. Obrigada por todos os momentos vividos com cada um, pelos bate-papos (científicos ou não), pelas brigas, ajuda, coletas, brincadeiras, passeios e pelas festinhas fora e dentro do laboratório. Fico feliz por ter convivido com cada geração do LACA e que venham as próximas.

A todos os alunos do Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica, onde tive a oportunidade de conhecê-los. Obrigada pelos momentos de desespero durante as disciplinas, prévias de qualificação, viagens e pelas festinhas. Agradeço também ao MSc. Elciomar Araújo pela confecção do mapa e ao mestrando Leandro Marajó por toda ajuda fornecida no Laboratório de Genética Animal do INPA.

A toda equipe do Laboratório de Citogenética e Evolução da UEPG, pela grande receptividade e ajuda durante as três semanas convivas. Obrigada em especial aos professores Dr. Roberto Artoni e ao Dr. Marcelo Vicari pelo acolhimento, atenção, experiência, ajuda e ensinamentos no laboratório. Também, as doutorandas Patrícia Barbosa e Marcela Baer e aos mestrados Luiz Oliveira e Eliza Viola, pelo acompanhamento e pela grande ajuda no trabalho de bancada laboratorial durante este período.

A todos os meus amigos que me proporcionaram momentos incríveis e que sempre estiveram do meu lado nos momentos mais difíceis. Em especial, a Sandra Hernandez, Janaína Brasil, Wagner Mateus, Natália Carvalho, Paula Mayara, João Souza, Messias Pontes, Iracema Andrade, Madoka Ito, Isabel Silva e Priscila Azarak pelas palavras de conforto, conselhos, apoio e pela ajuda tanto dentro quanto fora do laboratório. Amo vocês.

Não poderia deixar de agradecer a Dra. Gracimar Pacheco, a famosa professora Gal, atualmente Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica. Obrigada por estar sempre disposta a revolver todos os problemas dos alunos do curso. Sem a sua ajuda, com certeza tudo seria mais difícil.

Enfim, agradeço todas as pessoas que fazem, fizeram e as que continuam fazendo parte da minha vida, podem ter certeza que de alguma forma vocês contribuíram para essa grande conquista.

Obrigada!

Resumo

Diversos estudos demonstram que processos adaptativos estão relacionados com a variabilidade genética encontrada em regiões de DNAs repetitivos, e que esta porção genômica seja a grande responsável pela adaptabilidade de peixes amazônicos nos diversos ambientes aquáticos, tanto naturais quanto antropizados. *Hoplosternum littorale*, conhecido como tamoatá é encontrado em rios, igarapés e áreas de inundação, tanto em ambiente poluído quanto não poluído, mostrando grande capacidade de adaptação. Assim, o objetivo do trabalho foi mapear sequências repetitivas de DNA em cromossomos mitóticos e em micronúcleos, bem como os bandeamentos diferenciais e a avaliar a possível ação genotóxica destes ambientes. Setenta e dois indivíduos foram coletados para análise de micronúcleos, sendo 16 do lago Catalão e 16 do lago da Marchantaria, sendo estes ambientes escolhidos por apresentar um grande volume de água, o que contribui para não apresentar poluentes químicos detectáveis. Ainda, 25 no igarapé do Mindu e 15 no igarapé do Quarenta apontados como pontos mais críticos de poluição ambiental em Manaus, AM. Foram analisados citogeneticamente 40 exemplares ao total, sendo amostrados cinco machos e cinco fêmeas de cada localidade. Os cromossomos mitóticos foram obtidos a partir de células renais, a detecção de heterocromatina pela ação do hidróxido de bário e as regiões organizadoras de nucléolo (RONs) por meio da impregnação com nitrato de prata. A técnica de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) foi efetuada utilizando sondas de DNAr 18S, DNAr 5S, *Rex 3* e sequências teloméricas. Tanto para os exemplares de ambiente poluído quanto não poluído o número diploide foi de $2n = 60$ cromossomos ($4m + 4sm + 52a$). RON simples foram localizadas nos braços curtos do par 5, coincidentes com sítios de DNAr 18S. Já os sítios de DNAr 5S foram localizados na região pericentromérica dos pares 23 e 27, com uma quinta marcação adicional evidenciada na região intersticial de um dos homólogos do par 8 para indivíduos de ambiente não poluído. Sítios teloméricos intersticiais não foram evidenciados. Quanto à heterocromatina, foram encontradas marcações na região centromérica, pericentromérica e terminal dos cromossomos, com blocos mais conspícuos em indivíduos do ambiente poluído. O retroelemento *Rex 3* apresentou-se disperso nos cromossomos dos indivíduos de ambiente não poluído e compartimentalizado nos indivíduos de ambiente poluído. O teste do micronúcleo não revelou diferenças significativas nas comparações par a par entre os ambientes e entre os locais de coleta. O mapeamento de sequências repetitivas de DNA revelou que os micronúcleos possuem composição diferencial, intra e interindividualmente. Estes dados indicam que o ambiente está promovendo uma organização

diferencial do genoma, onde diferentes porções são perdidas na formação de micronúcleos e não há uma única região frágil que sofre quebras, apesar de elementos repetitivos de DNA estarem envolvidos neste processo.

Abstract

Several studies have shown that adaptive processes are associated with genetic variability found in regions of repetitive DNAs, and this genomic portion may be largely responsible for the adaptability of amazonian fishes in several natural and anthropogenic aquatic environments. *Hoplosternum littorale*, known as tamoatá fish, is found in polluted and unpolluted environments as in rivers, streams and floodplains, which is showing its great adaptability. Thus, the main goal of this work has been mapped DNAs repetitive sequences in mitotic chromosomes and micronuclei as like as differential banding and to measure the possibility of genotoxic actions of these environments. Seventy-two individuals were collected for micronuclei analysis which were 16 from Catalão lake and 16 from Marchantaria lake; these environments were chosen because they presented a large parcel of water which contribute to not display detectable chemical pollutants. Still, 25 from Mindu stream and 15 from Quarenta stream were identified as most critical points of environmental pollution in Manaus, Amazonas. Were cytogenetically analyzed 40 individuals to the total, which five males and five females from each locality. Mitotic chromosomes were obtained from kidney cells, detection of heterochromatin by action of barium hydroxide and nucleolus organizer regions (NORs) by silver nitrate stain. Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) was performed with 18S rDNA probes, 5S rDNA *Rex 3* and telomeric sequences. Both individuals of polluted and unpolluted environments had diploid number as $2n = 60$ chromosomes ($4m + 4sm + 52a$). Simple NORs were localized in the short arms of pair 5 which is in the same localization of 18 rDNA sites. However, 5S rDNA sites were localized in pericentromeric regions of the pairs 23 and 27 with a fifth additional mark in interstitial region of one of homologue pair 8 for individuals from unpolluted environments. Interstitial telomeric sites were not showed. As to as heterochromatin markings were found in the centromeric region, and pericentromeric terminal of the chromosomes with more conspicuous blocks in individuals from polluted environment. As for heterochromatin, markings were found in the centromeric region, and pericentromeric terminal of the chromosomes, with more conspicuous blocks in individuals of polluted environment. The retroelement *Rex 3* showed dispersed up in the chromosomes of individuals from unpolluted environment and compartmentalized in individuals from polluted environment. The micronucleus test revealed no significant differences in comparisons pair-to-pair between environments and sampling locations. The mapping of repetitive DNA sequences revealed that the micronuclei have differential composition, intra and inter individuals. These data indicate that the environment

is promoting a differential genome organization, where different portions are lost in micronucleus formation and there is no single fragile region suffering breaks, although involving of repetitive DNA elements in this process.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
1.1 Aspectos gerais e citogenéticos da família Callichthyidae	1
1.2 <i>Hoplosternum littorale</i> : citogenética, micronúcleo e interação ambiental	2
2. Objetivos	8
2.1 Geral.....	8
2.2 Específicos	8
3. Material e Métodos.....	9
3.1 Material.....	9
3.2 Métodos	11
3.2.1 Obtenção de cromossomos mitóticos.....	11
3.2.2 Esfregaço sanguíneo e análise dos micronúcleos.....	11
3.2.3 Técnicas citogenéticas clássicas.....	12
3.2.4 Técnicas citogenéticas moleculares	13
3.2.5 Análise cariotípica.....	17
3.2.6 Análise estatística.....	17
4. Resultados e discussão	18
4.1 Artigo 1 – Instabilidade genômica sob diferentes condições ambientais: peixe amazônico como um modelo	19
4.1.1 Introdução.....	22
4.1.2 Material e Métodos.....	24
4.1.3 Resultados	26
4.1.4 Discussão.....	37
5. Conclusões gerais.....	46
6. Referências bibliográficas.....	47

Lista de figuras

Material e métodos

Figura 1: Mapa da região de Manaus, AM evidenciando os locais de coleta e o modelo de estudo. (a) ambiente considerado não poluído (lago Catalão e lago da Marchantaria) (pontos amarelos) e ambiente poluído de Manaus (igarapé do Mindu e igarapé do Quarenta) (pontos vermelhos).....10

Capítulo 1

Figura 2: Cariótipos de *H. littorale* submetidos ao bandamento C para evidenciar padrão de distribuição da heterocromatina em indivíduos provenientes do lago Catalão e lago da Marchantaria (a), igarapé do Mindu (b), igarapé do Quarenta (c); e a impregnação por nitrato de prata (d). Barra de escala igual 10 μ m.....28

Figura 3: Cariótipos de *H. littorale* evidenciando sítios de DNAr 18S (sinal vermelho) e DNAr 5S (sinal verde). (a) Ambientes não poluídos (lago Catalão e lago da Marchantaria); (b) Ambientes poluídos (igarapé do Mindu e igarapé do Quarenta). Os cromossomos foram contracolorados com DAPI.....30

Figura 4: Cariótipos de *H. littorale* evidenciando a localização física cromossômica das sequências teloméricas (sinais vermelhos). (a) Indivíduos provenientes de ambientes não poluídos; (b) Indivíduos provenientes de ambientes poluídos. Os cromossomos foram contracolorados com DAPI.....31

Figura 5: Localização física cromossômica do retroelemento *Rex 3* (sinal vermelho) em cromossomos de *H. littorale* contracolorados com DAPI. Padrão encontrado em tamoatás provenientes de ambientes não poluídos (lago Catalão e lago da Marchantaria) (a); igarapé do Mindu (b) e igarapé do Quarenta (c).....32

Figura 6: Células eritrocitárias de *H. littorale* coradas com Giemsa (5%). Seta evidencia a presença de micronúcleo (aumento de 1000x).....33

Figura 7: Hibridização de sequências de DNAr 18S (a-b-c) e DNAr 5S (d-e-f) em células de esfregaços sanguíneos de *H. littorale*. (a, d) Núcleos interfásicos e micronúcleos (setas) contracolorados com DAPI (azul); (b) DNAr 18S (vermelho) evidenciando sítios de

hibridização em núcleos e micronúcleos; (c) Sobreposição das imagens a-b; (e) DNAr 5S (verde) evidenciando sítios de hibridização em núcleos e ausência em micronúcleos; (f) Sobreposição das imagens d-e.....35

Figura 8: Hibridização de sequências de retroelemento *Rex 3* (a-b-c) e sequências teloméricas de DNA (d-e-f) em células de esfregaços sanguíneos de *H. littorale*. (a, d) Núcleos interfásicos e micronúcleos (setas) contracorados com DAPI (azul); (b) *Rex 3* (vermelho) evidenciando sítios de hibridização em núcleos e micronúcleos; (c) Sobreposição das imagens a-b; (e) Sequência telomérica de DNA (vermelho) evidenciando sítios de hibridização em núcleos e ausência em micronúcleos; (f) Sobreposição das imagens d-e.....36

Lista de tabelas

Capítulo 1

Tabela 1: Dados citogenéticos clássicos e moleculares disponíveis para <i>Hoplosternum littorale</i>	38
---	----

Lista de abreviaturas

2n	Número diploide
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAr	DNA ribossomal
RNAr	RNA ribossomal
pb	Pares de bases
Ag-RON	Região organizadora de nucléolo
<i>Rex</i>	Retroelemento isolado primariamente de <i>Xiphophorus</i>
<i>Rex 3</i>	Retroelemento da família <i>Rex</i>
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
MN	Micronúcleo
FISH	Hibridização <i>in situ</i> por fluorescência
Banda C	Técnica de detecção da heterocromatina constitutiva
KCl	Solução de Cloreto de Potássio
HCl	Ácido Clorídrico
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>polymerase chain reaction</i>)
dNTP	Desoxirribonucleotídeo
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FITC	Fluoresceína isotiocianato (fluorescein isothiocyanate)
m	Cromossomo metacêntrico
sm	Cromossomo submetacêntrico
a	Cromossomo acrocêntrico

1. Introdução

1.1 Aspectos gerais e citogenéticos da família Callichthyidae

A família Callichthyidae, pertencente à ordem Siluriformes, é encontrada em toda a região Neotropical sendo reconhecida pela presença de peixes com duas séries longitudinais de placas dérmicas em cada lado do corpo, conferindo-lhes uma armadura óssea, linha lateral reduzida e ausência de dentes pré-maxilares em adultos, ainda possuem hábitos bentônicos (Nelson, 1994) e são popularmente conhecidos como cascudos, os quais habitam o fundo lamacento dos igarapés, lagos e rios, incluindo aqueles com níveis críticos de oxigênio dissolvido (Reis, 2003; Santos *et al.*, 2006; Menezes *et al.*, 2007; Soares *et al.*, 2008).

Para sobreviver a essas adversas condições ambientais, utilizam o intestino, o qual é modificado como órgão acessório para a respiração aérea (Reis, 2003; Santos *et al.*, 2006; Abdallah *et al.*, 2006; Menezes *et al.*, 2007; Soares *et al.*, 2008). Ainda, a família Callichthyidae é considerada monofilética, estando dividida nas subfamílias Corydoradinae (Hoedeman, 1952) composta pelos gêneros *Aspidoras*, *Scleromystax* e *Corydoras* e a subfamília Callichthyinae (Hoedeman, 1952) abrangendo os gêneros *Callichthys*, *Dianema*, *Hoplosternum*, *Lepthoplosternum* e *Megalechis*. Ambas compreendem mais de 200 espécies válidas (Reis, 1998; Britto, 2003; Ferraris, 2007).

Citogeneticamente, a família Callichthyidae é caracterizada por apresentar uma grande diversidade de números cromossômicos e fórmulas cariotípicas (Pazza *et al.*, 2005; Almeida, 2011) como observado na subfamília Corydoradinae que apresenta variação intra-genérica de $2n = 40$ a $2n = 134$ cromossomos, como encontrado em *Corydoras* (Oliveira *et al.*, 1990; Turner *et al.*, 1992; Oliveira *et al.*, 1993; Shimabukuro-Dias *et al.*, 2005; Almeida *et al.*, 2012). Na subfamília Callichthyinae o número diploide varia de $2n = 52$ a $2n = 66$ cromossomos, revelando uma pequena variação quando comparada com a subfamília Corydoradinae, apesar do gênero *Callichthys* apresentar variação no número diploide em populações de diferentes bacias da América do Sul (Porto e Feldberg, 1993; Oliveira *et al.*, 1993; Sanchez e Fenocchio, 1996; Shimabukuro-Dias *et al.*, 2005).

Embora, a variabilidade seja observada em *Callichthys*, o gênero *Hoplosternum* apresenta uma estabilidade em seu número diploide de $2n = 60$ cromossomos (Porto e Feldberg, 1992; Oliveira *et al.*, 1993; Shimabukuro-Dias *et al.*, 2005; Pazza *et al.*, 2005;

Nirchio *et al.*, 2006; Almeida *et al.*, 2012; Gross *et al.*, 2012). O gênero *Hoplosternum* é monofilético e abriga três espécies: *H. littorale*, *H. magdalenae* e *H. punctatum* (Reis, 1998).

Hoplosternum littorale (Hancock, 1828), popularmente conhecido como tamoatá, encontra-se distribuído na América do Sul, englobando a Argentina, Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Guiana Francesa, Paraguai, Peru, Suriname, Trindade e Trindade Tobago. No Brasil, distribui-se em praticamente todas as bacias hidrográficas (Reis, 2003) e na Amazônia é encontrado em abundância nos rios de águas brancas, igarapés e áreas de inundação, tanto em ambientes antropizados quanto não antropizados, não sendo considerados ameaçados ou em perigo de extinção (Menezes *et al.*, 2007).

Morfologicamente, *H. littorale* pode ser caracterizado por suas duas séries de placas ósseas em cada lado do corpo na forma de ziguezague, além de possuir boca pequena e terminal projetada para frente, e um par de barbilhões em cada ricto (Santos *et al.*, 1984). Com relação aos seus hábitos, o tamoatá possui dieta diferenciada durante seu desenvolvimento ontogênico: as larvas e juvenis alimentam-se de rotíferos, microcrustáceos e outros pequenos invertebrados aquáticos, enquanto que os adultos passam a ser bentônicos, com porte médio, sedentários, hábitos noturnos, onívoros, consumindo detritos, larvas de insetos, micro-invertebrados, algas, escamas de peixes, sementes e fragmentos de pequenos insetos associados ao sedimento (Winemiller, 1987; Mol, 1995; Santos *et al.*, 2006; Soares *et al.*, 2008).

Com relação à reprodução, o tamoatá é um procriador sazonal, tendo maior atividade durante o pico da estação chuvosa (Lowe-McConnell, 1975; Winemiller, 1987). Para tanto, constrói ninhos flutuantes em forma de concha, utilizando material vegetal morto, no qual deposita uma massa adesiva de ovos no lado escuro do ninho, em uma cama de espuma. O macho tende a guardar o ninho até o desenvolvimento dos embriões (Ramnarine, 1994). Ainda, os tamoatás apresentam um grande valor comercial, uma vez que são muito apreciados por populações ribeirinhas e urbanas da Amazônia brasileira para alimentação (Santos *et al.*, 2006; Soares *et al.*, 2008; Sá-Oliveira *et al.*, 2011). Em outros países da América do Sul, excluindo o Brasil, destacam-se como peixes ornamentais, sendo exportados para França e Estados Unidos da América (Sá-Oliveira *et al.*, 2011).

1.2 *Hoplosternum littorale*: citogenética, micronúcleo e interação ambiental

Apesar de *H. littorale* apresentar ampla distribuição, ausência de migração e tolerância a diferentes ambientes, uma estabilidade no número diploide é encontrada para a espécie.

Indivíduos provenientes de diferentes bacias hidrográficas apresentam $2n = 60$ cromossomos. Este número diploide homogêneo é tipicamente encontrado na subfamília Callichthyinae, ao contrário da subfamília Corydoradinae (Oliveira *et al.*, 1990; Turner *et al.*, 1992; Oliveira *et al.*, 1993; Shimabukuro-Dias *et al.*, 2005; Almeida *et al.*, 2012). Porém, diferentes fórmulas cromossômicas, padrões de distribuição de heterocromatina e localização das regiões organizadoras de nucléolo (RON) são encontradas em *H. littorale* de diferentes localidades. Parte desta variabilidade pode ser decorrente de dificuldades na classificação dos cromossomos e, no caso das regiões organizadoras de nucléolo, devido à similaridade de tamanho dos cromossomos acrocêntricos (Almeida *et al.*, 2012).

Com relação à distribuição da heterocromatina em cromossomos mitóticos de *H. littorale*, três padrões foram encontrados: a) blocos centroméricos e intersticiais (Oliveira *et al.*, 1993; Shimabukuro-Dias *et al.*, 2005; Almeida *et al.*, 2012); b) blocos subterminais e intersticiais (Pazza *et al.*, 2005); c) blocos centroméricos, pericentroméricos e intersticiais (Nirchio *et al.*, 2006). Ainda, coloração com fluorocromos base-específicos revelam variação intraindividual da composição da heterocromatina, sendo a mesma classificada como heterogênea (Pazza *et al.*, 2005; Almeida *et al.*, 2012). A heterocromatina é definida como blocos de segmentos de DNA no cromossomo que se apresentam condensados e com pouca atividade transcricional. Esta região é composta principalmente de DNA repetitivo que se replica tardiamente, sendo reconhecida como parte importante do genoma dos eucariotos (Artoni *et al.*, 1999; Grewal e Jia, 2007; Skipper, 2007; Bühler, 2009), tendo merecido atenção especial como importante ferramenta na caracterização de populações e/ou indivíduos, detecção de polimorfismos estruturais, diferenciação de cromossomos B e cromossomos sexuais (Nirchio e Oliveira, 2006).

Com relação aos DNAs repetitivos encontrados nos eucariotos destacam-se: as sequências de DNA repetitivas em tandem, que incluem os DNAs satélites e os DNAs ribossomais (DNAr) e as sequências de DNA repetitivas dispersas, abrangendo os elementos transponíveis (Phillips e Reed, 1996; Martins, 2007).

Os genes ribossomais organizam-se em duas famílias multigênicas: 5S e 45S, as quais podem estar localizadas em um ou mais pares cromossômicos, em sentença ou não, dependendo da espécie. O DNAr 5S apresenta 120pb e as repetições em *tandem* deste gene são separadas uma das outras por um DNA espaçador não transcrito (NTS) (Wasko *et al.*, 2001; Galetti Jr e Martins, 2004; Martins, 2007). Já a família de DNAr 45S, considerada uma sequência moderadamente repetitiva e conservada evolutivamente, codifica os RNAr 28S,

18S e 5,8S, estando relacionada com a região organizadora de nucléolo (RON), que pode ser detectada indiretamente com a impregnação com Nitrato de Prata (Ag-RON), a qual marca proteínas nucleolares envolvidas nas atividades transcricionais. A localização física direta destas sequências de DNAr nos cromossomos pode ser obtida pela técnica de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH).

Em *H. littorale* provenientes da bacia da costa do Sudeste e da bacia do rio de Contas na Bahia, a técnica de FISH revelou a localização de sondas de DNAr 18S em um par de cromossomos acrocêntricos, coincidentemente com as Ag-RONs, enquanto que as sondas de DNAr 5S foram localizadas na região terminal de dois pares de cromossomos, revelando a ausência de sintenia dos sítios de DNAr 18S e 5S nesta espécie (Pazza *et al.*, 2005; Almeida *et al.*, 2012).

Outra classe importante de DNA repetitivo é composta pelos elementos transponíveis. Estes elementos podem ser divididos em duas classes, I e II. A Classe I inclui os retrotransposons, que se transpõem através de uma cópia de RNA, enquanto que a Classe II inclui os transposons, que se transpõem através de uma cópia de DNA (Kidwell, 2002). Tais elementos transponíveis são capazes de deslocar-se e inserir-se em outros locais no genoma, e frequentemente se duplicam no decorrer do processo (Wessler, 2006) podendo gerar polimorfismos no sítio de sua inserção e apresentar variabilidade no número de cópias dentre e entre espécies (Hart *et al.*, 1992; Capy *et al.*, 1998; Volff *et al.*, 2003, Almeida e Carareto, 2005).

Tanto os transposons quanto os retrotransposons podem estar compartimentalizados em regiões heterocromáticas, onde uma alta taxa de recombinação parece estar negativamente correlacionada com a distribuição de tais elementos, sendo este bastante variável entre as espécies (Fisher *et al.* 2004). Contudo, a transposição destes elementos móveis não é um processo aleatório, podendo ser controlada por sinais celulares do hospedeiro e por fatores externos (Charlesworth e Langley, 1986; Deininger *et al.*, 2003; Almeida e Carareto, 2005; Burt e Trivers, 2006), podendo ser avaliada, aplicando situações de estresse em organismos ou através de análises de populações naturais da mesma espécie vivendo em diferentes condições (Capy *et al.*, 2000).

Dada a grande quantidade de elementos transponíveis em diferentes espécies, a identificação e caracterização destes segmentos se tornaram de grande importância para melhor compreensão de seu papel na organização e evolução do genoma (Feschotte, 2004;

Böhne *et al.*, 2008; Martins *et al.*, 2011). Entre os diversos elementos transponíveis encontrados nos peixes, aqueles pertencentes à família *Rex* são os melhores caracterizados (Volf *et al.*, 1999, 2000, 2001; Böhne *et al.*, 2008). Os retroelementos *Rex 1* e *Rex 3* codificam uma transcriptase reversa e uma endonuclease apurínica/apirimidínica, enquanto que o *Rex 6* também codifica uma transcriptase reversa e possui uma endonuclease similar à de uma enzima de restrição (REL) (Volf *et al.*, 2001).

Um estudo realizado utilizando o retrotransposon *Rex 3* em três populações de *Hoplias malabaricus*, provenientes de diferentes ambientes aquáticos da bacia amazônica (rios de águas brancas, rios de águas claras e rios de águas pretas) revelou que o retrotransposon *Rex 3* apresentou três padrões distintos de localização física nos cromossomos. Estes padrões variaram de acordo com o tipo de ambiente, indicando a possível existência de associação entre o padrão de distribuição do *Rex 3* e processos adaptativos locais da espécie em diferentes condições ambientais (Santos, 2012). Uma vez que, os rios que compõe a bacia Amazônica além de serem diferentes na morfologia de seus cursos, também apresentam características físico-químicas distintas em suas águas. Os rios de águas brancas ou barrentas, resultados de processos de erosão na Cordilheira dos Andes, transportam sedimentos ricos em nutrientes, e suas águas mostram pH quase neutro (6,5 a 7,0) e alta condutividade. Já os rios de águas pretas, denominados assim devido à coloração escura com presença de grandes quantidades de ácidos húmicos e fúlvicos dissolvidos, apresentam pH ácido que varia de 3,0 a 5,0 em decorrência da ausência de cálcio/magnésio e déficit de sais minerais. Quanto aos rios de águas claras, estes caracterizam-se por apresentar transparência e baixas concentrações de sedimentos dissolvidos, seu pH varia entre 4,5 a 7,0 e possuem uma condutividade baixa (Sioli, 1984; Furch, 1984; Junk *et al.*, 2011).

Já em *H. littorale* encontrados tanto em ambientes aquáticos antropizados e não antropizados de Manaus, AM o mapeamento físico cromossômico preliminar do retroelemento *Rex 3* revelou organização cromossômica diferencial para indivíduos providentes dos dois tipos de ambientes, apesar de suas macroestruturas cromossômicas serem semelhantes (Gross *et al.*, 2012). O que merece uma investigação mais aprofundada, relacionando composição e estabilidade genômica com o ambiente que o indivíduo vive. Isto é particularmente importante se considerarmos que os ambientes urbanos amazônicos vêm sofrendo alterações em consequência de ações de efluentes domésticos e industriais, que também contribuem para o estabelecimento do complexo ecossistema aquático amazônico (Santana e Barroncas, 2007).

De modo geral, os resultados de análises químicas (metais pesados) e variáveis físico-químicas (pH, condutividade elétrica e temperatura) indicam comportamento aleatório entre os igarapés urbanos de Manaus, AM porém é verificável a contaminação por origem antrópica, originando baixo teor de oxigênio dissolvido e altas concentrações de ferro, manganês, zinco, cobre e nitrato acima dos limites estabelecidos pelo CONAMA (resolução nº 357/2005), além da presença de coliformes fecais e totais acima das taxas permissíveis para recreação e consumo humano e doméstico, consequência da ocupação desordenada nas margens destes igarapés (Silva, 1996; Cleto Filho, 1998).

Ainda, Medeiros *et al.* (2014) verificaram altas concentrações de Mercúrio (Hg) nas sub-bacias do Educandos e do São Raimundo, um metal que apresenta alto potencial bioacumulativo e nocivo à saúde humana. Thomas *et al.* (2014) mostraram também presença de produtos farmacêuticos humanos e resíduos de drogas ilícitas, como a cocaína, presente nos igarapés do Mindu e Quarenta. Com isso, os peixes da região Amazônica desenvolveram uma grande plasticidade genômica durante seu processo adaptativo, que podem ser verificados em aspectos morfológicos, fisiológicos, anatômicos e na estrutura genética de tais organismos (Junk *et al.*, 1989; Almeida-Val e Farias, 1996).

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 sério risco devido ao seu potencial genotóxico (Ribeiro *et al.*, 2003). Estes organismos vivos expostos a poluentes ambientais podem sofrer modificações químicas no seu DNA e estas alterações podem ser prejudiciais a processos vitais das células, tais como a duplicação do DNA e a transcrição gênica, resultando em danos que podem ser verificados através de micronúcleos (Costa e Menk, 2000; Ribeiro *et al.*, 2003). Os micronúcleos são pequenos corpúsculos que se encontram dispersos no citoplasma e representam uma perda significativa de cromatina. Podem ser constituídos por um fragmento da porção cromatínica decorrente de danos cromossômicos estruturais, como uma quebra cromossômica, ou até mesmo por cromossomos inteiros, em decorrência de dano ou disfunção no aparelho do fuso mitótico (Schmid, 1975; Al-Sabti e Metcalfe, 1995; Ribeiro *et al.*, 2003).

O teste do micronúcleo (MN), inicialmente desenvolvido em eritrócitos de medula óssea de camundongos (Schmid, 1976; Pantaleão *et al.*, 2006) tem sido bastante recomendado para estudos de biomonitoramento ambiental, empregando peixes como indicadores ambientais para avaliar a qualidade de recursos hídricos e os efeitos da poluição sobre os

organismos (Bucker *et al.*, 2006; Arias *et al.*, 2007; Pantaleão, 2008). Recentemente, a técnica de FISH vem sendo combinada com o eficiente teste do micronúcleo para medir simultaneamente danos cromossômicos e localização de regiões específicas no genoma dentro de células individuais (Hovhannisyan, 2010). Além disso, a técnica permite ainda, identificar a origem da formação dos MN por efeitos de agentes clastogênicos e/ou aneugênicos, possibilitando a compreensão dos mecanismos da formação destes MN (Hovhannisyan, 2010; Luzhna *et al.*, 2013; Melo *et al.*, 2014).

Diversos estudos demonstram que processos adaptativos estão relacionados com a variabilidade genética, encontrada em regiões de DNAs repetitivos (Burt e Trivers, 2006), e que seja a grande responsável pela adaptabilidade dos peixes amazônicos nos diversos ambientes aquáticos, tanto naturais quanto antropizados. Como estes DNAs repetitivos, tais como os elementos transponíveis, podem responder a diversas variações no ambiente (Capy *et al.*, 2000) e como parece estar havendo uma distribuição diferencial dos elementos *Rex 3* em função da sua presença em ambientes poluídos e não poluídos de Manaus, o mapeamento destas sequências repetitivas de DNA em cromossomos mitóticos e em micronúcleos, bem como os bandeamentos diferenciais e a avaliação da ação genotóxica destes ambientes foram realizados a fim de promover um incremento no conhecimento da organização genômica de *H. littorale*.

2. Objetivos

2.1 Geral

Mapear sequências repetitivas de DNA em cromossomos mitóticos de *Hoplosternum littorale* provenientes de ambientes aquáticos antropizados e não antropizados de Manaus e verificar se as mesmas são encontradas em micronúcleos.

2.2 Específicos

- ✓ Cariotipar peixes coletados nas duas condições ambientais.
- ✓ Estabelecer os padrões de distribuição da heterocromatina constitutiva (Banda C) e da região organizadora de nucléolo (RONs) em cromossomos mitóticos dos indivíduos coletados.
- ✓ Comparar estatisticamente a incidência dos micronúcleos píceos entre os indivíduos da mesma espécie provenientes de diferentes condições ambientais.
- ✓ Mapear sequências repetitivas de DNA em cromossomos mitóticos e em micronúcleos.

3. Material e Métodos

3.1 Material

Setenta e dois indivíduos foram coletados para análise de micronúcleos com tamanho médio de 20 cm de comprimento, sendo 16 do lago Catalão, localizado na confluência dos rios Negro e Solimões (água misturada, com características físico-químicas de água branca) (3°09'25"S 59°54'49"W) e 16 do lago da Marchantaria, localizado no rio Solimões (água branca) (3°13'22.30"S 59°55'14.59"W). Estes ambientes foram escolhidos por apresentar um grande volume de água, o que contribui para não apresentar poluentes químicos detectáveis (Pinto *et al.*, 2009). Ainda, 25 indivíduos foram coletados no igarapé do Mindu (3°04'53.27"S 60°00'25.21"W) e 15 no igarapé do Quarenta (3°07'49.48"S 60°00'25.21"W) apontados como pontos mais críticos de poluição ambiental em Manaus, AM (Pinto *et al.*, 2009), ambos formam as microbacias do São Raimundo e Educandos, respectivamente (Figura 1a). Foram analisados citogeneticamente 40 exemplares de *H. littorale* (Figura 1b), sendo amostrados cinco machos e cinco fêmeas de cada localidade. Os exemplares foram coletados com a licença permanente do SISBIO/ICMBio número 28095-1/2011.

Os exemplares foram capturados com o uso de tarrafas, redes e rapichés e acondicionados em recipientes contendo a água do próprio ambiente onde foram capturados e encaminhados vivos ao Laboratório de Citogenômica Animal da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) sendo realizados os procedimentos para obtenção das suspensões celulares, a coleta de amostras de tecido muscular para extração do DNA e a preparação das lâminas de esfregaços sanguíneos dos indivíduos. Os peixes foram eutanaziados seguindo as Diretrizes da Prática da Eutanásia do Concea (Concea, 2013). Em seguida, os peixes foram numerados, registrados, fixados em formol 10% por 24h, lavados em água corrente e acondicionados em recipientes contendo álcool 70%, visando seu depósito na Coleção Ictiológica da UFAM. Além disso, todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (no. 017/2014).

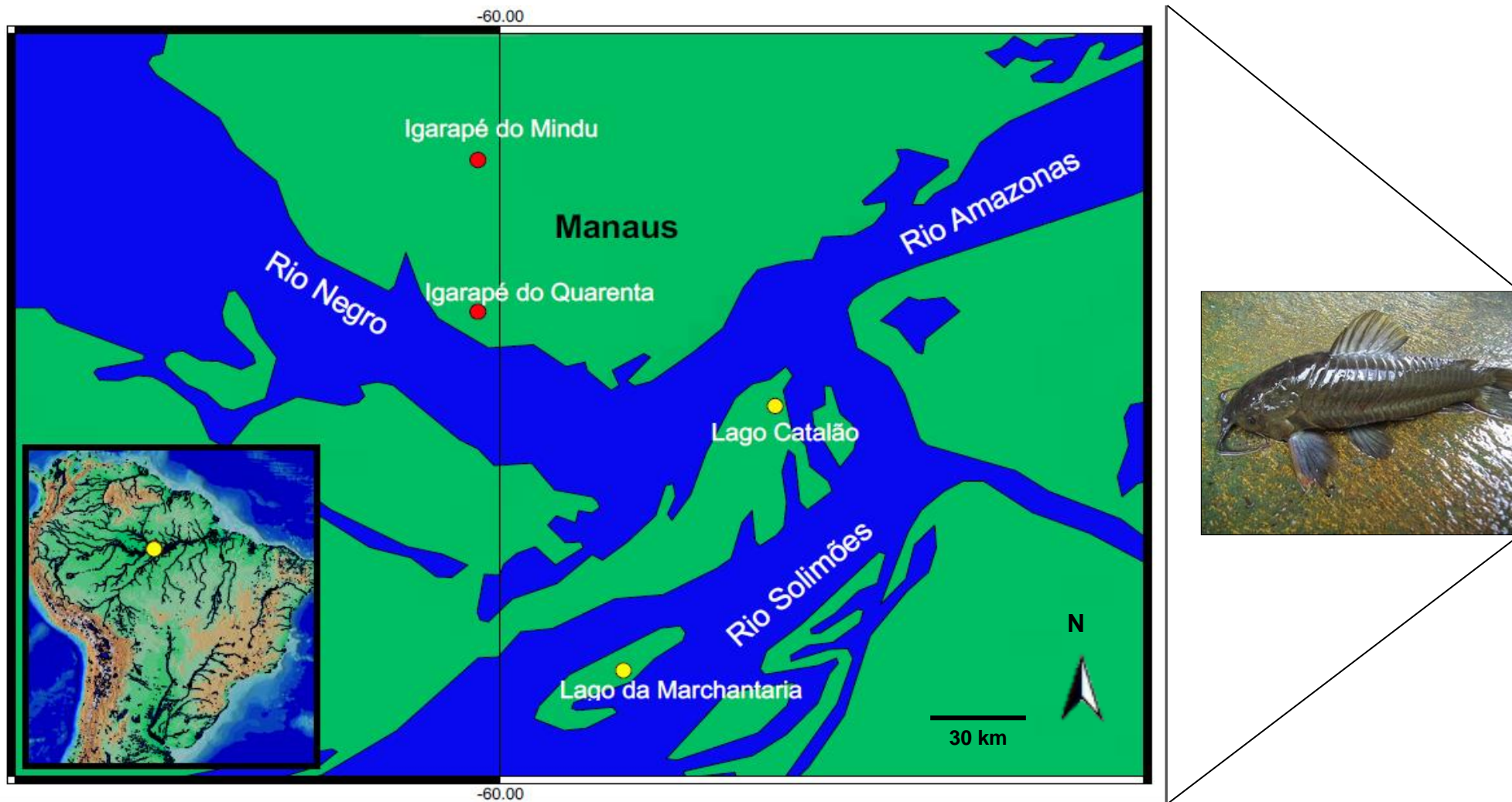


Figura 1 – Mapa da região de Manaus, AM evidenciando os locais de coleta e o modelo de estudo. (a) ambiente considerado não poluído (lago Catalão e lago da Marchantaria) (pontos amarelos) e ambiente poluído de Manaus (igarapé do Mindu e igarapé do Quarenta) (pontos vermelhos). (b) exemplar de *H. littorale* (Fonte: tudolevaapericia.blogspot.com.br).

3.2 Métodos

3.2.1 Obtenção de cromossomos mitóticos

Foi injetada, intraperitonealmente uma solução aquosa de colchicina 0,0125% na proporção de 1 mL para cada 100 g do peso do animal vivo, por 45 minutos (Bertollo *et al.*, 1978). Após esse tempo, os peixes foram eutanaziados seguindo as Diretrizes da Prática da Eutanásia do Concea (Concea, 2013) que constitui-se no modo humanitário de matar o animal, com mínimo desconforto de maneira controlada e assistida. Posteriormente foi efetuada a retirada da porção anterior do rim, que é considerado o órgão hematopoiético dos peixes. O rim foi lavado em KCl a 0,075 M e transferido para outro recipiente de vidro contendo cerca de 10 mL da solução hipotônica, sendo dissociado com pinças. A suspensão obtida foi colocada em estufa a 37 °C por 30 minutos. Transcorrido este tempo o material foi ressuspenso e transferido para um tubo de centrífuga, utilizando-se uma pipeta Pasteur. Fixador Carnoy na proporção 3:1 (metanol: ácido acético), recém-preparado e gelado foi adicionado (4 gotas) e o material centrifugado por 10 minutos a 900 rpm, sendo descartado o sobrenadante. Posteriormente foi adicionado 8 mL de fixador Carnoy e o material foi ressuspenso com o auxílio de uma pipeta Pasteur, sendo repetido esta lavagem 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, 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 57 °C, em banho-maria. Após 5 minutos, as mesmas foram retiradas da água, e a suspensão celular foi gotejada sobre três pontos diferentes desta lâmina. As lâminas secaram diretamente ao ar. Em seguida, foram coradas com Giemsa 5%, diluído em tampão fosfato 0,06 M e pH 6,8, por 10 minutos, sendo lavadas em água destilada e secas ao ar.

3.2.2 Esfregaço sanguíneo e análise dos micronúcleos

Para obtenção das lâminas de micronúcleo, sangue de setenta e dois indivíduos foi coletado com o auxílio de seringa com agulha, utilizando um anticoagulante. Uma gota de sangue de cada indivíduo foi distendida sobre uma lâmina limpa, com o auxílio de outra lâmina. Para cada animal, foram preparadas três lâminas, sendo que uma lâmina destinou-se a técnica de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH). Após suas secagens, em torno de 12

horas, as lâminas foram fixadas em etanol PA (100%) por 30 minutos, secas ao ar e com exceção das lâminas destinadas à FISH, foram coradas com Giemsa 5% (diluído em tampão fosfato pH 6,8) por 10 minutos, sendo lavadas posteriormente com água destilada e secas ao ar, em temperatura ambiente. Depois de seco, o material foi observado em microscópio óptico para contagem dos micronúcleos presentes.

Em resolução de 1.000x foram contabilizados 1.000 eritrócitos por lâmina e posterior anotação do número de micronúcleos encontrados (Bucker *et al.*, 2006). Os micronúcleos foram identificados seguindo o critério proposto por Fenech *et al.* (2003) e Freitas *et al.* (2005), sendo considerados como micronúcleos partículas que não excederam 1/3 do diâmetro total do núcleo principal, não estavam conectado e nem ligado ao núcleo e permaneceram no citoplasma, tiveram formato redondo com bordas distinguíveis e apresentaram mesma intensidade de coloração e refringência do núcleo principal.

As incidências de micronúcleos encontradas nos *H. littorale* coletados nos diferentes ambientes foram comparados pela análise de variância com o teste ANOVA, com número de amostras diferentes ($p < 0.05$).

3.2.3 Técnicas citogenéticas clássicas

3.2.3.1 Detecção das regiões organizadoras de nucléolo (RONS)

Para a detecção das regiões organizadoras de nucléolo (RONS) foi utilizada a técnica descrita por Howell e Black (1980). Sobre as lâminas contendo suspensão celular foram adicionadas 2 a 3 gotas de uma solução coloidal de gelatina (2g de gelatina comercial sem sabor, dissolvida em 100 mL de água destilada, acrescentando 1 mL de ácido fórmico) e, sobre cada gota de gelatina, duas gotas de solução aquosa de nitrato de Prata (AgNO_3) a 50%. Esta foi coberta com uma lamínula e colocada em câmara úmida, em banho-maria a 60 °C, durante 3 a 8 minutos. Após o tempo apropriado, momento em que a lâmina adquiriu uma coloração marrom dourada, a mesma foi lavada em água destilada, permitindo que a lamínula fosse retirada naturalmente pela própria água e secas ao ar.

3.2.3.2 Detecção da heterocromatina constitutiva (Banda C)

Para a detecção da heterocromatina constitutiva (Banda C) foi utilizada a técnica descrita por Sumner (1972) com modificações, que consistiu em tratar a lâmina preparada segundo a técnica descrita para cromossomos mitóticos com HCl 0,2 N à 42 °C por 2 minutos. Em seguida, a lâmina foi lavada rapidamente em água destilada à temperatura

ambiente e seca ao ar. Posteriormente foi incubada por 1 minuto em solução de hidróxido de bário a 5%, recém-preparada e filtrada a 42 °C. A ação do hidróxido de bário foi interrompida imergindo rapidamente a lâmina em solução de HCl 0,2 N (temperatura ambiente) e lavada em água destilada. Após seca, a lâmina foi incubada em solução 2xSSC (cloreto de sódio 0,3 M e citrato trissódico 0,03 M, pH 6,8) em banho-maria a 60 °C, por 15 minutos, sendo posteriormente lavada em água destilada e secas ao ar. As lâminas então foram coradas com solução de Giemsa (diluída a 5% em tampão fosfato 0,06 M e pH 6,8) durante 10 minutos, lavadas em água destilada e seca ao ar.

3.2.4 Técnicas citogenéticas moleculares

3.2.4.1 Extração de DNA

A extração de DNA foi feita a partir do tecido muscular da própria espécie, utilizando o protocolo básico de Sambrook e Russel (2001) com algumas modificações. Foi macerado aproximadamente 20 mg de tecido muscular e transferido para um tubo de volume de 1,5 mL. Em seguida foram adicionados 500 µL de tampão de lise (Tris-HCl 10 mM em pH 8,0, NaCl 0,3 M, EDTA 10 mM, SDS 1%) de Estoup *et al.* (1993) e Asahida *et al.* (1996). Posteriormente foi acrescentado: 15 µL de proteinase K (10 mg/mL) e 6 µL de RNase (10 mg/mL). As amostras foram incubadas a 60 °C por aproximadamente 2 horas para que o tecido fosse totalmente digerido.

Em seguida, foram adicionados 100 µL de acetato de amônio 3 M, 1 volume (600 µL) de fenol-clorofórmio (1:1) sendo as amostras agitadas por inversão, por alguns minutos e centrifugadas por 30 minutos a 14.000 rpm em temperatura ambiente. A fase superior foi transferida para um novo tubo, e foram adicionados 600 µL de clorofórmio sendo misturado gentilmente, por alguns minutos, por inversão. A mistura foi novamente centrifugada por 20 minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e acrescentado 100 µL de acetato de amônio 3 M, 1 volume (600 µL) de isopropanol gelado e misturado gentilmente por inversão, precipitando a -20 °C por cerca de 14 horas. O material foi retirado do freezer e centrifugado por 30 minutos a 14.000 rpm, sendo descartado o sobrenadante. O *pellet* então foi lavado com 1 mL de etanol 70% e centrifugado por mais 20 minutos a 14.000 rpm. Novamente, o sobrenadante foi descartado, e o *pellet* seco em estufa a 55 °C, sendo ressuspensionado em água milli-Q e eluindo por 14 horas.

Para a análise da quantidade e integridade do material, o DNA extraído foi comparado com marcador de concentração conhecida, em eletroforese padrão (com tampão Tris-Borato-

EDTA 0,5X e corrida a 70 V por 40 minutos) em gel de agarose 0,8% e corado com *GelRed* (Biotium). A visualização e análise do DNA no gel foram feitas no fotodocumentador *Easy Doc 100* (BioAgency), o qual possui acoplado um transluminador de luz ultravioleta (260 nm) e quantificadas no GE NanoVue Spectrophotometer.

3.2.4.2 Isolamento de sequências repetitivas por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e marcação por *nick translation*

As sondas de sequências repetitivas foram obtidas por amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR - Saiki *et al.*, 1988) utilizando o DNA genômico extraído do músculo de *H. littorale* e os seguintes primers:

- DNAr 18S: 18Sf (5'-CCG CTT TGG TGA CTC TTG AT-3') e 18Sr (5'-CCG AGGACC TCA CTA AAC CA-3') (Gross *et al.*, 2010).
- DNAr 5S: 5Sa (5'-TACGCCCGATCTCGTCCGATC-3') e 5Sb (5'-CAGGCTGGTATGGCCGTAAGC -3') (Martins e Galetti, 1999).
- Retrotransposon *Rex 3*: 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; 2001).

Para sequências teloméricas as amplificações foram feitas sem DNA com os seguintes primers: (TTAGGG)₅ e (CCCTAA)₅ (Ijdo *et al.* 1991).

Os ciclos de amplificação seguiram as seguintes etapas:

- a) 18S: 2 minutos a 94 °C (desnaturação inicial), 35 ciclos de 1 minuto a 95 °C (desnaturação), 1 minuto a 55 °C (ligação dos primers), 1 minuto e 40 segundos a 72 °C (extensão), 7 minutos a 72 °C (extensão final);
- b) 5S: 1 minuto a 94 °C (desnaturação inicial), 30 ciclos de 1 minuto a 94 °C (desnaturação), 1 minuto a 59 °C (ligação dos primers), 1 minuto e 30 segundos a 72 °C (extensão), e 5 minutos a 72 °C (extensão final);
- c) *Rex 3*: 2 minutos a 95 °C (desnaturação inicial), 35 ciclos de 1 minuto a 95 °C (desnaturação), 40 segundos a 55 °C (ligação dos primers), 2 minutos a 72 °C (extensão), 5 minutos a 72 °C (extensão final).
- d) Sequências teloméricas: 4 minutos a 94 °C (desnaturação inicial), 12 ciclos de 1 min a 94 °C (desnaturação), 45 segundos a 52 °C (ligação dos primers) e 1 minuto e 30 segundos a 72 °C (extensão); seguida por 35 ciclos de alta estringência: 1 minuto a 94 °C (desnaturação), 1

minuto e 30 segundos a 60 °C (ligação dos *primers*) e 1 minuto e 30 segundos a 72 °C (extensão), 7 minutos a 72 °C (extensão final).

As reações de PCR foram feitas em um termociclador Eppendorf - Mastercycler Gradient, para um volume final de 15 µL: 1 µL de DNA genômico (100 ng); 1,5 µL de Tampão 10X com cloreto de magnésio (1,5 mM); 0,15 µL de Taq DNA polimerase (5U/µL); 3,0 µL de dNTP (1 mM); 0,6 µL de cada primer (5 mM); água milli-Q para completar o volume. Os produtos de PCR foram utilizados como sondas que foram marcadas pelo método de *nick translation* utilizando biotina 14-dATP (Bionick labeling system-Invitrogen) e/ou digoxigenina-11-dUTP (Dig-Nick Translation mix Roche). Para tanto, em um tubo eppendorf de 1,5 mL, foi preparada uma solução contendo 1 µL de Mix dNTP 10x; 1 µL do produto do PCR (200 ng/ µL); 1 µL de Mix de enzima 10x; 6 µL de água milli-Q, totalizando 9 µL para cada lâmina. Esta solução foi homogeneizada, centrifugada brevemente e incubada a 16 °C por 90 minutos em um termociclador. Em seguida, para interrupção da reação foi adicionado 1 µL de *stop buffer* contendo 1 µL de acetato de sódio 3 M e mantida em freezer para posterior utilização.

3.2.4.2 Hibridização *in situ* por fluorescência

Foi utilizada a técnica de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) descrita por Pinkel *et al.* (1986), com algumas modificações. Sendo utilizadas como sondas os DNA ribossomais, elementos transponíveis e sequências teloméricas obtidos por PCR.

Tratamento das lâminas

As lâminas contendo preparações cromossômicas e as lâminas de esfregaços sanguíneos foram lavadas em tampão PBS 1x por 5 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram desidratadas em séries alcoólicas geladas (70%, 85% e 100%) durante 5 minutos cada. Posteriormente foram tratadas com 90 µL de RNase 10 µg/mL (5 µL de RNase 10 mg/mL e 975 µL de 2XSSC) por 1 hora em câmara úmida a 37 °C. As lâminas então foram lavadas três vezes em 2xSSC durante 5 minutos cada. Após isso, as mesmas foram lavadas em PBS 1x durante 5 minutos.

Fixação

As lâminas foram fixadas em formaldeído 1% em PBS 1x/50mM MgCl₂ durante 10 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente lavadas em PBS 1x por 5 minutos. Após, as

lâminas foram desidratadas em série alcoólica gelada (70%, 85% e 100%) durante 5 minutos cada.

Pré-hibridização

As lâminas 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.

Solução de hibridização

Em um tubo eppendorf foram adicionados 4 µL de sonda 1; 4 µL de sonda 2; 20 µL de formamida; 8 µL de sulfato de dextrano 50% e 4 µL de 20xSSC. A sonda foi desnaturada a 99 °C por 10 minutos e transferida imediatamente ao gelo.

Hibridização

Foram colocados 40 µL de solução de hibridização sobre uma lamínula e a lâmina invertida sobre a lamínula. As lâminas foram mantidas com o material voltado para baixo em câmara úmida (H₂O destilada) a 37 °C *overnight*.

Lavagens

As lamínulas foram removidas e as lâminas foram lavadas uma vez em formamida 15% a 42 °C, durante 10 minutos. Posteriormente, foram lavadas em uma solução Tween 0,5% durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Deteção

As lâminas foram incubadas em tampão NFDM por 15 minutos. Logo em seguida, foram lavadas duas vezes com solução Tween 5% por 5 minutos a temperatura ambiente. Após, foram colocadas sobre cada lâmina 20 µL de anti digoxigenina-rodamina e 100 µL de solução contendo tampão NFDM e estreptavidina (2 µL de estreptavidina estoque em 998 µL de NFDM). Posteriormente as lâminas foram cobertas com lamínula e deixadas por 60 minutos em câmara úmida com água destilada. Logo após as lamínulas foram removidas e as lâminas lavadas três vezes em solução Tween 5% por 2 minutos a temperatura ambiente cada. Em seguida, as lâminas foram desidratadas em séries alcoólicas 70, 85 e 100% durante 5 min cada e secas ao ar.

Montagem das lâminas

Foi adicionado a cada lâmina uma solução de DAPI diluído em *antifade* VectaShield Vector (20 µL de *antifade* e 1 µL de DAPI).

3.2.5 Análise cariotípica

Após a análise e contagem dos cromossomos ao microscópio óptico foi estabelecido o número diplóide modal. As melhores metáfases obtidas com as técnicas clássicas (RON e Banda C) foram capturadas digitalmente em fotomicroscópio Zeiss Axio Carl com objetiva de imersão em câmera digital (Zeiss AxioCam ERc 5s). As lâminas submetidas a técnicas moleculares (FISH) foram analisadas e capturadas em um fotomicroscópio de epifluorescência Olympus Bx-51, em objetiva de imersão.

Para a montagem dos cariótipos foi utilizado o programa Adobe Photoshop 7.0, versão CS5, a partir de cromossomos metafásicos mitóticos, os quais foram recortados e emparelhados. Os cromossomos foram medidos, utilizando o programa livre Image J e organizados em ordem decrescente de tamanho. A morfologia cromossômica foi determinada de acordo com os critérios 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 $3,00$ e acrocêntricos (a) $RB > 7,00$. O número fundamental (NF) foi determinado de acordo com o número de braços cromossômicos, considerando-se os metacêntricos, submetacêntricos como tendo dois braços e acrocêntricos como tendo apenas um braço.

3.2.6 Análise estatística

O valor total de micronúcleos encontrados em *H. littorale* coletados nos diferentes ambientes foi comparado por Análise de Variância (ANOVA), com nível de significância de 5%:

a) ambiente não poluído (lago Catalão e lago da Marchantaria) x ambiente poluído (igarapés do Mindu e do Quarenta) para avaliar se existe diferença estatística relacionada a ambientes antropizados e naturais;

b) ambiente poluído (igarapé do Mindu) x ambiente poluído (igarapé do Quarenta) para avaliar se existe diferença estatística entre os ambientes poluídos;

c) ambiente não poluído (lago Catalão) x ambiente não poluído (lago da Marchantaria) para avaliar se existe diferença estatística relacionada a diferentes tipos naturais de águas amazônicas.

4. Resultados e Discussão

Os resultados obtidos no presente estudo juntamente com a discussão dos dados são apresentados em forma de artigo científico, conforme mencionado a seguir:

4.1 – Artigo 1: Instabilidade genômica sob diferentes condições ambientais: peixe amazônico como um modelo

4.1 – Artigo 1: Instabilidade genômica sob diferentes condições ambientais: peixe amazônico como um modelo



Capítulo 1

Genomic instability under different environmental conditions: Amazonian fish as a model. Enviado para publicação na revista PLOS ONE em 29/04/2015.

Instabilidade genômica sob diferentes condições ambientais: peixe amazônico como um modelo

Francijara Araújo da Silva^{1(✉)}, Carlos Henrique Schneider¹, Eliana Feldberg², Fabricio Beggiato Baccaro³, Natália Dayane Moura Carvalho¹, Maria Claudia Gross¹

¹ Universidade Federal do Amazonas, Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Citogenômica Animal, Manaus, Amazonas, Brasil - Avenida General Rodrigo Otávio, 3000 – Coroado III, Manaus, Amazonas, Brasil – CEP: 69077-000

² Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Laboratório de Genética Animal, Manaus, Amazonas, Brasil - Avenida André Araújo, 2936 – Aleixo, Manaus, Amazonas, Brasil – CEP: 69083-000

³ Universidade Federal do Amazonas, Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Zoologia, Manaus, Amazonas, Brasil - Avenida General Rodrigo Otávio, 3000 – Coroado III, Manaus, Amazonas, Brasil – CEP: 69077-000

Autor correspondente:

Francijara Araújo da Silva

Laboratório de Citogenômica Animal, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brasil

e-mail: francijara.araujo@gmail.com

contato: +55 (92) 99253-8660

Palavras-chave: DNA repetitivo, tamoatá, poluição, Amazônia

Resumo

Hoplosternum littorale, conhecido como tamoatá, tem grande valor comercial, pois é fonte de alimento para populações ribeirinhas. Na Amazônia, essa espécie é abundante em rios, igarapés e áreas de inundação, tanto em ambiente poluído quanto não poluído, mostrando grande capacidade de adaptação. Assim, o trabalho objetivou mapear sequências repetitivas de DNA em cromossomos mitóticos e em micronúcleos eritrocitários de tamoatás provenientes de ambiente poluído e não poluído, assim como avaliar a possível ação genotóxica destes ambientes. Foram analisados citogeneticamente 40 indivíduos coletados nos arredores de Manaus, AM, sendo 20 de ambiente poluído e 20 de ambiente considerado pouco antropizado. Ainda, 72 indivíduos foram submetidos à análise do micronúcleo sanguíneo, sendo 16 do lago Catalão, 16 do lago da Marchantaria, 25 do igarapé do Mindu e 15 do igarapé do Quarenta. Os cromossomos mitóticos foram obtidos a partir de células renais, a detecção de heterocromatina pela ação do hidróxido de bário e as regiões organizadoras de nucléolo (RONs) por meio da impregnação com nitrato de prata. A técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) foi efetuada utilizando sondas de DNAr 18S, DNAr 5S, *Rex 3* e sequências teloméricas. Tanto para os exemplares de ambiente poluído quanto não poluído o número diploide foi de $2n = 60$ cromossomos ($4m + 4sm + 52a$). RON simples foram localizadas nos braços curtos do par 5, coincidentes com sítios de DNAr 18S. Já os sítios de DNAr 5S foram localizados na região pericentromérica dos pares 23 e 27, com uma quinta marcação adicional evidenciada na região intersticial de um dos homólogos do par 8 para indivíduos de ambiente não poluído. Sítios teloméricos intersticiais não foram evidenciados. Quanto à heterocromatina, foram encontradas marcações na região centromérica, pericentromérica e terminal dos cromossomos, com blocos mais conspícuos em indivíduos de ambiente poluído. O retroelemento *Rex 3* apresentou-se disperso nos cromossomos dos indivíduos de ambiente não poluído e compartimentalizado nos indivíduos de ambiente poluído. O teste do micronúcleo não revelou diferenças significativas nas comparações par a par entre os ambientes e entre os locais de coleta. O mapeamento de sequências repetitivas de DNA revelou que os micronúcleos possuem composição diferencial, intra e interindividualmente. Estes dados indicam que o ambiente está promovendo uma organização diferencial do genoma, onde diferentes porções são perdidas na formação de micronúcleos e não há uma única região frágil que sofre quebras, apesar de elementos repetitivos de DNA estarem envolvidos neste processo.

4.1.1 Introdução

A heterocromatina destaca-se atualmente como uma parte importante no genoma dos eucariotos (Grewal e Jia, 2007; Skipper, 2007; Buhler, 2009) podendo exercer diversas funções, tais como auxiliar na segregação cromossômica e na regulação da expressão gênica associadas às respostas ambientais, além de outras funções adicionais (Burt e Trivers, 2006; Varriale *et al.*, 2008; Buhler, 2009). Em peixes, é uma região rica em sequências repetitivas, que se replica tardiamente (Artoni *et al.*, 1999; Grewal e Jia, 2007; Skipper, 2007; Buhler, 2009), destacando-se: as sequências de DNA repetitivas em tandem, que incluem os DNAs satélites e os DNAs ribossomais (DNAr), e as sequências de DNA repetitivas dispersas, abrangendo os elementos transponíveis (Phillips e Reed, 1996; Martins, 2007).

As sequências de DNA repetitivas desempenham um papel importante em processos adaptativos em vários organismos, uma vez que estão menos sujeitas as pressões seletivas quando comparadas com sequências de cópia simples (Burt e Trivers, 2006; Ridley, 2006; Martins, 2007; Bohne *et al.*, 2008; Ferreira e Martins, 2008; Varriale *et al.*, 2008; Schneider *et al.*, 2013a). Tais processos adaptativos podem estar relacionados com a variabilidade genética, que permite uma população se adaptar a um ambiente (Primack, 2006; 2008). Porém, o ambiente vem sofrendo severas interferências em decorrência da atividade antrópica (Moraes, 2000) e a biota aquática fica constantemente exposta ao grande número de substâncias tóxicas que são lançadas diariamente na água. Essas substâncias resultantes da atividade humana tem grande potencial genotóxico, de efeito cumulativo que pode resultar em sérios riscos a biota aquática (Ribeiro *et al.*, 2003; Arias *et al.*, 2007).

Como em todas as regiões do Brasil, atividades antropogênicas que resultam na contaminação dos corpos d'água também ocorrem na região Amazônica, principalmente na cidade de Manaus, capital do Amazonas. A cidade encontra-se situada na confluência entre o rio Negro e o rio Solimões e é atravessada por duas sub-bacias hidrográficas afluentes do rio Negro: igarapé do Mindu e igarapé do Quarenta (Thomas *et al.*, 2014). Devido às precariedades das moradias nas margens desses igarapés, parte do lixo, esgoto sanitário doméstico e resíduos industriais são rotineiramente despejados nestes corpos d'água diminuindo a qualidade da água (Silva, 1996; Elias e Silva, 2001).

A interação entre os organismos vivos e o ambiente pode promover modificações no genoma que, quando positivas, resultam em adaptações do organismo à melhor exploração do habitat (Minissi e Lombi, 1997; Pascalicchio, 2002; Bombassaro, 2007). No entanto, nem

sempre as modificações no genoma são positivas. Por exemplo, a ação de agentes genotóxicos tendem a promover modificações químicas no DNA, que em muitos casos são prejudiciais às células, mesmo com os sistemas sofisticados de identificação e no reparo do DNA danificado pelas células. Alterações cromossômicas e aumento significativo de micronúcleos em células sanguíneas foram associados com a exposição de agentes genotóxicos (Costa e Menk, 2000; Ribeiro *et al.*, 2003; Fernandes, 2005; Obiakor *et al.*, 2012).

O teste do micronúcleo (MN) (Schmid, 1976; Pantaleão *et al.*, 2006; Hovhannisyan, 2010) tem sido bastante recomendado para estudos de biomonitoramento ambiental (Bucker *et al.*, 2006; Arias *et al.*, 2007; Pantaleão, 2008), principalmente por sua capacidade de avaliar qualitativamente a ação de agentes clastogênicos e de agentes aneugênicos (Al-Sabti, 1991; Fenech, 2000; Ribeiro *et al.*, 2003; Luzhna *et al.*, 2013; Melo *et al.*, 2014). Certamente, os peixes receberam uma atenção especial, por serem eficientes bioindicadores da qualidade ambiental, uma vez que são capazes de metabolizar xenobióticos e poluentes acumulados no meio aquático (De Flora *et al.*, 1993; Matsumoto *et al.*, 2006; Vanzella *et al.*, 2007; Lins *et al.*, 2010), além de desempenhar funções diferentes na cadeia trófica e de bioacumular contaminantes dissolvidos na água (Lopes-Poleza, 2004; Souza e Fontanetti, 2007).

Contudo, poucas espécies de peixes conseguem sobreviver tanto nos igarapés urbanos poluídos, quanto nos diferentes tipos de águas amazônicas, classificadas em águas brancas, claras e pretas, cada qual com características físico-químicas distintas (Sioli, 1950). Uma das espécies que possui esta capacidade é o *Hoplosternum littorale*, popularmente conhecido como tamoatá. O tamoatá tem ampla distribuição nos rios que compõe a bacia local de Manaus, incluindo os riachos que sofrem com a eutrofização humana, provocadas por substâncias provenientes de efluentes doméstico e industrial. Ainda, estes peixes apresentam um grande valor comercial, uma vez que são bastante consumidos pela população ribeirinha como fonte de alimento (Santos *et al.*, 2006; Soares *et al.*, 2008; Sá-Oliveira *et al.*, 2011).

Parte da capacidade adaptativa do tamoatá pode estar relacionada com a composição e localização da heterocromatina, que pode estar organizada diferencialmente de acordo com o ambiente que o indivíduo vive. Dados citogenéticos disponíveis para a espécie não revelaram diferenças quanto à macroestrutura cariotípica entre indivíduos coletados em ambiente natural e poluído, mas várias questões estão em aberto quanto a sua organização genômica. Assim, o objetivo deste estudo foi verificar a presença de danos no genoma dos indivíduos e mapear sequências repetitivas de DNA em cromossomos mitóticos e micronúcleos, visando compreender se ocorre organização genômica diferencial entre indivíduos que vivem em

ambiente natural ou antropizado e se as sequências repetitivas de DNA são perdidas na formação de micronúcleos.

4.1.2 Material e Métodos

Setenta e dois indivíduos com tamanho médio de 20 cm de comprimento foram coletados para análise de micronúcleos, sendo 16 do lago Catalão, localizado na confluência dos rios Negro e Solimões (3°09'25"S 59°54'49"W) e 16 do lago da Marchantaria, no rio Solimões (3°13'22.30"S 59°55'14.59"W), considerados ambientes quimicamente não poluídos devido ao seu grande volume de água (Pinto *et al.*, 2009). Ainda, 25 indivíduos foram coletados no igarapé do Mindu (3°04'53.27"S 60°00'25.21"W) e 15 no igarapé do Quarenta (3°07'49.48"S 60°00'25.21"W), apontados como pontos mais críticos de poluição ambiental em Manaus, AM, Brasil (Pinto *et al.*, 2009). Dentre os 72 indivíduos, 40 tiveram seus cromossomos mitóticos analisados, sendo amostrados de cada localidade cinco machos e cinco fêmeas. As capturas dos exemplares foram efetuadas com permissão do ICMBIO (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - Licença permanente no. 28095-1/2011). Os peixes foram eutanasiados seguindo as recomendações das Diretrizes da Prática da Eutanásia do Concea (Concea, 2013). Após mortos, foi coletado amostras do órgão hematopoiético de cada indivíduo para a obtenção de preparações cromossômicas, tecido muscular para extração do DNA e amostra sanguínea para efetuar análise de micronúcleos. Todos os procedimentos foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (no. 017/2014).

Obtenção de cromossomos mitóticos, detecção das regiões organizadoras de nucléolo (RON) e detecção da heterocromatina constitutiva (Banda C)

Os cromossomos mitóticos foram obtidos a partir de células renais, utilizando o protocolo descrito por Bertollo *et al.* (1978). Para a detecção das regiões organizadoras de nucléolo (RONS) foi utilizada a técnica descrita por Howell e Black (1980), e heterocromatina constitutiva (Banda C) foi detectada pela técnica descrita por Sumner (1972).

Análise dos micronúcleos

Para a confecção das lâminas de esfregaço sanguíneo foi utilizado o protocolo descrito por Fenech *et al.* (2003). O número de micronúcleos dos peixes coletados em águas poluídas e não poluídas foi comparada por Análise de Variância (ANOVA). Nesse modelo, amostras dos peixes dos dois ambientes poluídos (igarapés do Mindu e do Quarenta) foram comparados com peixes coletados nos dois ambientes não poluídos (lago Catalão e lago da Marchantaria).

Para controlar o efeito do local, as amostras dos peixes foram aninhadas aos respectivos locais de coleta e estes, a qualidade da água (poluída ou não poluída). Além disso, usamos Análises de Variância (ANOVA) para comparar o número de micronúcleos entre os dois igarapés poluídos e o número de micronúcleos entre os dois corpos d'água não poluídos. Análises de resíduos foram usadas para investigar a distribuição dos resíduos dos modelos e assegurar que as premissas do teste não foram violadas. Todas as análises foram realizadas no programa estatístico R (R Core Team, 2014).

Extração de DNA, Obtenção de sequências repetitivas de DNA por reação em cadeia da polimerase (PCR) e marcação por nick translation

O DNA genômico de *H. littorale* foi extraído a partir do tecido muscular utilizando o protocolo básico de Sambrook e Russel (2001). Para a amplificação por PCR dos DNAr 18S e 5S foram utilizados os *primers*: 18Sf (5'-CCG CTT TGG TGA CTC TTG AT-3') e 18Sr (5'-CCG AGGACC TCA CTA AAC CA-3') (Gross *et al.*, 2010), 5Sa (5' -TACGCCCCGATCTCGTCCGATC -3') e 5Sb (5'-CAGGCTGGTATGGCCGTAAGC -3') (Martins e Galetti, 1999). Para amplificação do retrotransposon *Rex 3* foi utilizado o conjunto de *primer* 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; 2001). As reações de PCR foram realizadas para volume final de 15 µL contendo 1 µL de DNA genômico (100 ng), 1,5 µL de Tampão 10X com cloreto de magnésio (1,5 mM), 0,15 µL de Taq DNA polimerase (5U/µL), 3,0 µL de dNTP (1 mM), 0,6 µL de cada primer (5 mM), água milli-Q para completar o volume. Os ciclos de amplificação seguiram as seguintes etapas: a) 18S: 2 minutos a 94 °C (desnaturação inicial), 35 ciclos de 1 minuto a 95 °C (desnaturação), 1 minuto a 55 °C (ligação dos *primers*), 1 minuto e 40 segundos a 72 °C (extensão), 7 minutos a 72 °C (extensão final); b) 5S: 1 minuto a 94 °C (desnaturação inicial), 30 ciclos de 1 minuto a 94 °C (desnaturação), 1 minuto a 59 °C (ligação dos *primers*), 1 minuto e 30 segundos a 72 °C (extensão), e 5 minutos a 72 °C (extensão final) e c) *Rex 3*: 2 minutos a 95 °C (desnaturação inicial), 35 ciclos de 1 minuto a 95 °C (desnaturação), 40 segundos a 55 °C (ligação dos *primers*), 2 minutos a 72 °C (extensão), 5 minutos a 72 °C (extensão final). Para à amplificação de sequências teloméricas (TTAGGG)_n foram utilizados os *primers* (TTAGGG)₅ e (CCCTAA)₅ (Ijdo *et al.*, 1991), no volume final de 15 µL, contendo no mix 1,5 µL de Tampão 10X com cloreto de magnésio (1,5 mM), 0,15 µL de Taq DNA polimerase (5U/µL), 3,0 µL de dNTP (1 mM), 0,6 µL do primer (TTAGGG)₅, 0,6 µL do primer (CCCTAA)₅ (5 mM) e água milli-Q para completar o volume. A primeira parte da amplificação foi feita em baixa estringência: 4 minutos a 94 °C

(desnaturação inicial), 12 ciclos de 1 min a 94 °C (desnaturação), 45 segundos a 52 °C (ligação dos *primers*) e 1 minuto e 30 segundos a 72 °C (extensão); seguida por 35 ciclos de alta estringência: 1 minuto a 94 °C (desnaturação), 1 minuto e 30 segundos a 60 °C (ligação dos *primers*) e 1 minuto e 30 segundos a 72 °C (extensão), 7 minutos a 72 °C (extensão final). Os produtos de PCR foram utilizados como sondas, que foram marcadas pelo método de *nick translation* utilizando biotina 14-dATP (Bionick labeling system-Invitrogen) e/ou digoxigenina-11-dUTP (Dig-Nick Translation mix Roche), seguindo as instruções do fabricante. Sondas de DNAr 5S foram marcadas com biotina 14-dATP, enquanto que sondas de DNAr 18S, *Rex 3* e sequências teloméricas foram marcadas com digoxigenina-11-dUTP.

Hibridização in situ por fluorescência (FISH)

Hibridizações foram realizadas de acordo com o protocolo descrito por Pinkel *et al.* (1986), com estringência de 77% (2,5 ng/μl de DNAr 18S ou DNAr 5S ou *Rex 3* ou sondas teloméricas, 50% formamida, 10% sulfato de dextrano e 2x SSC a 37 °C à overnight). Os anticorpos Avidina-FITC (Sigma-Aldrich), anti-avidina biotilada (Sigma-Aldrich), e anti-digoxigenina rodamina (Roche) foram usados para detecção e amplificação do sinal da sonda e os cromossomos foram contracolorados com DAPI (2 μg /ml) em meio de montagem VectaShield (Vector).

Análise cariotípica

Os cromossomos foram analisados em microscópio de epifluorescência Olympus BX51, as imagens capturas com câmera digital (Olympus DP71), usando o software Image-Pro MC 6.3. As metáfases foram editadas no programa Adobe Photoshop 7.0, versão CS5. Os cromossomos foram medidos no programa Image J e classificados de acordo com a nomenclatura proposta por Levan *et al.* (1964). Para determinação do número fundamental foram considerados cromossomos portadores de dois braços os metacêntricos e submetacêntricos e portador de um braço os acrocêntricos.

4.1.3 Resultados

Caracterização cromossômica

Número diplóide igual a $2n = 60$ cromossomos, sem presença de cromossomos sexuais diferenciados, foram evidenciados para indivíduos das quatro localidades, sendo 4 pares de metacêntricos, 4 de submetacêntricos e 52 pares acrocêntricos ($4m + 4sm + 52a$) e o número fundamental (NF) igual a 68.

Com relação à distribuição da heterocromatina constitutiva foram evidenciadas diferenças sutis entre as localidades analisadas. As marcações heterocromáticas são predominantemente encontradas na região centromérica na maioria dos cromossomos mitóticos, bem como na região pericentromérica e terminal de alguns pares cromossômicos (Figura 2a, 2b, 2c). Contudo, nos indivíduos provenientes de ambientes poluídos (Figura 2b, 2c) os blocos heterocromáticos são mais conspícuos se comparados com indivíduos provenientes de ambientes considerados não poluídos (Figura 2a). Ainda, em indivíduos do igarapé do Quarenta as marcações heterocromáticas dos homólogos do par cromossômico 3 a diferenciam das demais, uma vez que apresentam marcações biteloméricas e centroméricas, além da maioria dos cromossomos apresentar marcações terminais evidentes, o que não é encontrado em indivíduos nas outras áreas (Figuras 2a, 2b).

Quanto à região organizadora de nucléolo, tanto indivíduos de ambientes com poluição quanto dos ambientes sem poluição apresentaram RON simples, com marcações na região terminal de ambos os homólogos do par 5 (Figura 2d), coincidente com a constrição secundária.

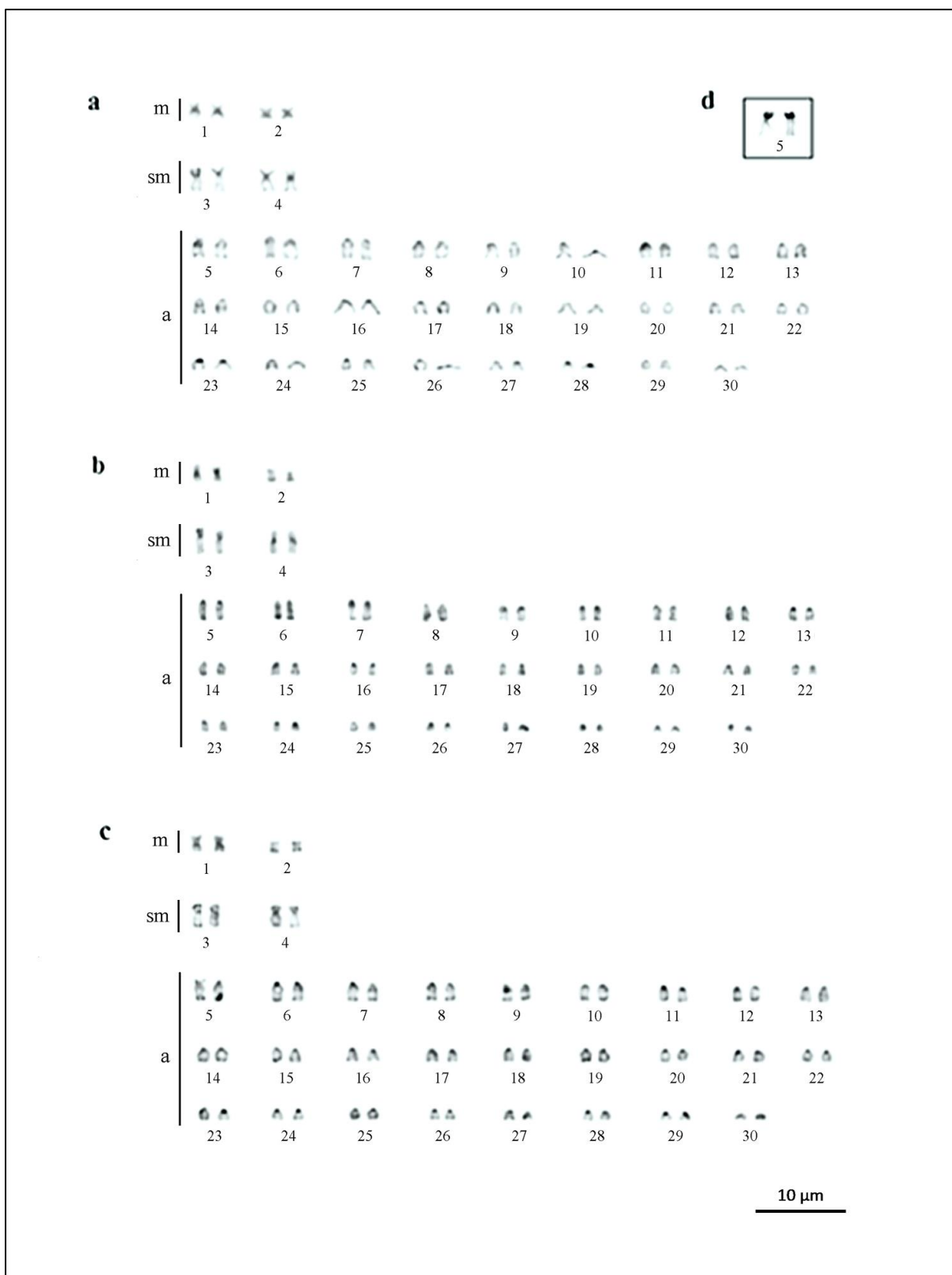


Figura 2 – Cariótipos de *H. littorale* submetidos ao bandamento C para evidenciar padrão de distribuição da heterocromatina em indivíduos provenientes do lago Catalão e lago da Marchantaria (a), igarapé do Mindu (b), igarapé do Quarenta (c); e a impregnação por nitrato de prata (d). Barra de escala igual 10 µm.

Sequências repetitivas em cromossomos mitóticos

Sítios de DNAr 18S foram localizados na região terminal dos braços curtos de ambos os homólogos do par 5, tanto para indivíduos de ambientes poluídos quanto não poluídos (Figura 3 sinais em vermelho). Contudo, um heteromorfismo de tamanho foi observado em todos os indivíduos provenientes dos ambientes poluídos (Figura 3b sinais em vermelho).

Os sítios de DNAr 5S não são sintênicos ao DNAr 18S, estando localizados na região pericentromérica de ambos os homólogos dos pares 23 e 27 (Figura 3 sinais em verde). Contudo, para todos os indivíduos provenientes de ambientes não poluídos (lago Catalão e o lago da Marchantaria), heteromorfismo de tamanho do sítio DNAr 5S foi observado no par 27, bem como uma quinta marcação foi evidenciada na região intersticial de um dos homólogos do par 8 (Figura 3a sinais em verde).

Nenhum sítio telomérico intersticial foi evidenciado, tanto para indivíduos provenientes de ambientes não poluídos (Figura 4a), como para os de ambientes poluídos (Figura 4b).

O retroelemento *Rex 3* em tamoatás provenientes do lago Catalão e do lago da Marchantaria, considerados ambientes não poluídos, apresentou uma distribuição dispersa nos cromossomos, com marcações pouco visíveis (Figura 5a). Em indivíduos oriundos do igarapé do Mindu foi evidenciado um acúmulo de *Rex 3* na região terminal dos homólogos do par 5, colocalizado na região do DNAr 18S, bem como maior distribuição deste retroelemento nos cromossomos do tipo metacêntrico e submetacêntrico, especialmente marcações na região centromérica, invadindo os braços curtos e longos dos pares (Figura 5b). Para os indivíduos do igarapé do Quarenta, além do acúmulo de *Rex 3* na região terminal de ambos os homólogos dos pares 5, 8 e 23, sítios com sinais de maior intensidade foram visualizados em toda a extensão dos cromossomos do tipo metacêntrico e submetacêntrico (pares 1, 2, 3 e 4), bem como em cromossomos do tipo acrocêntrico (Figura 5c).

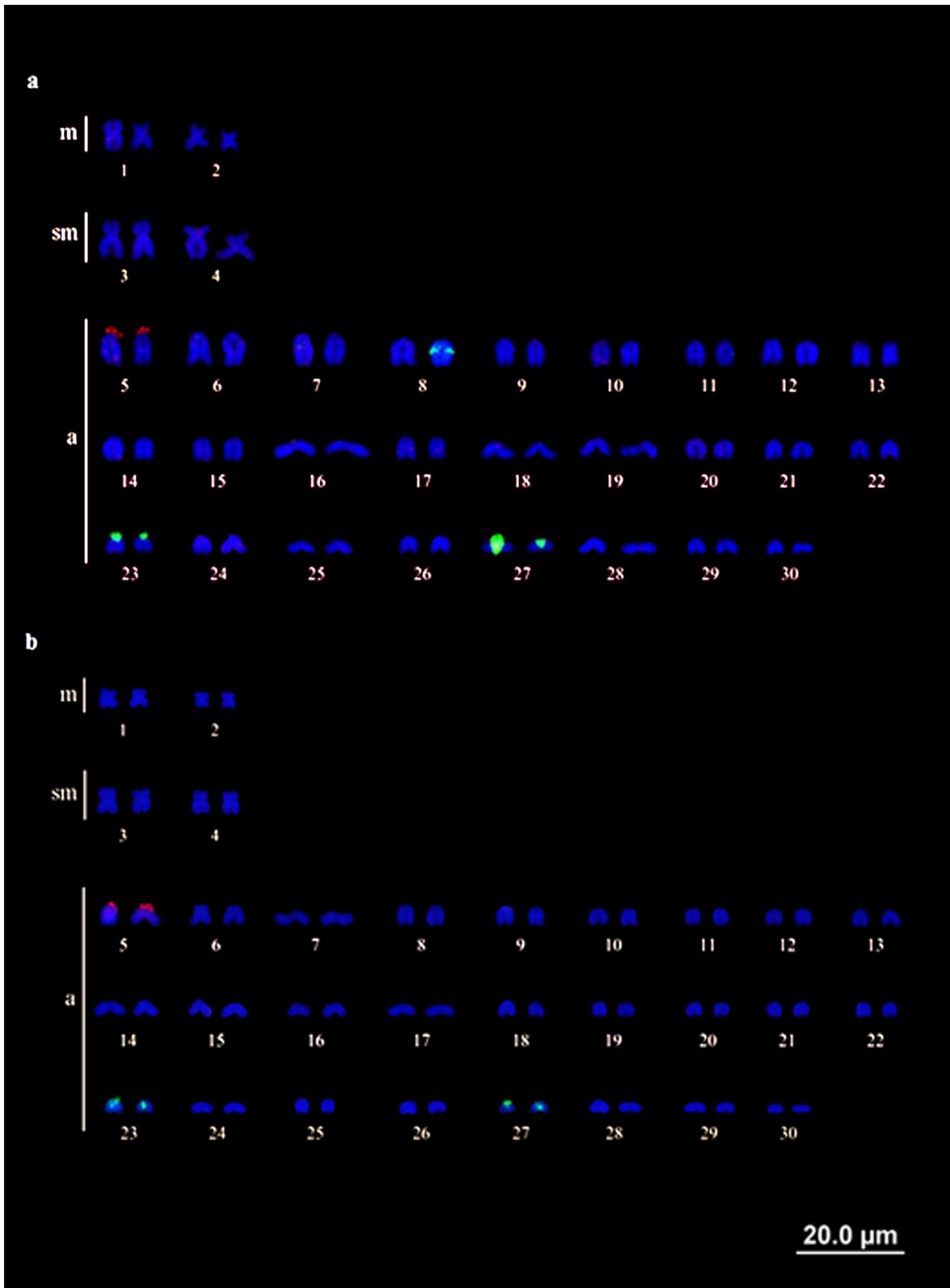


Figura 3 – Cariótipos de *H. littorale* evidenciando sítios de DNAr 18S (sinal vermelho) e DNAr 5S (sinal verde). (a) Ambientes não poluídos (lago Catalão e lago da Marchantaria); (b) Ambientes poluídos (igarapé do Mindu e igarapé do Quarenta). Os cromossomos foram contracolorados com DAPI. Barra de escala igual 20 μm.

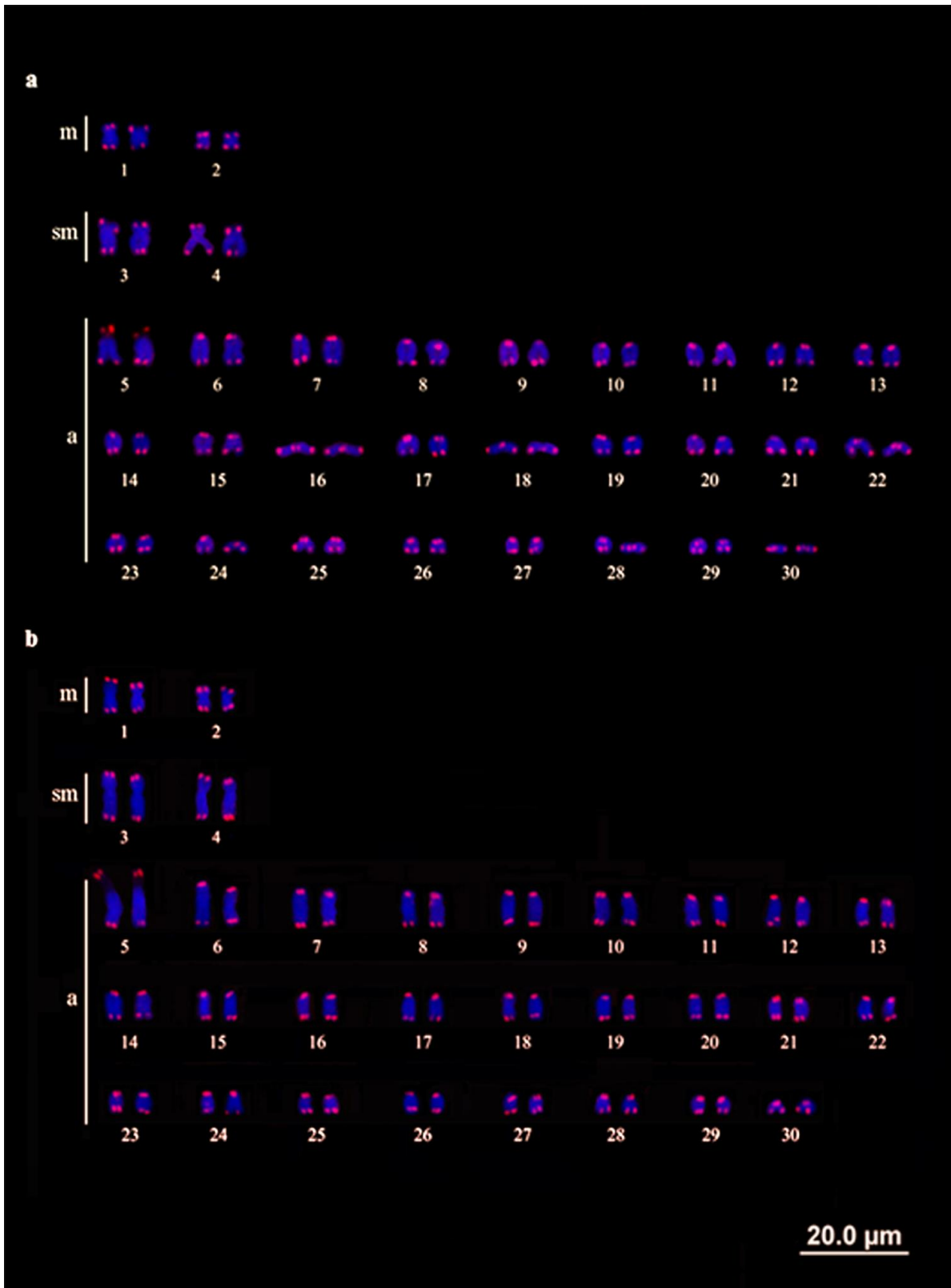


Figura 4 – Cariótipos de *H. littorale* evidenciando a localização física cromossômica das sequências teloméricas (sinais vermelhos). (a) Indivíduos provenientes de ambientes não poluídos; (b) Indivíduos provenientes de ambientes poluídos. Os cromossomos foram contracolorados com DAPI. Barra de escala igual 20 μm.

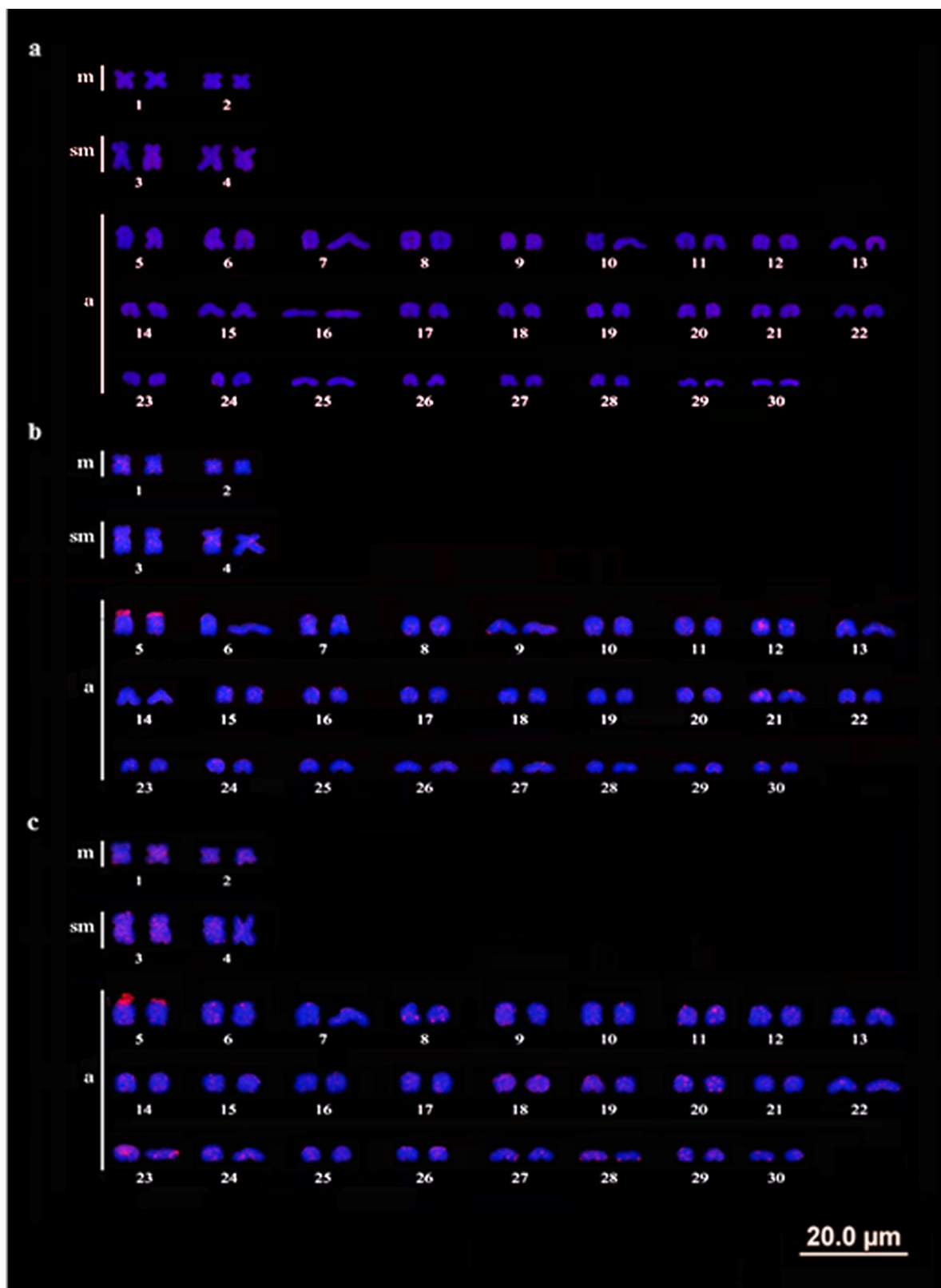


Figura 5 – Localização física cromossômica do retroelemento *Rex 3* (sinal vermelho) em cromossomos de *H. littorale* contracolorados com DAPI. Padrão encontrado em tamoatás provenientes de ambientes não poluídos (lago Catalão e lago da Marchantaria) (a); igarapé do Mindu (b) e igarapé do Quarenta (c). Barra de escala igual 20 μm.

Incidência de micronúcleos

Em média foram encontrados 2,68 micronúcleos por indivíduo do lago Catalão, 2,62 do lago da Marchantaria, 2,85 do igarapé do Mindu e 3,33 do igarapé do Quarenta (Figura 6). A quantidade de micronúcleos foi similar entre os ambientes poluídos e não poluídos, totalizando em média 2,656 micronúcleos por indivíduo provenientes dos ambientes não poluídos e 3,09 micronúcleos por indivíduo provenientes dos ambientes poluídos ($r^2 = 0,01$; $F_{3,68} = 0,456$; $p = 0,717$).

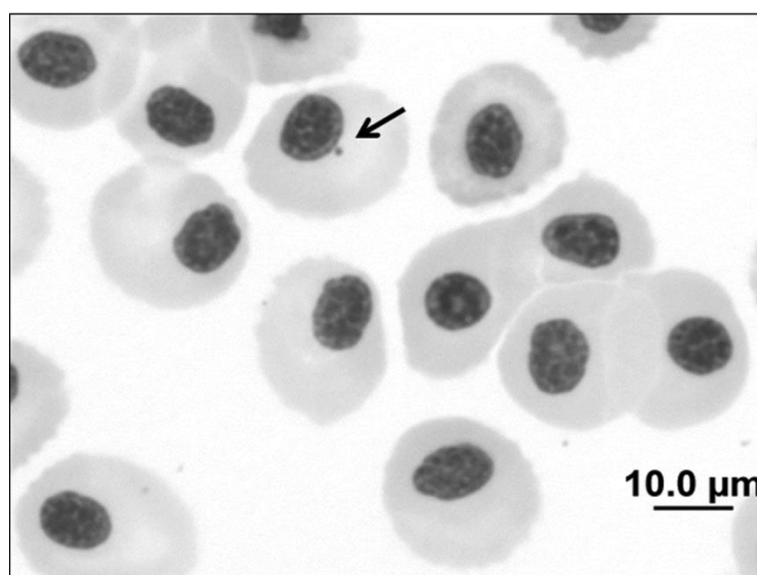


Figura 6 – Células eritrocitárias de *H. littorale* coradas com Giemsa (5%). Seta evidencia a presença de micronúcleo (aumento de 1000x). Barra de escala igual 10 μm .

A quantidade de micronúcleos também se manteve relativamente constante entre os amostras provenientes dos diferentes tipos de águas amazônicas (lago Catalão = água misturada x lago da Marchantaria = água branca; $r^2 < 0,01$; $F_{1,30} = 0,456$; $p = 0,923$), e entre os igarapés urbanos poluídos de Manaus submetidos a diferentes tipos de poluição (igarapé do Mindu = efluentes domésticos x igarapé do Quarenta = efluentes industrial; $r^2 = 0,02$; $F_{1,38} = 0,456$; $p = 0,434$).

Composição dos micronúcleos

O mapeamento de sequências repetitivas de DNA na cromatina de células sanguíneas de *H. littorale*, revelou que a composição dos micronúcleos não é constante, sendo que cada micronúcleo possui uma composição genômica típica e variável intra e interindividualmente.

Sítios de DNAr 18S foram observados em alguns micronúcleos de indivíduos de ambientes poluídos e não poluídos, bem como em núcleos interfásicos (Figura 7a, 7b, 7c). Já os sítios de DNAr 5S, apesar de presentes nos núcleos interfásicos, não foram observados em nenhum micronúcleo (Figura 7d, 7e, 7f).

Ainda, acúmulo de *Rex 3* em alguns micronúcleos foi evidenciada, bem como sua distribuição na porção periférica dos núcleos (Figura 8a, 8b, 8c). Quanto às sondas de sequências teloméricas, a FISH não revelou sítios de hibridização nos micronúcleos encontrados, apesar de estarem presentes nos núcleos interfásicos (Figura 8d, 8e, 8f).

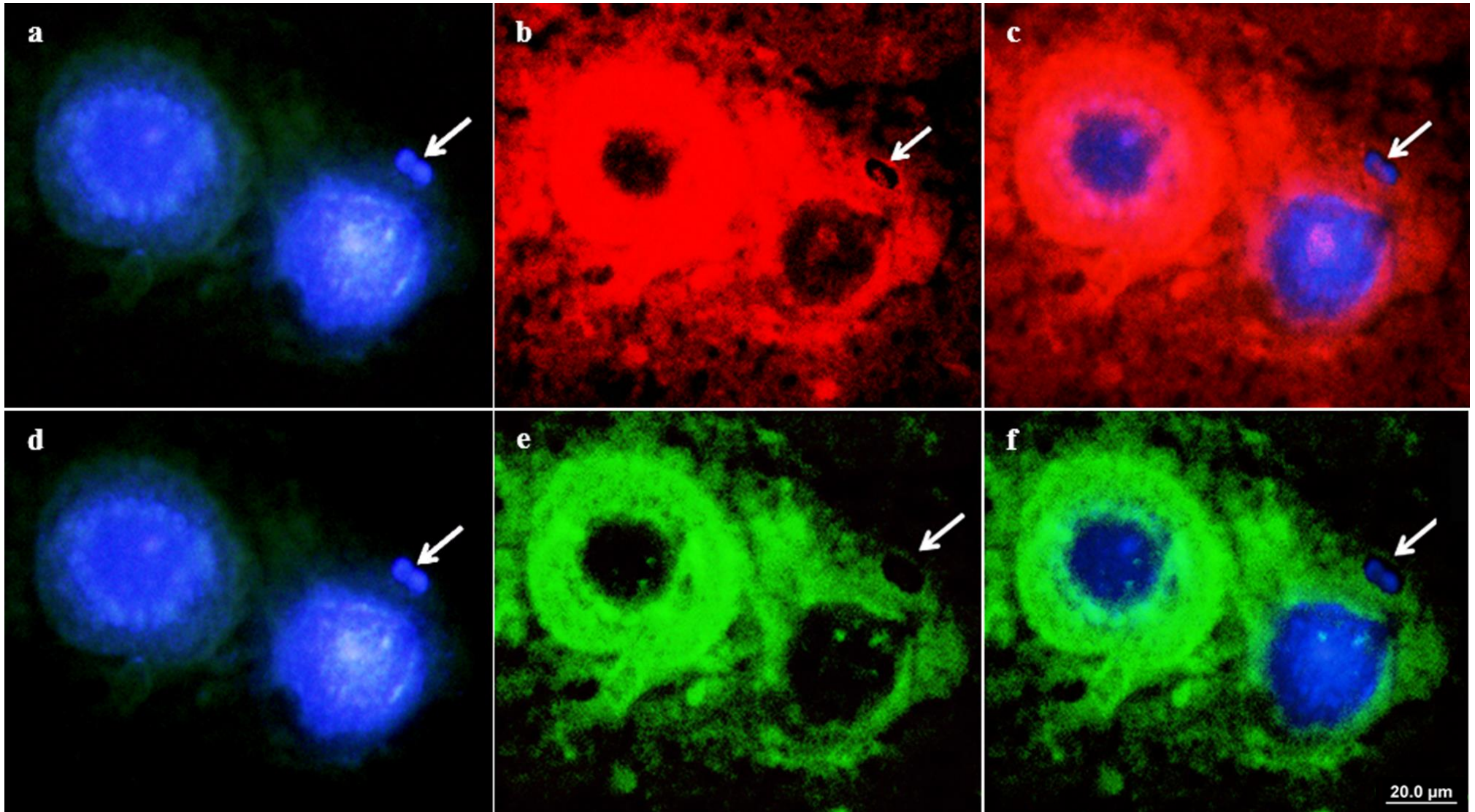


Figura 7 – Hibridização de seqüências de DNAr 18S (a-b-c) e DNAr 5S (d-e-f) em células de esfregaços sanguíneos de *H. littorale*. (a, d) Núcleos interfásicos e micronúcleos (setas) contracolorados com DAPI (azul); (b) DNAr 18S (vermelho) evidenciando sítios de hibridização em núcleos e micronúcleos; (c) Sobreposição das imagens a-b; (e) DNAr 5S (verde) evidenciando sítios de hibridização em núcleos e ausência em micronúcleos; (f) Sobreposição das imagens d-e. Barra de escala igual 20 µm.

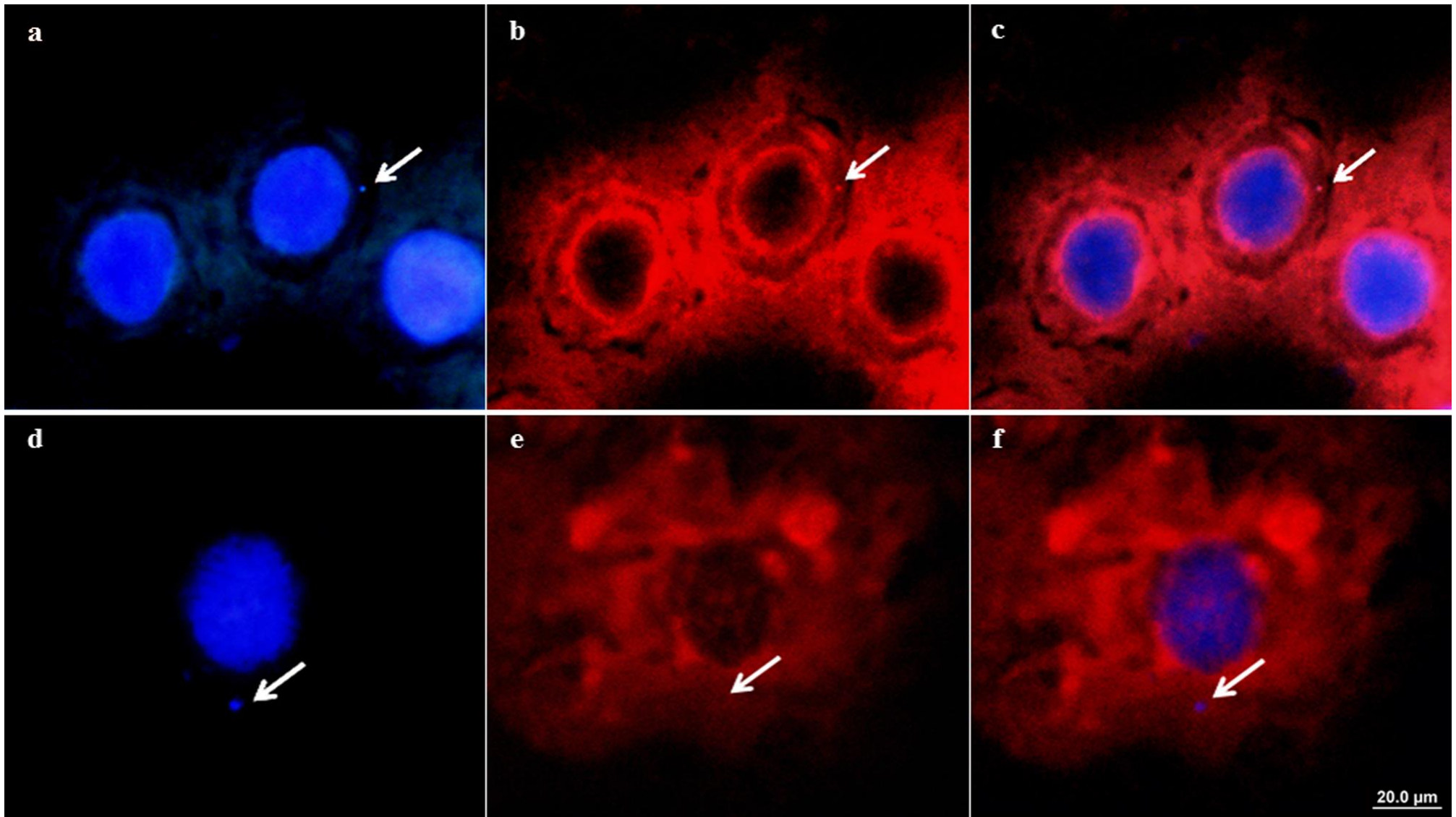


Figura 8 – Hibridização de seqüências de retroelemento *Rex 3* (a-b-c) e seqüências teloméricas de DNA (d-e-f) em células de esfregaços sanguíneos de *H. littorale*. (a, d) Núcleos interfásicos e micronúcleos (setas) contracolorados com DAPI (azul); (b) *Rex 3* (vermelho) evidenciando sítios de hibridização em núcleos e micronúcleos; (c) Sobreposição das imagens a-b; (e) Seqüência telomérica de DNA (vermelho) evidenciando sítios de hibridização em núcleos e ausência em micronúcleos; (f) Sobreposição das imagens d-e. Barra de escala igual 20 µm.

4.1.4 Discussão

Famílias como Loricariidae e Callichthyidae possuem subfamílias que apresentam uma ampla variação em seu número cromossômico (Oliveira *et al.*, 1988; Brum e Galetti Jr, 1997; Artoni e Bertollo, 2001; Bueno *et al.*, 2012). *Hoplosternum littorale* pertencente à família Callichthyidae, subfamília Callichthyinae, cujas espécies possuem de $2n = 52$ a $2n = 66$ cromossomos (Porto *et al.*, 1992; Oliveira *et al.*, 1993), aparente possui homogeneidade intraespecífica quanto ao número diploide. Apesar de serem portadores de 60 cromossomos, diferentes fórmulas cariotípicas são encontradas para *H. littorale* (tamoatás) de diferentes localidades (Tabela 1), indicando que parte desta variabilidade pode estar relacionada com a dificuldade de classificação dos cromossomos (Almeida *et al.*, 2012) ou a presença de rearranjos cromossômicos estruturais (Porto e Feldberg, 1992).

Sequências teloméricas fornecem um *insight* quanto a rearranjos cromossômicos que ocorrem durante a evolução cariotípica de diversos grupos (Martins e Wasko, 2004; Supiwong *et al.*, 2013). Porém, sítios teloméricos intersticiais (ITS) não foram evidenciados em *H. littorale* no presente estudo, o que sugere que: a) ausência de ITS indica que rearranjos recentes do tipo fusão ou translocações cromossômicas podem não estar envolvidos na evolução cariotípica dos tamoaatás, apesar de rearranjos estruturais não envolvendo os telômeros estarem presentes; b) estas sequências, quando internamente, estão livres de pressão seletiva, podendo sofrer mutações e originar novas classes de DNA repetitivos, os quais podem ficar alocados ou não em regiões heterocromáticas (Mandrioli *et al.*, 1999; DeBaryshe e Pardue, 2011).

Tabela 1 – Dados citogenéticos clássicos e moleculares disponíveis para *Hoplosternum littorale*

Localidade	Fórmula cariotípica	Padrão de distribuição da heterocromatina	Localização da região organizadora de nucléolo	Hibridização fluorescente <i>in situ</i>	Referência
Bacia do rio Amazonas, AM, Brasil	6m + 2sm + 2st + 50a	–	Par 7	–	Porto e Feldberg (1992)
Estação Aquicultura Experimental, Pirassununga, SP, Brasil	4m + 4sm + 52a	c, i	Par não identificado	–	Oliveira <i>et al.</i> (1993)
Bacia do Rio Grande, SP, Brasil*	6m + 2sm + 52a	c, i	Par não identificado	–	Oliveira <i>et al.</i> (1993)
Bacia do rio Guaíba, RS, Brasil	6m + 2sm + 52a	c, i	Par 8	–	Shimabukuro-Dias <i>et al.</i> (2005)
Bacia do rio Paranapanema, SP, Brasil	6m + 2sm + 52a	c, i	Par 8	–	Shimabukuro-Dias <i>et al.</i> (2005)
Bacia do rio Piraí, MT, Brasil	6m + 2sm + 52a	c, i	Par 8	–	Shimabukuro-Dias <i>et al.</i> (2005)

Bacia da costa do Sudeste, Brasil	6m + 2sm + 52a	sut, i	Par 6	DNAr 18S: par 6 DNAr 5S: 2 pares acrocêntricos	Pazza <i>et al.</i> (2005)
Bacia do rio Orinoco, Venezuela	4m + 4sm + 52st-a	c, p, i	Par 5	–	Nirchio <i>et al.</i> (2006)
Bacia do rio de Contas, BA, Brasil	6m + 2sm + 52a	c, i	Par 6	DNAr 18S: par 6 DNAr 5S: 2 pares acrocêntricos pequenos	Almeida <i>et al.</i> (2012)
Lago Catalão, Iranduba, AM, Bacia Amazônica, Brasil	4m + 4sm + 52a	–	–	Rex 3 disperso na maioria dos cromossomos	Gross <i>et al.</i> (2012)
Igarapé do Quarenta, Manaus, AM, Bacia Amazônica, Brasil	4m + 4sm + 52a	–	–	Rex 3 compartimentalizado nos maiores cromossomos	Gross <i>et al.</i> (2012)
Lago Catalão, Iranduba, AM, Bacia Amazônica, Brasil	4m + 4sm + 52a	c, p, t	Par 5	DNAr 18S: par 5 DNAr 5S: pares 8, 23 e 27 Telômeros: ausência de ITS Rex 3 disperso nos cromossomos	Presente estudo

Lago da Marchantaria, Iranduba, AM, Bacia Amazônica, Brasil	4m + 4sm + 52a	c, p, t	Par 5	DNAr 18S: par 5 DNAr 5S: pares 8, 23 e 27 Telômeros: ausência de ITS <i>Rex 3</i> disperso nos cromossomos	Presente estudo
Igarapé do Mindu, Manaus, AM, Bacia Amazônica, Brasil	4m + 4sm + 52a	c, p, t	Par 5	DNAr 18S: par 5 DNAr 5S: pares 23 e 27 Telômeros: ausência de ITS <i>Rex 3</i> compartimentalizado em alguns cromossomos	Presente estudo
Igarapé do Quarenta, Manaus, AM, Bacia Amazônica, Brasil	4m + 4sm + 52a	c, b, p, t	Par 5	DNAr 18S: par 5 DNAr 5S: pares 23 e 27 Telômeros: ausência de ITS <i>Rex 3</i> compartimentalizado em todos os cromossomos	Presente estudo

^{*} - Citado como *Hoplosternum* sp.
c-centroméricas; b-biteloméricas; t-terminal; i-intersticial; p-pericentroméricas; sut-subterminal
m-metacêntrico; sm-submetacêntrico; st-subtelocêntrico; a-acrocêntrico

Três padrões são descritos para tamoatás de diferentes regiões do Brasil e Venezuela quanto à distribuição da heterocromatina: a) blocos centroméricos e intersticiais (Oliveira *et al.*, 1993; Shimabukuro-Dias *et al.*, 2005; Almeida *et al.*, 2012); b) blocos subterminais e intersticiais (Pazza *et al.*, 2005) e c) blocos centroméricos, pericentroméricos e intersticiais (Nirchio *et al.*, 2006). Esta variação no padrão de heterocromatina é bastante comum dentro da família Callichthyidae devido à ocorrência de eventos de dispersão e amplificação de heterocromatina dentro do grupo (Oliveira *et al.*, 1993). No presente estudo, marcações heterocromáticas foram evidenciadas nas regiões centroméricas, pericentroméricas e terminais dos cromossomos, porém diferenças foram evidenciadas entre localidades amostradas, sendo possível observar marcações mais conspícuas em indivíduos provenientes de ambientes poluídos (igarapé do Mindu e igarapé do Quarenta).

Além disso, em indivíduos do igarapé do Quarenta, as marcações heterocromáticas dos homólogos do par 3 a diferenciam das demais com marcações biteloméricas e centroméricas, além de marcações terminais evidentes em todos os cromossomos. Este aumento de heterocromatina indica um processo de heterocromatinização ou adição de heterocromatina nestes indivíduos. Possivelmente, esta diferença pode ter ocorrido devido a trocas desiguais durante processos de *crossing over*, duplicações dessas sequências ou mesmo por mecanismos epigenéticos, como a metilação do DNA ou o remodelamento da cromatina (Grewal e Jia, 2007).

Assim, tais regiões heterocromáticas provavelmente desempenham um importante papel na plasticidade genômica desta espécie, apesar dela apresentar número diplóide constante. Gross *et al.* (2009) analisando três espécies de acarás-disco amazônicos (*Symphysodon* spp., Cichlidae), evidenciaram que o padrão heterocromático pode estar relacionado com o ambiente em que vivem, uma vez que cada espécie ocorre predominantemente em águas com padrões físico-químicos distintos. Evidências têm demonstrado que regiões heterocromáticas podem exercer funções adicionais, como a regulação da mitose, progressão do ciclo celular e na proliferação de células bem como, podem estar associadas a respostas a mudanças no ambiente (Burt e Trivers, 2006; Varriale *et al.*, 2008).

O mapeamento do DNAr 18S evidenciou sítios na região terminal do par 5 de cromossomos acrocêntricos, coincidentes com RONS. Porém, estes dados não corroboram o padrão descrito previamente para espécie, uma vez que foram localizados sítios ribossomais 18S na região terminal do par 6 de cromossomos acrocêntricos e coincidentes com a Ag-

RON em populações de tamoatás provenientes da bacia costeira do sudeste do Brasil (Pazza *et al.*, 2005) e em populações da bacia do rio de Contas, BA, Brasil (Almeida *et al.*, 2012). Esta diferença provavelmente está relacionada à subjetividade na montagem dos cariótipos ou mesmo pela presença de espécies crípticas distribuídas pelas bacias hidrográficas, como observado no trabalho de Mariguela *et al.* (2013) que evidenciaram uma alta divergência genética em populações de tamoatás provenientes de diferentes bacias hidrográficas da América do Sul, utilizando marcadores mitocondriais e nucleares.

Já os sítios de DNAr 5S em tamoatás dos dois tipos de ambientes amazônicos, foram localizados na região pericentromérica de dois pares de cromossomos, não havendo sintenia entre os sítios ribossomais 5S e 18S, corroborando com dados obtidos para tamoatás da região sul e sudeste do Brasil (Pazza *et al.*, 2005; Almeida *et al.*, 2012). Esta ausência de sintenia, ou seja, DNAr 5S e DNAr 18S localizados em diferentes pares de cromossomos, é característica comum entre os peixes, provavelmente porque os genes da família 45S são transcritos pela RNA polimerase I, enquanto que os genes 5S são transcritos pela RNA polimerase III (Martins, 2007).

Devido à natureza repetitiva dos DNAs ribossomais e de outras sequências encontradas na heterocromatina, erros da DNA polimerase na adição de nucleotídeos durante a duplicação do material genético e *crossing-over* desigual, podem ocasionar acúmulo de DNAr (Pendás *et al.*, 1993). Isto poderia explicar o heteromorfismo observado nos sítios de DNAr 5S e DNAr 18S nos tamoatás, como já foi observado para outros peixes e mamíferos (Ashley e Ward, 1993; Salvadori *et al.*, 1995; Boron *et al.*, 2006).

Ainda, uma quinta marcação foi evidenciada na região intersticial de um dos homólogos do par 8 de cromossomos acrocêntricos para tamoatás do lago Catalão e do lago da Marchantaria, considerados como ambientes não poluídos. Estes dados não são devidos a erros de hibridização com a técnica de FISH, uma vez que este processo foi realizado sob condições de alta stringência e efetuadas em replicatas com a utilização de sondas homólogas. Assim, é provável que haja associação destes sítios com outros elementos transponíveis (TEs), como evidenciado no presente estudo entre DNAr 18s e *Rex 3*. Casos de dispersão de sítios ribossomais por meio de TEs já foram evidenciados em outras espécies de peixes amazônicos (Gross *et al.*, 2009; Schneider *et al.*, 2013a). Como TEs são capazes de remover-se e inserir-se em outros locais no genoma e frequentemente se duplicam no decorrer deste processo (Wessler, 2006), podem gerar polimorfismos no sítio de sua inserção e apresentar variabilidade no número de cópias dentro e entre espécies (Hart *et al.*, 1992; Capy

et al., 1998; Volff *et al.*, 2003, Almeida e Carareto, 2005). Logo, como os peixes apresentam todos os tipos de TE já descritos (Volff *et al.*, 2003) podem favorecer a duplicação e/ou dispersão de cópias do DNAr 5S em tamoatás de ambientes não poluídos, gerando esta variabilidade no número de sítios, mesmo não havendo colocalização entre o DNAr 5S e *Rex 3* nesta espécie.

No presente estudo, verificou-se padrões distintos de distribuição do elemento transponível *Rex 3* nos cromossomos de tamoatás de ambientes não poluídos e ambientes poluídos. Em indivíduos provenientes do lago Catalão (água misturada) e do lago da Marchantaria (água branca), foi encontrado o mesmo padrão. Para espécies de *Semaprochilodus* provenientes de rios localizados na confluência dos rios Negro/Solimões (AM) e Amazonas/Tapajós (PA), também não revelaram padrões distintos na distribuição de *Rex 3* (Terencio *et al.*, 2013), o que sugere que as características físico-químicas das águas dos rios amazônicos nem sempre influenciam o padrão de distribuição destes elementos no genoma.

Porém, a organização genômica do *Rex 3* mostrou-se diferente entre os igarapés considerados como ambientes poluídos de Manaus, AM. Estes igarapés apresentam diferentes fontes de poluição em suas águas. Ainda, maior quantidade de *Rex 3* foi visualizado em ambientes poluídos, comparado com os indivíduos de ambientes não poluídos.

A composição de *Rex 3* em tamoatás do igarapé do Quarenta, que apresenta em suas águas efluentes industrial e doméstico (Pio *et al.*, 2014; Thomas *et al.*, 2014) evidenciou sinais de maior intensidade quando comparados com tamoatás do igarapé do Mindu, que apresenta contaminantes de esgotos domésticos e resíduos orgânicos em suas águas (Medeiros *et al.*, 2014). Silva (1996) e Melo *et al.* (2005) encontraram valores de temperatura das águas que variaram de 28,0 a 33,0 °C no igarapé do Quarenta e 26,0 a 29,3 °C no igarapé do Mindu, estando isso relacionados à falta da mata ciliar, oxidação biológica da matéria orgânica e lançamento de despejos industrial e doméstico. Além disso, Sioli (1985), Miranda *et al.* (2003), Melo *et al.* (2005) e Rodrigues *et al.* (2009) evidenciaram variação no aumento de pH, altas condutividades, baixos teores de oxigênio dissolvido, e altas concentrações de cátions e ânions nas águas destes igarapés, apresentando valores maiores no igarapé do Quarenta, indicando que as alterações nestes ecossistemas estão relacionadas às origens das fontes de poluição. Assim, o tipo de poluição possivelmente está influenciando a distribuição do retroelemento *Rex 3* de tamoatás de ambientes poluídos.

Geralmente TEs acumulam-se em regiões heterocromáticas do genoma de diversos grupos de peixes (Fischer *et al.*, 2004; Mazzuchelli e Martins, 2009; Gross *et al.*, 2009; Valente *et al.*, 2011; Schneider *et al.*, 2013b). No entanto, indivíduos do Igarapé do Quarenta apresentaram *Rex 3* tanto em regiões heterocromáticas quanto em regiões eucromáticas, e vários estudos indicam que tais sequências localizadas em regiões eucromáticas podem atuar na evolução do genoma, podendo influenciar na atividade gênica, como adquirir funções regulatórias e/ou funcionais (Fischer *et al.*, 2002; Biémont e Vieira, 2006; Yuan e Wessler, 2011; Torres *et al.*, 2011; Schneider *et al.*, 2013b; Terencio *et al.*, 2013).

Ainda, o sequenciamento de genomas tem demonstrado frequentes cópias curtas e truncadas de sequências de DNA repetitivo por toda a extensão de regiões eucromáticas presentes nos genomas de eucariotos (Fischer *et al.*, 2002; Biémont e Vieira, 2006; Yuan e Wessler, 2001; Torres *et al.*, 2011), as quais podem desempenhar um importante papel funcional ou estrutural no genoma da espécie.

Apesar da distribuição de *Rex 3* nos cromossomos de peixes provenientes de águas poluídas ser diferente de peixes de águas não poluídas, os danos no DNA permaneceram relativamente constantes ($p = 0,717$). Esse resultado sugere que o teste do micronúcleo não foi eficiente na avaliação de genotoxicidade de ambientes com diferentes condições ambientais. Da mesma forma, as diferenças físico-químicas encontradas naturalmente nos ambientes amazônicos não poluídos de água misturada e água branca, não estiveram correlacionadas com mudanças na quantidade de micronúcleos dos tamoatás ($p = 0,923$). Mesmo entre ambientes antropizados por efluentes de origem diferente (domésticos ou industriais), a quantidade de micronúcleos por indivíduo foi similar ($p = 0,434$).

Ainda, Palhares e Grisólia (2002), relataram que peixes podem apresentar frequências de micronúcleos variáveis de acordo com a localidade onde vivem, com o tipo de poluição e a estação do ano. Vale ressaltar que no presente estudo, as espécimes foram coletadas no período da seca dos rios, onde há uma maior concentração de poluentes presentes nas águas tanto por influência antrópica quanto naturalmente e que portanto, haveria uma maior exposição aos agentes genotóxicos, o que não foi corroborado no presente estudo.

O mapeamento das sequências de DNAr 18S, DNAr 5S, *Rex 3* e sequências teloméricas em micronúcleos eritrocíticos evidenciou que a composição de micronúcleos, além de não ser constante, pode ser bastante variável. Juchimiuk-Kwasniewska *et al.* (2010) utilizando sondas centroméricas, teloméricas, DNAr 25S e DNAr 5S em células da raiz da

cevada (*Hordeum vulgare*) para uma análise sobre efeitos da irradiação dos raios gama, também verificaram uma composição variável do micronúcleo. Além disso, a presença de DNAr 18S em micronúcleos de tamoatás pode implicar em problemas na produção de ribossomos, que são responsáveis pela síntese de proteínas. Além disso, o DNAr 18S mostrou-se ativo nos micronúcleos quando submetidos a impregnação por Nitrato de Prata. O primeiro trabalho com peixe foi realizado por Melo *et al.* (2014) utilizando marcadores de sondas SATA específico para região centromérica, que verificou efeitos adversos do rotenona (produto utilizado como pesticida e piscicida) em *Oreochromis niloticus* evidenciando seu potencial mutagênico na formação de micronúcleos e mostrando um efeito aneugênico desta substância na sua formação. Portanto, a formação dos micronúcleos apresenta mecanismos complexos quanto a sua origem, podendo ser compostos por uma ou mais sondas específicas hibridizadas.

Assim, a plasticidade genômica e o comportamento de elementos transponíveis parecem ter um importante papel em processos adaptativos (Burt e Trivers, 2006; Santos, 2012). Como a transposição destes elementos móveis não é um processo aleatório e que pode ser controlado por sinais celulares do hospedeiro e por fatores externos (Charlesworth e Langley, 1986; Deininger *et al.*, 2003; Almeida e Carareto, 2005; Burt e Trivers, 2006) estes dados indicam que o tipo de poluição pode estar influenciando na distribuição do retroelemento *Rex 3* no genoma de *H. littorale*.

5. Conclusões gerais

- Apesar de *H. littorale* apresentar homogeneidade intraespecífica quanto ao número diploide de $2n = 60$ cromossomos, características cromossômicas distintas foram evidenciadas para a espécie de ambientes poluídos e ambientes não poluídos.

- Análises de citogenética clássica de *H. littorale* corroboraram parcialmente com os dados já encontrados em estudos anteriores, divergindo apenas na localização dos pares portadores das regiões organizadoras de nucléolo (RON).

- Diferenças sutis na distribuição da heterocromatina constitutiva foram evidenciadas entre as localidades, com blocos mais conspícuos em indivíduos de ambientes poluídos.

- A distribuição do retroelemento *Rex 3* nos cromossomos possivelmente está sendo influenciada pelo tipo de poluição em *H. littorale* provenientes de diferentes tipos de ambientes poluídos, podendo ser usado como eficiente bioindicador de poluição ambiental.

- Não foram encontradas diferenças estatísticas significativas de micronúcleos entre tamoatás, indicando que o teste do micronúcleo não foi eficiente na avaliação da genotoxicidade de ambientes com diferentes condições ambientais.

- A formação dos micronúcleos apresenta mecanismos complexos quanto a sua origem, podendo ser compostos por uma ou mais sondas específicas hibridizadas.

- A evolução cariotípica dos tamoatás está baseada numa possível correlação entre acúmulo e movimentação de elementos repetitivos, ganho significativo de heterocromatina, processos de heterocromatinização e rearranjos cromossômicos.

6. Referências bibliográficas

Abdallah, V. D.; Azevedo, R. K.; Luque, J. L. 2006. Ecologia da comunidade de metazoários parasitos do tamboatá *Hoplosternum littorale* (Hancock, 1828) (Siluriformes: Callichthyidae) do Rio Guandu, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Acta Scientiarum Biological Sciences*, 28 (4): 413-419.

Almeida, L.M.; Carareto, C.M.A. 2005. *Origem, proliferação e extinção de elementos transponíveis: qual seria a importância da transferência horizontal na manutenção deste ciclo?* - Série Monografias SBG. Ribeirão Preto: SBG, p. 43.

Almeida, J. S. 2011. *Estudo citogenético em duas espécies da família Callichthyidae (Callichthyinae, Siluriformes) da bacia do Rio de Contas/Bahia*. Dissertação de Mestrado em Genética e Biologia Molecular. Universidade Estadual de Londrina, 78pp.

Almeida, J. S.; Affonso, P. R. A. M.; Dias, A. L. 2012. Remarkable Karyotypic homogeneity in a widespread tropical fish species: *Hoplosternum littorale* (Siluriformes, Callichthyidae). *Journal of Fish Biology*, 81: 1415-1421.

Almeida-Val, V. M. F.; Farias, I. P. 1996. Metabolic adjustments to chronic hypoxia. In: Val, A. L.; Almeida-Val, V. M. F.; Randall, D. J. (Org.). *Physiology and Biochemistry of the Fishes of the Amazon*. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas. p. 257-271.

Al-Sabti, R. 1991. Handbook of genotoxic effects and fish chromosomes. Ljubljana, Slovenia: *Joseph Stephan Institute*. p. 5-39.

Al-Sabti, K.; Metcalfe, C. D. 1995. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Research*, 343: 121-135.

Arias, A. R. L.; Buss, D. F.; Albuquerque, C.; Inácio, A. F.; Freire, M. M.; Egler, M.; Mugnai, R.; Baptista, D. F. 2007. Use of bioindicators for assessing and monitoring pesticides contamination in streams and rivers. *Ciências Saúde Coletiva*, 12(1): 61-72.

Artoni, R. F.; Molina, W. F.; Bertollo, L. A. C.; Galetti Jr., P. M. 1999. Heterochromatin analysis in the fish species *Liposarcus anisitsi* (Siluriformes) and *Leporinus elongates* (Characiformes). *Genet. Mol. Biol.*, 22(1): 39-44.

Artoni, R. F.; Bertollo, L. A. C. 2001. Trends in the karyotype evolution of Loricariidae fish (Siluriformes). *Heredity*, v. 134, p. 201-210.

- Ashley, T.; Ward, D. C. 1993. A hot spot of recombination coincides with interstitial telomeric sequence in the Armenian Amster. *Cytogenetic and Cell Genetics*, 62: 169-171.
- 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.
- Biémont, C.; Vieira, C. 2006. Junk DNA as an evolutionary force. *Nature*, 443: 521-524.
- Britto, M. 2003. Phylogeny of the subfamily Corydoradinae Hoedeman, 1952 (Siluriformes: Callichthyidae), with a definition of its genera. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, 153: 119-154.
- Böhne, A.; Brunet, F.; Galiana-Arnoux, D.; Schultheis, C.; Volff, J. N. 2008. Transposable elements as drivers of genomic and biological diversity in vertebrates. *Chromosome Research*, 16: 203-215.
- Bombassaro, J. U. 2007. *Análise genotóxica do complexo fosfatase ácida púrpura símile FeCuOHH₂BPBPMP em leucócitos totais e sangue total humano*. Trabalho de conclusão de curso - Curso de Medicina da Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC. Criciúma, 51pp.
- Boron, A.; Ozouf-Costaz, C.; Coutanceau, J. P.; Woroniecka, K. 2006. Gene mapping of 28S and 5S rDNA sites in the spined loach *Cobitis taenia* (Pisces, Cobitidae) from a diploid population and a diploid-tetraploid population. *Genetica*, 128: 71-79.
- Brum, M. J. I.; Galetti Jr, P. M. 1997. Teleostei ground plan karyotype. *Journal Comparative Biology*, 2: 91-102.
- Bueno, V.; Zawadzki, C. H.; Margarido, V. P. 2012. Trends in chromosome evolution in the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Osteichthyes, Loricariidae): a new perspective about the correlation between diploid number and chromosomes types. *Review in Fish Biology and Fisheries*, v. 22, p. 241-250.
- Bücker, A.; Carvalho, W.; Alves-Gomes, J. A. 2006. Avaliação da mutagênese e genotoxicidade em *Eigenmannia virescens* (Teleostei: Gymnotiformes) expostos ao benzeno. *Acta Amazonica*, 36(3): 357-364.
- Bühler, M. 2009. RNA turnover and chromatin-dependent gene silencing. *Chromosoma*, 118: 141-151.

- Burt, A.; Trivers, R. 2006. Genes in conflict: the biology of selfish genetic elements. Cambridge: *Harvard University Press*, p. 228-300.
- Capy, P.; Bazin, C.; Higuete, D.; Langin, T. 1998. Dynamics and evolution of transposable elements. Austin, Texas: *Landes Bioscience*, p. 197.
- Capy, P.; Gasperi, G.; Biémont, C.; Bazin, C. 2000. Stress and transposable elements: co-evolution or useful parasites? *Heredity*, 85: 101-106.
- Charlesworth, B.; Langley, C. H. 1986. The evolution of self-regulated transposition of transposable elements. *Genetics*, 112: 359-383.
- Cleto-Filho, S. E. N. 1998. *Efeitos da Ocupação Urbana sobre a Macrofauna de Invertebrados Aquáticos de um Igarapé da Cidade de Manaus/AM - Amazônia Central*. Manaus: Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia / Fundação Universidade do Amazonas.
- Costa, R. M. A.; Menk, C. F. M. 2000. Biomonitoramento de mutagênese ambiental. *Biotecnologia: Ciência & Desenvolvimento*, 12: 24-26.
- DeBaryshe, P. G.; Pardue, M. L. 2011. Differential maintenance of DNA sequences in telomeric and centromeric heterochromatin. *Genetics*, 187: 51-60.
- 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.
- Deininger, P. L.; Moran, J. V.; Batzer, M. A.; Kazazian-Jr, H. H. 2003. Mobile elements and mammalian genome evolution. *Current Opinion in Genetics & Development*, 13: 651-658.
- Elias, A. S. S.; Silva, M. S. R. 2001. Hidroquímica das águas e quantificação de metais pesados nos sedimentos das bacias hidrográficas de área urbana de Manaus, que deságuam no rio Negro. In: *X Jornada de Iniciação Científica do PIBIC/INPA*, Manaus. Anais. Manaus: INPA. p. 402-405.
- Fenech, M. 2000. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research*, 445: 81-95.
- Fenech, M.; Cheng, W.P.; Kirsch-Volders, M.; Holland, N.; Bonassi, S.; Zeiger, E. 2003. Humn project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research*, 534: 65-75.

- Ferraris, C. J. 2007. Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. New Zealand: *Magnolia Press*.
- Fernandes, T. C. C. 2005. *Investigação dos efeitos tóxicos, mutagênicos e genotóxicos do herbicida trifluralina, utilizando Allium cepa e Oreochromis niloticus como sistemas-testes*. Dissertação de Mestrado em Biologia Celular e Molecular, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP.
- Ferreira, I. A.; Martins, C. 2008. Physical chromosome mapping of repetitive DNA sequences in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*: Evidences for a differential distribution of repetitive elements in the sex chromosomes. *Micron*, 39: 411-418.
- Feschotte, C. 2004. Merlin, a new superfamily of DNA transposons identified in diverse animal genomes and related to bacterial IS1016 insertion sequences. *Molecular Biology and Evolution*, 21: 1769-1780.
- Fischer, C.; Bouneau, L.; Ozouf-Costaz, C.; Crnogorac-Jureevie, T.; Weissenbach, J.; Bernot, A. 2002. Conservation of the T-cell receptor alpha/delta linkage in the teleost fish *Tetraodon nigroviridis*. *Genomics*, 79: 241-248.
- Fisher, C. Bouneau, L.; Coutanceau, J. P. Weissenbach, J.; Volff, J. N.; Ozouf-Costaz, C. 2004. Global heterochromatic colocalization of transposable elements with minisatellites in the compact genome of the pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. *Gene*, 336: 175-184.
- Freita, V. S.; Lopes, M. A.; Meireles, J. R. C.; Reis, L. C.; Eneida, M. M. 2005. Efeitos genotóxicos de fatores considerados de risco para o câncer bucal. *Revista Baiana de Saúde Pública*, 29(2): 189-199
- 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.
- Galetti Jr, P. M.; Martins, C. 2004. Contribuição da hibridização *in situ* para o conhecimento dos cromossomos dos peixes. In: Guerra, M. (Eds). *FISH: Conceitos e Aplicações na Citogenética*. Editora da Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, Brasil. p. 61-88.
- Grewal, S. I. S.; Jia, S. 2007. Heterochromatin revisited. *Nature Reviews Genetics* 8: 35-46.
- Gross, M. C.; Schneider, C. H.; Valente, G. T.; Porto, J. I. R.; Martins, C.; Feldberg, E. 2009. Comparative cytogenetic analysis of the Genus *Symphysodon* (Discus fishes, Cichlidae):

- Chromosomal characteristics of retrotransposons and minor ribosomal DNA. *Cytogenetic and Genome Research* 1: 43-53.
- Gross, M. C.; Schneider, C. H.; Valente, G. T.; Martins, C.; Feldberg, E. 2010. Variability of 18S rDNA locus among *Symphysodon* fishes: chromosomal rearrangements. *Journal of Fish Biology*, 76: 1117-1127.
- Gross, M. C.; Schneider, C. H.; Terencio, M. L.; Ribeiro, L. B.; Moraes, B. N. G.; Azevedo, M. B.; Silva, F. A; Feldberg, E. 2012. Comparative analyses of the *Rex 3* repetitive elements in fish species from different Amazonian environments. In: Workshop Adaptations of Aquatic Biota, Manaus. *Short Notes - Adaptations of Aquatic Biota*. Manaus, AM.
- Hart, S.; Koch, K. R.; Woods, D. R. 1992. Identification of indigo-related pigments produced by *Escherichia coli* containing a cloned Rhodococcus gene. *Journal Genetics Microbiology*, 138: 211-216.
- Hovhannisyan, G. G. 2010. Fluorescence in situ hybridization in combination with the comet assay and micronucleus test in genetic toxicology: a review. *Molecular Cytogenetics*, 3(17): 1-11.
- 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.
- Ijdo, J. W.; Wells, R. A.; Baldini, A.; Reeders, S. T. 1991. Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)_n generated by PCR. *Nucleic Acids Research*, 19(17): 47-80.
- Juchimiuk-Kwasniewska, J.; Brodziak, L. Maluszynska, J. 2010. FISH in analysis of gamma ray-induced Micronuclei formation in barley. *J Appl Genetics*, 52: 23-29.
- Junk, W. J.; Bayley, P. B.; Sparks, R. E. 1989. The flood pulse concept in riverfloodplain systems. In: Dodge. D. P (ed). Proceedings of the International Large River Symposium. Can. Spec. Publ. Fish. Aquat. Sci. p. 106.
- Junk, W. J.; Bayley, P. B.; Sparks, R. E. 2011. A Classification of Major Naturally-Occurring Amazonian Lowland Wetlands. *Wetlands*, v. 1, p. 623-640.
- Kidwell, M. G. 2002. Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. *Genética*, 115: 49-63.

- Levan, A.; Fredga, K.; Sandberg, A. A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52: 201-220.
- Lins, J. A. P. N.; Kirschnik, P. G.; Queiroz, V. S.; Cirio, S. M. 2010. Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático. *Rev. Acad., Ciênc. Agrár. Ambient.*, Curitiba, v. 8, n. 4, p. 469-484.
- Lopes-Poleza, S. D. C. 2004. *Avaliação do efeito do metilmercúrio (CHHG+) em Hoplias malabaricu através da frequência de aberrações cromossômicas e dos ensaios Cometa e Micronúcleo*. Dissertação de Mestrado em Genética, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 70pp.
- Lowe-McConnell, R. H. 1975. Fish communities in tropical freshwaters. Their distribution, ecology and evolution. London and New York, *Longman*, p. 303.
- Luzhna, L.; Kathiria, P.; Kovalchuk O. 2013. Micronuclei in genotoxicity assessment: from genetics to epigenetics and beyond: Review. *Frontiers in Genetics*, v.4, p. 1-17.
- Mandrioli, M.; Cuoghi, B. C.; Marini, M.; Manicardi, G. C. 1999. Localization of the (TTAGGG)_n telomeric repeat in the chromosomes of the pufferfish *Tetraodon fluviatilis* (Hamilton Buchanan) (Osteichthyes). *Caryologia*, 52: 155-157.
- Mariguela, T. C.; Alexandrou, M. A.; Foresti, F.; Oliveira, C. 2013. Historical biogeography and cryptic diversity in the Callichthyinae (Siluriformes, Callichthyidae). *J Zool Syst Evol Res*, p. 1-8.
- Martins, C.; Galetti, P. M. 1999. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). *Chromosome Research*, 7: 363-367.
- Martins, C.; Wasko, A. P. 2004. Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish genome. In: Williams, C.R. (Eds) *Focus on Genome Research*. Nova Science Publishers, Hauppauge, NY, USA. p. 335-363.
- 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*. Science Publisher, Inc., Enfield, New Hampshire, USA. p. 421-453.
- Martins, C.; Cabral-de-Mello, D.C.; Valente, G.T.; Mazzuchelli, J.; Oliveira, S.G. 2011. In: *Advances in Genetics Research*, vol. 4 Kevin V Urbano (Ed.). Nova Science Publisher, Hauppauge, NY, USA. p. 1-82.

- Matsumoto, S. T.; Mantovani, M. S.; Malagutti, M. I. A.; Dias, A. L.; Fonseca, I. C.; Marin-Morales, M. A. 2006. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. *Genetics and Molecular Biology*, 29 (1): 148-158.
- Mazzuchelli, J.; Martins, C. 2009. Genomic organization of repetitive DNAs in the cichlid fish *Astronotus ocellatus*. *Genetica*, 136: 461-469.
- Medeiros, A. D.; Ferreira, P. R. G.; Bastos, W. R.; Lauthartte, L. C.; Santana, G. P. 2014. Geoestatística do mercúrio presente em sedimentos de fundo da orla do Rio Negro (Manaus-AM). *Scientia Amazonia*, v. 3, n. 2, p. 100-110.
- Melo, E. G.; Silva, M. S. R.; Miranda, S. A. F. 2005. Influência antrópica sobre águas de igarapés na cidade de Manaus - Amazonas. *Caminhos de Geografia*, n. 5, v. 16, p. 40-47.
- Melo, K. M.; Grisolia, C. K.; Pieczarka, J. C.; Souza, L. R.; Filho, J. S.; Nagamachi, C. Y. 2014. FISH in micronucleus test demonstrates aneugenic action of rotenone in a common freshwater fish species, Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Mutagenesis*, p. 1-5.
- Menezes, N. A.; Weitzman, S. H.; Oyakawa, O. T.; Lima, F. C. T.; Castro, R. M. C.; Weitzman, M. J. 2007. Peixes de água doce da Mata Atlântica: lista preliminar das espécies e comentários sobre a conservação de peixes de água doce Neotropical. São Paulo: *Museu de Zoologia*, Universidade de São Paulo.
- Minissi, S.; Lombi, E. 1997. Heavy metal content and mutagenic activity, evaluated by Vicia faba micronucleus test, of Tiber river sediments. *Mutation Research*, v. 39, p. 317-321.
- Miranda, S. A. F.; Silva, M. S. R.; Cunha, H. B.; Pinto, A. G. N. 2003. Diagnóstico da Situação dos Recursos Hídricos de Superfície, na Área Urbana do Município de Manaus, sob Ponto de Vista Hidroquímico. In: *I Simpósio de Recursos Hídricos da Amazônia*. Anais. Manaus-AM.
- Mol, J. H. 1995. Ontogenetic diet shifts and diet overlap among three closely related Neotropical armoured catfishes. *Journal of Fish Biology*, 47(5): 788.
- Moraes, D. S. L. 2000. *Avaliação dos potenciais tóxicos, citotóxicos e genotóxicos de águas ambientais de Corumbá-MS em raízes de Allium cepa*. Dissertação de Mestrado em Genética e Melhoramento, Universidade Estadual de Londrina, Paraná.

- Nelson, J. S. 1994. Fishes of the world. United States of America, Ed. Wiley John e Sons, 600pp.
- Nirchio, M.; Oliveira, C. 2006. Citogenética de Peces. 212pp.
- Nirchio, M.; Pérez, J.; Granado, A.; Ron, E. 2006. Conventional karyotype, constitutive heterocromatin, and nucleolar organizer regions, in *Hoplosternum littorale* (Pisces: Callichthyidae) from Caicara del Orinoco. *Agrobiologia* 18: 113-116.
- Obiakor M. O.; Okonkwo J. C.; Nnabude P. C.; Ezeonyejiaku C. D. 2012. Eco-genotoxicology: Micronucleus Assay in Fish Erythrocytes as *In situ* Aquatic Pollution Biomarker: a Review. *J Anim Sci Adv*, 2(1): 123-133.
- Oliveira, C.; Toledo, L. F. A.; Foresti, F.; Britski, H. A.; Toledo Filho, S. A. 1988. Chromosome formulae of Neotropical freshwater fishes. *Brasilian Journal of Genetics*, 11: 557-624.
- Oliveira, C.; Almeida-Toledo, L. F.; Toledo Filho, S. A. 1990. Comparative cytogenetic analysis in three cytotypes of *Corydoras nattereri* (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae). *Cytologia*, 55: 21-26.
- Oliveira, C.; Almeida-Toledo, L. F.; Mori, L.; Toledo-Filho, S. A. 1993. Cytogenetic and DNA content in six genera of the family Callichthyidae (Pisces, Siluriformes). *Caryologia* 46(2-3): 171-188.
- Palhares, D.; Grisolia, C. K. 2002. Comparison between the micronucleus frequencies of kidney and gill erythrocytes in tilapia fish, following mitomycin C treatment. *Genet Mol Biol*. 25(3): 281-84.
- Pascalichio, A. E. 2002. Contaminação por metais pesados. Ed. *Annablume*, São Paulo, 132pp.
- Pantaleão, S. M.; Alcântara, A. V.; Alves, J. P. H.; Spanó, M. A. 2006. The piscine micronucleus test to assess the impact of pollution on the Japarutuba River in Brazil. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 47(3): 219-224.
- Pantaleão, S. M. 2008. Impacto genotóxico de poluentes químicos presentes na água e sedimento do Rio Japarutuba (Sergipe). Pascalichio, A. E. 2002. Contaminação por metais pesados. Ed. *Annablume*, São Paulo/SP, p. 132.

- Pazza, R.; Kavalco, K. F.; Almeida-Toledo, L. F.; Bertollo, L. A. C. 2005. *Hoplosternum littorale* (Teleostei, Callichthyidae) from a Coastal River basin in Brazil – Cytogenetic analysis and gene mapping of 5S and 18S rDNA. *Caryologia* 58, 339-344.
- Pendás, A. M.; Morán, P.; Garcia-Vázquez, E. 1993. Ribosomal RNA genes are interspersed throughout a heterochromatic chromosome arm in Atlantic salmon. *Cytogenetic Cell Genet*, 63: 128-130.
- Phillips, R. B.; Reed, K. M. 1996. Application of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) techniques to fish genetics: a review. *Aquaculture*, 40: 197-216.
- 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.
- Pio, M. C. S.; Souza, K. S.; Santana, G. P. 2014. Capacidade da *Lemna aequinoctialis* para acumular metais pesados de água contaminada. *Acta Amazonica*, v. 43, n. 2, p. 203-210.
- Porto, J. I. R.; Feldberg, E.; Nakayama, C.; Falcão, J. N. 1992. A checklist of chromosome number and karyotypes of Amazonian freshwater fishes. *Revue D'Hydrobiologie Tropicale*, 25: 287-299.
- Porto, J. I. R.; Feldberg, E. 1992. Comparative cytogenetic study of the armored catfishes of the genus *Hoplosternum* (Siluriformes, Callichthyidae). *Revista Brasileira de Genética* 15: 359-367.
- Porto, J. I. R.; Feldberg, E. 1993. Is *Callichthys* Linné (Siluriformes, Callichthyidae) a monotypic genus? *Acta Amazonica*, v. 24, p. 311-314.
- Ramnarine, I. W. 1994. Larval culture, development and growth of the cascade, *Hoplosternum littorale* (Hancock, 1828; Callichthyidae). *Aquaculture*, 126: 291-298.
- Reis, R. E. 1998. Anatomy and phylogenetic analysis of the Neotropical Callichthyid catfishes (Ostariophysi, Siluriformes). *Zoological Journal Linnean Society*, 124: 105-168.

- Reis, R. E. 2003. Family Callichthyidae (Armored catfishes). *In*: Reis, R. E.; Kullander, S. O.; Ferrais, C. J. Jr. (Eds). *Check List of the Freshwater of South and Central America*. Porto Alegre: Edipucrs, p. 291-309.
- Ribeiro, L. R.; Salvadori, D. M. F.; Marques, E. K. 2003. Mutagênese Ambiental. *Editora da ULBRA*. Canoas-RS. p. 356.
- Primack, R. 2006. *Essentials of Conservation Biology*. 4th Edition, *Sinauer Associates*, p. 585.
- Primack, R. 2008. *A Primer of Conservation Biology*. 4th Edition, *Sinauer Associates*, p. 300.
- R Core Team. 2014. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Ridley, M. 2006. *Evolução* 3ª ed. Artmed, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 752pp.
- Rodrigues, D. O.; Silva, S. L. R.; Silva, M. S. R. 2009. Avaliação Ecotoxicológica Preliminar das Águas das Bacias Hidrográficas dos rios Tarumã, São Raimundo e Educandos. *Acta Amazonica*, v. 39(4): 935-942.
- Saiki, R. K.; Gelfand, D. H.; Stoffel, S.; Scharf, S. J.; Higuchi, R.; Horn, G. T.; Mullis, K. B.; Erlich, H.A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239: 487-491.
- Salvadori, S., Deiana, A.M.; Coluccia, E.; Floridia, G.; Rossi, E.; Zuffardi, O. 1995. Co-localization of (TTAGGG)_n telomeric sequences and ribosomal genes in Atlantic eels. *Chromosome Research*, 3: 54-58.
- Sambrook, J.; Russell, D. W. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Press, Vol. I. Cold Spring Harbor, NY. p. 633-664.
- Sanchez, S.; Fenocchio, A. S. 1996. Karyotypic studies and Cytotaxonomic considerations on *Callichthys callichthys* (Pisces, Siluriformes) from Argentina. *Cytologia*, v.61, p. 247-252.
- 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.; Jegu, M.; Merona, B. 1984. *Catálogo de peixes comerciais do baixo rio Tocantins. Projeto Tucuruí*. Manaus, ELETRONORTE/CNPq/INPA. 83 pp.
- Santos, G. M.; Ferreira, E. J. G.; Zuanon, J. A. S. 2006. *Peixes comerciais de Manaus*. Manaus: IBAMA/PROVÁRZEA, 144pp.

- Santos, F. A. 2012. *Caracterização Citogenômica em Hoplias malabaricus (Bloch, 1794) provenientes de rios de águas brancas, águas claras e águas pretas da bacia amazônica*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Oeste do Pará/Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia, Santarém-Pará, 71pp.
- Sá-Oliveira, J. C.; Chellappa, S.; Vasconcelos, H. C. G. 2011. Estrutura populacional, relação peso-comprimento e fator de condição de *Hoplosternum littorale* (Hancock, 1828) (Siluriformes: Callichthyidae) da área de proteção ambiental do Rio Curiaú, Macapá-AP. *Biota Amazonica, Macapá*, 1: 38-41.
- Schmid, W. 1975. The micronucleus test for cytogenetics analysis. In: Hollaender, A. (Eds). *Principles and Methods for Their Detection*. vol.4. Plenum Press, New York, p. 31-53.
- Schmid, W. 1976. The micronucleus test for cytogenetics analysis. In: Hollaender, A (Ed.) *Principles and Methods for Their Detection*. Plenum Press, New York, p. 31-53.
- Shimabukuro-Dias, C. K.; Oliveira, C.; Foresti, F. 2005. Comparative cytogenetic studies in species of the subfamily Callichthyinae (Teleostei: Siluriformes: Callichthyidae). *Caryologia*, 58(2): 102-111.
- Schneider, C. H.; Gross, M. C.; Terencio, M. L.; Artoni, R. F.; Vicari, M. R.; Martins, C.; Feldberg, E. 2013a. Chromosomal evolution of Neotropical cichlids: the role of repetitive DNA sequences in the organization and structure of karyotype. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*.
- Schneider, C. H.; Gross, M. C.; Terencio, M. L.; Do Carmo, E. J.; Martins, C.; Feldberg, E. 2013b. Evolutionary dynamics of retrotransposable elements *Rex 1*, *Rex 3* and *Rex 6* in neotropical cichlid genomes. *BMC Evolutionary Biology* (Online), v. 13, p. 152.
- Silva, M. R. S. 1996. *Metais pesados em sedimentos de fundo de igarapés (Manaus-AM)*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Pará/Mestrado Geoquímica Ambiental–Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, p. 120.
- 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. 127-166.

- Sioli, H. 1985. Amazônia: Fundamentos da ecologia da maior região de florestas tropicais. Rio de Janeiro: *Vozes*, p. 72.
- Skipper, M. 2007. Mysteries of heterochromatic sequences unravelled. *Nature Reviews*, 8: 567.
- Soares, M. G. M.; Costa, E. L.; Siqueira-Souza, F. K.; Anjos, H. D. B.; Yamamoto, K. C.; Freitas, C. E. C. 2008. *Peixes de lagos do médio Rio Solimões*. 2a ed. rev. Manaus: Instituto Piatam. 160pp.
- Souza, T. S.; Fontanetti, C. S. 2007. Ensaio do cometa para avaliação da qualidade das águas do Rio Paraíba do Sul, numa área sob influência de uma refinaria de petróleo. In: Congresso Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento em Petróleo e Gás, 4., Campinas. Anais. Campinas: PDPETRO.
- Sumner, A. T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatic. *Experimental Cell Research*, 75: 304-306.
- Supiwong, W.; Liehr, T.; Cioffi, M. B. Chaveerach, A.; Kosyakova, N.; Pinthong, K.; Tanee, T.; Tanomtong, A. 2013. Karyotype and cytogenetic mapping of 9 classes of repetitive DNAs in the genome of the naked catfish *Mystus bocourti* (Siluriformes, Bagridae). *Molecular Cytogenetics*, 6: 51.
- Terencio, M. L.; Schneider, C. H.; Gross, M. C.; Vicari, M. R.; Farias, I. P.; Passos, K. B.; Feldberg, E. 2013. Evolutionary Dynamics of Repetitive DNA in *Semaprochilodus* (Characiformes, Prochilodontidae): A Fish Model for Sex Chromosome Differentiation. *Sexual Development*, v. 7, p. 325-333.
- Thomas, K. V.; Silva, F. M. A.; Souza, L. A. L.; Nizzeto, L.; Waichman, A. V. 2014. Screening for selected human pharmaceuticals and cocaine in the urban streams of Manaus, Amazonas, Brazil. *Journal of the American Water Resources Association*, v. 50, n. 2, p. 1-7.
- Torres, G. A.; Gong, Z.; Iovene, M.; Hirsch, C. D.; Buell, C. R.; Bryan, G. L.; Novák, P.; Macas, J.; Jiang, J. 2011. Organization and evolution of subtelomeric satellite repeats in the potato genome. *Genes Genomes Genetics* 1: 85-92.
- Turner, B. J.; Difffoot, N.; Rasch, E. M. 1992. The callichthyid catfish *Corydoras aeneus* is an unresolved diploid-tetraploid sibling complex. *Ichthyological Exploration of Freshwaters* 3: 17-23.

- Valente, G. T.; Mazzuchelli, J.; Ferreira, I. A.; Poletto, A. B.; Fantinatti, B. E. A.; Martins, C. 2011. Cytogenetic mapping of the retroelements *Rex 1*, *Rex 3* and *Rex 6* among cichlid fish: new insights on the chromosomal distribution of transposable elements. *Cytogenetic and Genome Research*, 133: 34-42.
- Vanzella, T. P.; Martinez, C. B. R.; Cólus, I. M. S. 2007. Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species. *Mutation Research*, 631: 36-43.
- Varriale, A.; Torelli, G.; Bernardi, G. 2008. Compositional properties and thermal adaptation of 18S rRNA in vertebrates. *RNA*, 14: 1492-1500.
- Volff, J. N.; Korting, C.; Sweeney, K.; Scharl, M. 1999. The non-LTR retrotransposon *Rex 3* 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 *Rex 1* with varying success in invading fish genomes. *Molecular Biology and Evolution*, 17: 1673-1684.
- Volff, J. N.; Hornung, U.; Scharl, M. 2001. Fish retrotransposons related to the *Penelope* element of *Drosophila virilis* define a new group of retrotransposable elements. *Molecular Genetics and Genomics*, 265: 711-720.
- Volff, J. N.; Bouneau, L.; Ozouf-Costaz, C.; Fischer, C. 2003. Diversity of retrotransposable elements in compact puffer fish genomes. *Trends in Genetics*, 19: 674-678.
- Yuan, Y. W.; Wessler, S. R. 2011. The catalytic domain of all eukaryotic cut-and-paste transposase superfamilies. *Proc Natl Acad Sci*, 108: 7884-7889.
- Wasko, A. P.; Martins, C.; Wright, J. M.; Galetti, P. M. 2001. Molecular organization of 5S rDNA in fishes of the genus *Brycon*. *Genome*, 44: 893-902.
- Wessler, S. R. 2006. Eukaryotic Transposable Elements: Teaching Old Genomes New Tricks. *The Implicit Genome*, p. 138-165.
- Winemiller, K. O. 1987. Alimentação e biologia reprodutiva do curito, *Hoplosternum littorale*, nos Llanos venezuelanos com comentários sobre possíveis funções dos ampliados espinhos peitorais masculinos. *Biologia Ambiental of Fishes*, 20: 219-227.